



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



**Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Imunológicos e  
Terapêuticos da Leishmaniose Disseminada produzida  
por *Leishmania braziliensis***

**Maria Elisa Alves Rosa**

**Tese de Doutorado**

**Salvador (Bahia), 2012**

---

R 788 Rosa, Maria Elisa Alves

Aspectos epidemiológicos, clínicos, imunológicos e terapêuticos da leishmaniose disseminada produzida por *Leishmania braziliensis*/Maria Elisa Alves Rosa.-Salvador, 2012.

75 f.:II

Orientador: Paulo Roberto Lima Machado

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de C. da Saúde, 2012.

1. Leishmaniose. 2. Leishmaniose tegumentar. I. Machado, Paulo Lima. II Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 616.993.161

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE

**Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Imunológicos e  
Terapêuticos da Leishmaniose Disseminada produzida  
por *Leishmania braziliensis***

Maria Elisa Alves Rosa

Professor-orientador: Paulo Roberto Lima Machado

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

Salvador (Bahia), 2012

## **COMISSÃO EXAMINADORA:**

- 1- Maria Ilma Andrade Santos Araújo (Presidente) - Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz, Brasil (1997), Farmacêutica Bioquímica da Universidade Federal da Bahia, Brasil.
- 2- Anette Chrusciak Talhari - Doutora em Doenças Tropicais e Infecciosas pela Universidade do Estado do Amazonas, Brasil (2009), Pesquisadora Iniciante da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Brasil.
- 3- Heitor de Sá Gonçalves - Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará, Brasil (2010), Médico dermatologista do Centro de Dermatologia Dona Libânia, Brasil.
- 4- Jussamara Brito Santos - Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, Brasil (2005), Professora da Faculdade Baiana de Medicina e Saúde Pública, Brasil.
- 5- Nicolaus Albert Borges Schriefer – Doutor em Imunologia pela Universidade de São Paulo, Brasil (2001), Professor Adjunto da Universidade Federal da Bahia , Brasil.
- 6- Paulo Roberto Lima Machado (Professor orientador) - Doutor em Medicina pela Universidade Federal da Bahia, Brasil (2003), Professor da Faculdade Baiana de Medicina e Saúde Pública, trabalha na Universidade Federal da Bahia, Brasil.

## **DEDICATÓRIA:**

Este trabalho é dedicado aos pacientes de Corte de Pedra e à minha  
amada família.

## **EQUIPE:**

- 1- Adriano Queiroz Silva – Biólogo, Doutor em Imunologia
- 2- Edgar Carvalho – Doutor e Livre Docente-Pesquisador e Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Professor Titular em Medicina da FAMED-UFBA
- 3- Luiz Henrique Guimarães – Médico Clínico, Mestre em Medicina e Saúde
- 4- Olívia Bacellar – Bioquímica, Pesquisadora do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos
- 5- Paulo Roberto Lima Machado - Médico Especialista em Dermatologia pela Sociedade Brasileira de Dermatologia, Doutor em Medicina e Pesquisador do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos
- 6- Sérgio Marcos Arruda – Doutor em Patologia Humana e Pesquisador da Fundação Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:**

- 1- Universidade Federal da Bahia – Complexo Hospitalar Universitário  
Professor Edgard Santos (COM-HUPES)
  - Serviço de Imunologia
- 2- Posto de Saúde da Vila de Corte de Pedra, Tancredo Neves, Bahia

## **FONTES FINACIADORAS:**

- 1- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
(Cnpq)
- 2- Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESB)
- 3- National Institutes of Health (NIH)



## **AGRADECIMENTOS:**

- 1- Paulo Roberto Lima Machado, pelo cuidado na orientação
- 2- Olívia Bacellar, pela realização da avaliação imunológica
- 3- Sérgio Arruda, pela realização das histopatologias

## ÍNDICE

I-	Índice de Figuras	10
II-	Índice de Tabelas	11
III-	Índice de Gráficos	13
IV-	Índice de Siglas	14
V-	Resumo	15
VI-	Objetivos	16
VII-	Introdução	17
VIII-	Revisão da Literatura	18
IX-	Justificativa	36
X-	Casuística, Material e Métodos	37
XI-	Resultados	44
XII-	Resumo dos Resultados	53
XIII-	Discussão	54
XIV-	Propostas de Estudo	57
XV-	Conclusões	59
XVI-	Summary	60
XVII-	Referências Bibliográficas	61
XVIII-	Anexos	70

## **I. ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 - Histopatologia da borda da úlcera e da pápula de 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA , 2009-2011 47

Figura 2 - Expressão tecidual de CXCL10 em amostras de úlcera e pápula de pacientes com Leishmaniose Disseminada e Leishmaniose Cutânea, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 1998 – 2001 52

## II. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – LTA no Brasil: espécies de <i>Leishmania</i> , principais vetores, reservatórios e regiões geográficas	19
Tabela 2 - Aspectos clínico-laboratoriais das formas cutâneas de LTA	22
Tabela 3 - Relatos de Leishmaniose Disseminada no Novo Mundo	24
Tabela 4 - Relatos de co-infecção Leishmaniose Disseminada e SIDA	25
Tabela 5 - Citocinas e quimiocinas estudadas e seu papel na resposta imune frente aos patógenos intracelulares	29
Tabela 6 - Características demográficas dos 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011	45
Tabela 7 - Características clínicas de 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011	46
Tabela 8 - Número de cadeias ganglionares envolvidas em 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011	47
Tabela 9 - Frequências absoluta e relativa de sintomas sistêmicos observados durante o período de disseminação em pacientes com Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011	47
Tabela 10 - Aspectos laboratoriais em 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011	48
Tabela 11 - Resposta terapêutica ao antimonial pentavalente em 114 pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra - BA, 2009-2011	50
Tabela 12 - Influência dos aspectos clínicos na resposta ao tratamento	

com antimonial pentavalente em pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra – BA, 2009-2011 50

Tabela 13 - Produção de  $INF\gamma$  e  $TNF\alpha$  por células mononucleares de sangue periférico após estímulo com antígeno solúvel de Leishmania em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada com e sem envolvimento mucoso, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 1998 – 2001 52

Tabela 14 - Produção tecidual de citocinas e quimiocinas em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada e Leishmaniose Cutânea, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 1998 – 2001 53

### III. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, 1985 – 2011	20
Gráfico 2 - Proporção de casos de Leishmaniose Disseminada diagnosticados em Corte de Pedra, Bahia, 1978 – 2008	25
Gráfico 3 - Produção de $INF\gamma$ , $TNF\alpha$ , IL-5 e IL-10 por células mononucleares de sangue periférico, após estímulo com antígeno solúvel de Leishmania em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada (DL) e Leishmaniose Cutânea (CL), 1998 – 2001	50
Gráfico 4 - Produção de CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 e CXCL10 por células mononucleares de sangue periférico, após estímulo com antígeno solúvel de Leishmania em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada (DL) e Leishmaniose Cutânea (CL), 1998 – 2001	51

#### **IV.ÍNDICE DE SIGLAS**

CCL2/MCP-1: do inglês Chemokine (C-C motif) ligand 2/monocyte chemotactic protein-1

CCL3: do inglês Chemokine (C-C motif) ligand 3

CCL11: do inglês Chemokine (C-C motif) ligand 11

CCL12: do inglês Chemokine (C-C motif) ligand 11

CXCL9: do inglês Chemokine (C-X-C motif) ligand 9

CXCL10/IP-10: do inglês C-X-C motif chemokine 10/ Interferon gamma-induced protein 10

ELISA: do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IgG: do inglês Imunoglobulina G

IL-2: do inglês Interleucina 2

IL-4: do inglês Interleucina 4

IL-5: do inglês Interleucina 5

IL-10: do inglês Interleucina 10

INF $\gamma$ : do inglês Interferon gama

TGF $\beta$ : do inglês Transforming growth factor beta

TNF $\alpha$ : do inglês Tumor necrosis factor alpha

## V. RESUMO

### **Aspectos epidemiológicos, clínicos, imunológicos e terapêuticos da Leishmaniose Disseminada produzida por *Leishmania braziliensis***

A Leishmaniose Disseminada (LD) é forma grave de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões pleiomórficas, em mais de 2 segmentos corporais não contíguos. Ainda pouco compreendida, importante pelo caráter emergente, gravidade das lesões e dificuldade de tratamento. **Objetivo:** descrição dos aspectos clínicos, epidemiológicos, imunológicos e terapêuticos da LD. **Desenho do Estudo:** Série de casos, Corte Transversal e Coorte. **Casuística, Material e Métodos:** acompanhamento clínico de 121 pacientes de LD. Sangue periférico e tecido de 64 pacientes de LD e de Leishmaniose Cutânea (LC) foram avaliados quanto à produção *in vitro* e expressão tecidual de INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL5, IL10, CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 e CXCL10. **Resultados:** apresentam maior risco de desenvolverem LD indivíduos adultos, do gênero masculino e lavradores. Envolvimento mucoso foi observado em 50% dos casos, 64% apresentaram entre 10 e 50 lesões, a reação de Montenegro foi positiva em 65% e *Leishmania braziliensis* foi identificada em 97% dos pacientes. Cura clínica foi observada em 36,8% dos pacientes com o uso de 1 a 4 séries de antimonial pentavalente (Sb<sup>V</sup>); anfotericina B foi utilizada como medicação de resgate em 29% dos casos, com cura clínica em 100%. Pacientes adultos apresentaram um risco 9 vezes maior de falha terapêutica com o Sb<sup>V</sup> que os menores de 18 anos. A produção *in vitro* de IFN $\gamma$  e de TNF $\alpha$  foi mais baixa em pacientes com LD. A produção de CXCL9 foi mais elevado nos portadores de LD. A expressão tecidual das citocinas e quimiocinas foi equivalente nas 2 formas. **Conclusões:** adultos apresentam maior risco de falha terapêutica com o Sb<sup>V</sup>. A avaliação imunológica sugere que os pacientes de LD apresentam resposta Th1 deslocada para os tecidos.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose Disseminada, Leishmaniose Tegumentar Americana, *L. braziliensis*



## VI. OBJETIVOS

### GERAL

Caracterizar a Leishmaniose Disseminada, quanto aos seus aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos.

### ESPECÍFICOS

1. Caracterizar os aspectos clínicos da Leishmaniose Disseminada
2. Caracterizar a resposta terapêutica ao antimonial e à anfotericina B
3. Analisar a resposta imune *in vitro*, quanto à produção das citocinas  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL5 e IL10 e das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 e CXCL10
4. Analisar a resposta imune *in situ*, por meio da determinação da produção local das citocinas  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL5 e IL10 e das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 e CXCL10

## VII. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Disseminada (LD) é forma grave de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), associada a severo comprometimento cutâneo e frequência mais elevada de envolvimento mucoso, quando comparada à Leishmaniose Cutânea (LC).

Na região de Corte de Pedra – Bahia, tem se observado, nos últimos dez anos, números cada vez mais elevados de diagnóstico de LD.

O acompanhamento clínico dos pacientes portadores de LD revela uma dificuldade no manejo terapêutico dessa forma de LTA, com necessidade de numerosas séries de antimonial pentavalente ou do uso da anfotericina B para a cura clínica.

A LD apresenta peculiaridades no quadro clínico que a distinguem da LC: múltiplas lesões em diversos segmentos corporais, elevado índice de associação com lesão mucosa, presença de sintomas sistêmicos no momento da disseminação e a ausência de comorbidades imunossupressoras. A LD também deve ser diferenciada da Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD), forma anérgica de LTA, associada a múltiplas lesões não ulceradas e riqueza de parasitas nessas lesões.

Estudos realizados pelo nosso grupo têm demonstrado que a LD apresenta características imunológicas próprias que a caracterizam como uma forma particular dentro do espectro clínico da LTA.

## VIII. REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Aspectos epidemiológicos

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, zoonótica, não contagiosa, causada por protozoário do gênero *Leishmania*, capaz de envolver pele e mucosas. A leishmaniose tegumentar é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, importante problema de Saúde Pública em 88 países, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (SVS/MS, 2007; Goto *et al*, 2012).

A LTA acomete outras espécies animais além do homem e o meio ambiente desempenha papel importante na sua epidemiologia. Em todas as regiões do mundo, é descrita a transmissão do parasita entre animais silvestres, entretanto, o desequilíbrio ambiental proporcionado pela penetração do homem nas florestas implicou numa mudança do ciclo vetor-reservatório. Assim é que os animais domésticos e o homem entram no circuito do ciclo de vida da *Leishmania* (SVS/MS, 2007).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar apresenta variedade de espécies de *Leishmania*, vetores e reservatórios, com diferentes padrões de transmissão (Tabela 1).

São descritos três perfis epidemiológicos de transmissão das Leishmanioses: 1- Silvestre – quando ocorre a transmissão em área de vegetação primária; 2- Ocupacional ou de lazer – quando a transmissão está relacionada à derrubada da mata para exploração econômica ou turística; 3- Rural ou periurbana - quando a transmissão ocorre em área de colonização, onde já houve a adaptação do vetor ao peridomicílio (SVS/MS, 2007).

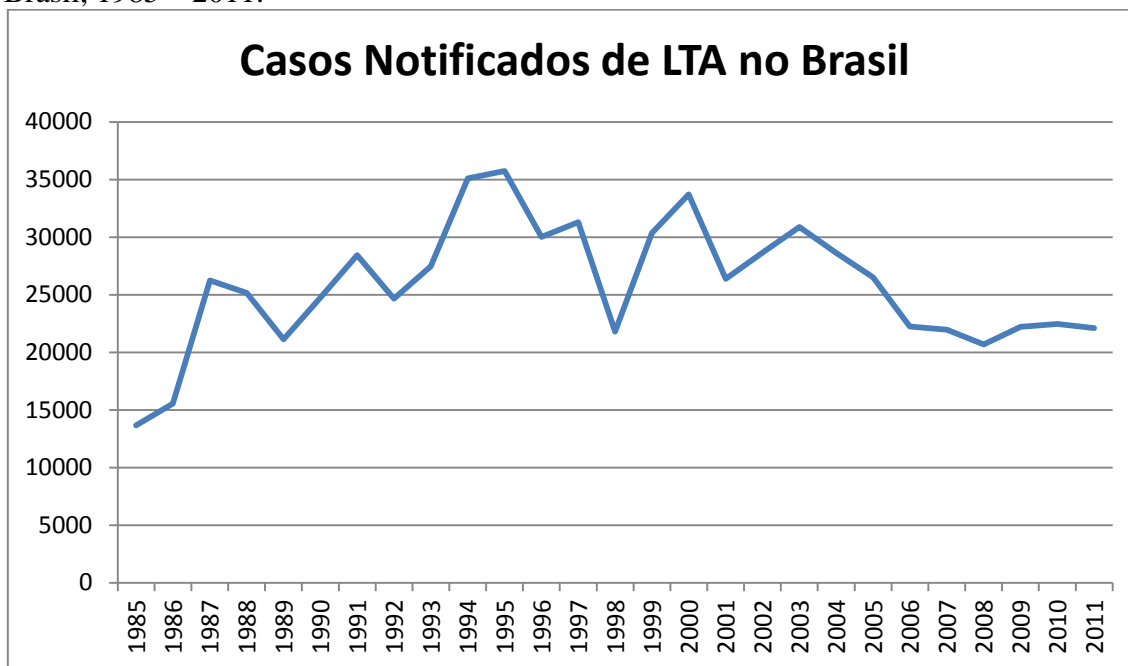
Tabela 1: LTA no Brasil: espécies de *Leishmania*, principais vetores, reservatórios e regiões geográficas.

<b>Espécie de <i>Leishmania</i></b>	<b>Vetores</b>	<b>Reservatórios</b>	<b>Região geográfica</b>
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	<i>Lutzomia complexa</i> , <i>L. wellcomei</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>L. migonei</i> , <i>L. neivai</i> , <i>L. intermédia</i>	Roedores silvestres, cães, gatos, cavalos	Todos os estados do Brasil
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	<i>L. umbratilis</i> , <i>L. anduzei</i>	Preguiça, tamanduá, gambá	Acre, Amapá, Amazonas, Roraima e Pará
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	<i>L. laviscutellata</i> , <i>L. reducta</i> , <i>L. olmeca nociva</i>	Roedores silvestres	Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>L. ubiquitalis</i>	Paca	Pará, Rondônia e Acre
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>L. ayrozai</i> , <i>L. paraensis</i> , <i>L. squamiventris</i>	Tatu	Pará e Amazonas
<i>L. (V.) lindenberg</i>	<i>L. antunesi</i> (provável)	-	Pará
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>L. whitmani</i>	Macaco, quati, preguiça	Pará e Maranhão

Fonte: SVS/MS

No Brasil, a LTA é doença infecciosa dermatológica de grande importância, não só pelo risco de deformidades, como pelo prejuízo psicológico, econômico e social que produz. É considerada uma doença endêmica, em expansão, havendo registro de casos em todas as regiões do país; Gráfico 1 (SVS/MS, 2007).

Gráfico 1. Distribuição dos casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, 1985 – 2011.



Fonte: SVS/MS

## 2. Aspectos Clínicos

As LTAs, no Brasil, apresentam peculiaridades clínicas segundo a área geográfica onde houve a transmissão para o homem, contribuindo para a forma clínica a espécie do parasita, do vetor, do reservatório e as características dos ecossistemas. São descritas quatro formas clínicas principais: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucosa (LM), Leishmaniose Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD) (Marzochi *et al*, 1994; Marsden *et al*, 1986; Jones *et al*, 1987).

LC associada à *L. braziliensis* é caracterizada pelo surgimento, no local da inoculação, após um período de incubação de 2 semanas a meses (Furtado *et al*, 1994), de pápula eritematosa, à qual se segue nódulo e posteriormente úlcera, dando origem a apresentação clássica da doença: uma ou mais lesões ulceradas, de bordas elevadas e fundo granuloso,

localizadas nas áreas expostas do corpo (Aguiar Pupo *et al*, 1946). Está associada à linfadenopatia regional, com ou sem linfangite em 12 a 30% (Barral *et al*, 1995; Gontijo *et al*, 2003). O envolvimento associado da mucosa nasal pode ser visto em cerca 3% dos casos; Tabela 2 (Jones *et al*, 1987). Na região Norte do país, são observadas múltiplas lesões cutâneas, causadas por *L. guyanensis* e, aparentemente, relacionadas à múltiplas picadas do inseto vetor (SVS/MS, 2007).

Tabela 2 – Aspectos clínico-laboratoriais das principais formas cutâneas de LTA

Aspectos clínico-laboratoriais	Formas clínicas		
	Cutânea	Disseminada	Difusa
<b>Manifestações cutâneas</b>	Úlceras	Pápulas, lesões acneiformes, exulcerações, úlceras	Nódulos, placas infiltradas
<b>Envolvimento Mucoso</b>	3%	38 – 48%	Raro
<b>Aspectos histopatológicos</b>	Infiltrado linfoplasmocitário, granulomas	Infiltrado linfoplasmocitário, com ou sem granuloma	Infiltrado de linfócitos e macrófagos sem granuloma
<b>Presença do parasita</b>	Poucos ou ausentes	Poucos ou ausentes	Múltiplos
<b>Espécie de <i>Leishmania</i></b>	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
<b>Reação de Montenegro</b>	Positiva ou Negativa	Positiva ou Negativa	Negativa
<b>Título de anticorpo (IFI)</b>	Baixo	Baixo a moderado	Alto

IFI: imunofluorescência indireta

A LM, na maioria dos casos, é secundária à Leishmaniose Cutânea, podendo ocorrer meses ou anos após o seu tratamento. Em alguns casos, sinais de doença cutânea estão ausentes e nestes casos, o envolvimento mucoso pode ser associado à Leishmaniose subclínica ou pode representar doença mucosa primária. O teste de hipersensibilidade tardia é fortemente positivo e o tratamento prolongado costuma ser eficaz. No Brasil, é causada por *L. braziliensis*, mas há casos relacionados à *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Apresenta-se em cinco estágios clínicos (Lessa *et al*, 1999).

Estágio I: nodulação esbranquiçada localizada no septo cartilaginoso, assoalho e parede lateral, sem ulceração.

Estágio II: ulceração superficial, com granulações finas no septo anterior, conchas inferiores e assoalho da fossa nasal.

Estágio III: a ulceração se aprofunda, mostrando granulação grosseira e infiltração mucosa. Esta se apresenta friável, com sangramento fácil e formação de crostas hemáticas. O aspecto externo é do “nariz de anta” ou “nariz de tapir”, conseqüente à intensa infiltração edematosa das cartilagens, do tecido celular subcutâneo e da pele. Neste estágio, os pacientes se queixam de obstrução nasal, rinorréia sanguinolenta e dor local.

Estágio IV: necrose do septo cartilaginoso anterior, podendo haver perfuração.

Estágio V: o processo inflamatório é intenso com destruição total da columela e queda da ponta do nariz, dando origem ao “nariz em sela” (Marsden *et al*, 1994; Lessa *et al*, 1999; Lessa *et al*, 2012).

A LD é forma grave de LTA, descrita inicialmente por Torres, em 1920, na Bahia (Costa *et al*, 1986). Também foi observada no Maranhão (Galvão *et al*, 1993), Ceará (Sousa *et al*, 2006), Minas Gerais (Ogawa *et al*, 2006; Sousa *et al*, 2006) e no Equador (Calvopina *et al*, 2005); Tabela 3.

Várias espécies de *Leishmania* já foram associadas à LD, como *L. amazonensis* (Carvalho *et al*, 1994), *L. panamensis* (Calvopina *et al*, 2005) e *L. guyanensis* (Couppié *et al*, 2004), porém, a maioria dos casos descritos no Brasil são causados pela *L. braziliensis* (Costa *et al*, 1986; Galvão *et al*, 1993; Turetz *et al*, 2002; Vieira-Gonçalves *et al*, 2008).

Na região de Corte de Pedra, é considerada forma emergente, correspondendo a 1,6% dos casos de LTA diagnosticados no período de 1988 a 1993; essa proporção aumentou para 3,9% nos anos de 2004 a 2008 (Gráfico 2).

Tabela 3- Relatos de Leishmaniose Disseminada no Novo Mundo\*

	<b>Local</b>	<b>Leishmania</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Número de lesões</b>	<b>Tipo das lesões</b>	<b>Lesão Mucosa</b>
Costa <i>et al</i> , 1986	Bahia, Brasil	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i>	8	-	-	-
Galvão <i>et al</i> , 1993	Maranhão, Brasil	<i>L. braziliensis</i>	1	58	Úlcera	-
Carvalho <i>et al</i> , 1994	Bahia, Brasil	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i>	8	75-800	Pápulas, úlceras, lesões acneiformes	38%
Turetz <i>et al</i> , 2002	Bahia, Brasil	<i>L. braziliensis</i>	42	10-300	Acneiforme, pápulas, nódulos, úlceras	29%
Couppié <i>et al</i> , 2004	Guiana Francesa	<i>L. guyanensis</i>	1	425	Pápulas, nodules	-
Calvopina <i>et al</i> , 2005	Equador	<i>L. panamensis</i>	1	69	Úlceras, papulas, crostas	-
Sousa <i>et al</i> , 2006	Ceará, Brasil	Provavelmente <i>L. braziliensis</i>	1	749	Pápulas, crostas, úlceras	-
Ogawa <i>et al</i> , 2006	Ceará e Minas Gerais, Brasil	Área endêmica de <i>L. braziliensis</i>	2	-	Pápulas, nódulos, placas, lesões acneiformes,	-
Vieira-Gonçalves <i>et al</i> , 2008	Rio de Janeiro, Brasil	<i>L. braziliensis</i>	2	-	Pápulas, nódulos, crostas, lesões verrucosas	-
Rincón <i>et al</i> , 2008	Santander, Colômbia	<i>L. panamensis</i>	2	21	Úlceras, nódulos, indurações	-

\*Selecionados somente relatos não associados à imunossupressão (-) Não informado

A LD se caracteriza pelo surgimento inicial de úlcera clássica de LC à qual se seguem, em algumas semanas, múltiplas lesões do tipo acneiformes, papulosas, pequenas placas e pequenas exulcerações, distribuídas em diversos segmentos corporais. Durante o período de disseminação, o paciente pode queixar-se de febre, astenia, mialgia e queda do estado geral (Carvalho *et al*, 1994). Como critério diagnóstico de LD convencionou-se o número mínimo de 10 lesões em pelo menos 2 segmentos corporais não contíguos. O envolvimento mucoso também pode



ser observado em cerca de 28 a 48% dos casos de LD (Turetz *et al*, 2002; Jirmanus *et al*, 2012). O teste de hipersensibilidade tardia pode ser positivo ou negativo, são encontrados pouco ou nenhum parasita nas lesões (Tabela 2) e o tratamento costuma ser prolongado e difícil.

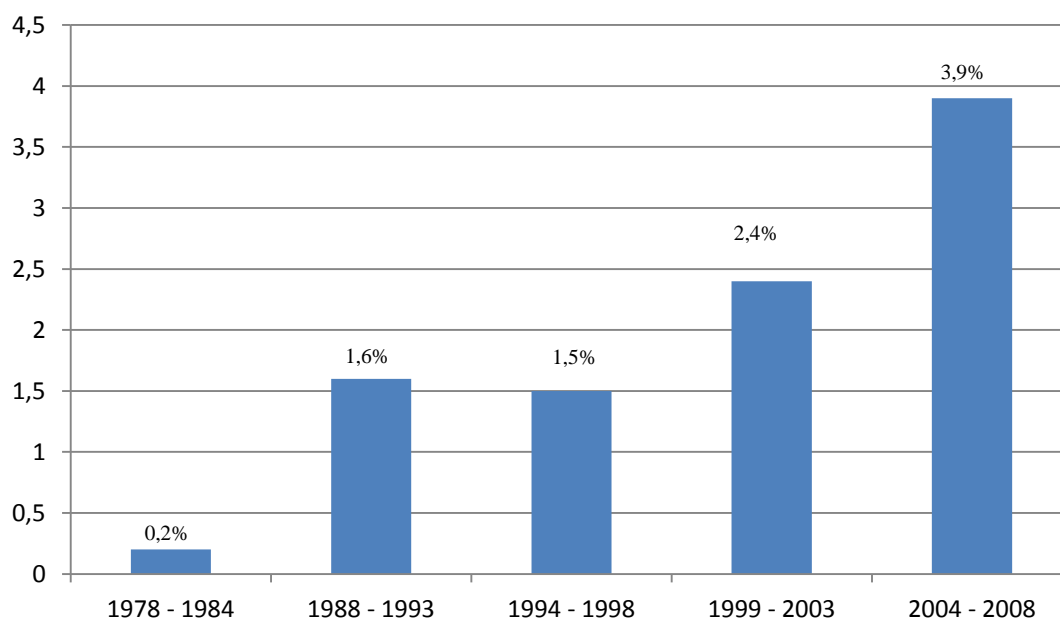
Muitos casos de LD relatados na literatura estão associados à imunossupressão (Da-Cruz *et al*, 1992; Durand *et al*, 1998; Agostini *et al*, 1998; Borges *et al*, 1999; Lindoso *et al*, 2009, Tabela 4), no entanto, os casos descritos na Bahia são em pacientes aparentemente saudáveis (Turetz *et al*, 2002; Rosa *et al*, 2011).

Tabela 4. Relatos de co-infecção Leishmaniose Disseminada e SIDA.

	Local	<i>Leishmania</i>	Número de casos	Número de lesões	Tipo de lesão	Lesão Mucosa
Da-Cruz <i>et al</i> , 1992	Brasil	<i>L. braziliensis</i>	1	-	Pápulas, nódulos	Presente
Machado <i>et al</i> , 1992	Pernambuco, Brasil	<i>L. braziliensis</i>	1	-	Pápulas, nódulos	Nasal, orofaríngea
Durand <i>et al</i> , 1998	França	<i>L. infantum</i>	1	-	-	-
Agostini <i>et al</i> , 1998	Itália	<i>L. infantum</i>	7	-	-	-
Borges <i>et al</i> , 1999	Minas Gerais, Brasil	-	2	-	Nódulos, pústulas, lenticulares, numulares, sarcoídicas	Oral
Schraner <i>et al</i> , 2005	África	<i>L. major</i>	1	-	Máculas, pápulas, nódulos	-
Posada-Vergara <i>et al</i> , 2005	-	<i>L. braziliensis</i>	2	-	Pápulas, placas, úlceras	Nasal, oral
Gonzalez <i>et al</i> , 2006	Colômbia	<i>L. panamensis</i>	1	300	Nódulos, placas, crostas	-
Lindoso <i>et al</i> , 2009	-	-	6	-	Nódulos, pápulas, placas, úlceras	Oral, nasal, genital
Guerra <i>et al</i> , 2011	Amazonas, Brasil	-	4	-	Úlceras, pápulas, nódulos	-

Silveira *et al* (2005 e 2009) descrevem uma forma de LTA denominada Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB), intermediária entre as formas polares LM e LCD. Associada tanto à *L. (V.) braziliensis*, quanto à *L. (L.) amazonensis*, caracterizada pela inibição parcial da resposta inflamatória mediada por células T com disseminação de pápulas eritematosas, lesões ulceradas e o envolvimento mucoso pode ser observado.

Gráfico 2. Proporção de casos de Leishmaniose Disseminada diagnosticados em Corte de Pedra, Bahia, 1978 – 2008.



Fonte: adaptado de Jirmanus *et al*, 2012

Na LCD, observam-se várias lesões nodulares não ulcerativas de evolução lenta e ausência de envolvimento mucoso (Barral *et al*, 1995). É forma grave da infecção, com má resposta ao tratamento, caracterizada por anergia e deficiência da resposta imune celular específica contra *Leishmania*. No Brasil, é causada por *L. amazonensis*.

Lesões cutâneas, menos frequentes também encontradas são:

- Pápulo-tuberosas: pápulas ou nódulos subcutâneos que aumentam em tamanho e profundidade
- Vegetantes: lesões papilomatosos, úmidas e friáveis
- Verrucosas: lesões ceratósicas, ásperas, com crostas e descamação
- Esporotricóide: lesões pápulo-nodulares seguindo o trajeto linfático, associado à linfangite.

Existe ainda, um grupo de indivíduos que habitam as áreas endêmicas, sendo considerados portadores da forma subclínica da doença, por não apresentarem lesão cutânea, mas com intradermorreação de Montenegro positiva (Follador *et al*, 2002).

No Nordeste do Brasil, região de Corte de Pedra, Bahia, vem se verificando formas clínicas atípicas de LTA, caracterizadas por lesões verrucosas, crostosas, lupóides e vegetantes, mais concentradas na face e, algumas vezes, associadas à gestação ou à co-infecção com HIV (Guimarães *et al*, 2009).

### 3. Aspectos imunológicos da LTA

A LTA é uma doença de imunopatogênese complexa. Estudos em modelos experimentais da leishmaniose mostram que uma resposta inflamatória tipo Th1, rica na produção de IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , está associada à resistência e cura espontânea da lesão. Já uma resposta tipo Th2, em que predominam IL-4 e IL-5, está relacionada à susceptibilidade ao parasita (Scott *et al*, 1988; Scott *et al*, 1989).

No entanto, no homem, esse modelo dicotômico não se repete e a mesma resposta inflamatória capaz de controlar a proliferação da *Leishmania* também pode produzir a lesão tecidual.

Em relação à LD, os estudos têm demonstrado uma produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , porém em níveis mais baixos quando comparados à LC. Turetz *et al* (2002) observaram que os pacientes de LD também produziam mais IL-5 e IL-10 (citocinas de padrão Th2) que os pacientes portadores de LC. Esses achados sugerem que a disseminação das lesões está relacionada a uma supressão inicial da resposta protetora Th1, com proliferação do parasita, posicionando essa forma clínica no meio do espectro imunológico das LTA (Carvalho *et al*, 1994).

Esse racional, de modo algum, se opõe à ideia da disseminação observada na LM. Talvez, ambas as formas comecem de maneira semelhante, com uma imunossupressão nos primeiros momentos da infecção, proliferação e disseminação do parasita; o que seria seguido por uma resposta inflamatória exuberante, com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, característicos da LM. Já uma inflamação menos intensa, com maior disseminação da *Leishmania*, levaria à LD. Concorreriam para um ou outro quadro, fatores do hospedeiro, do parasita e do vetor.

As quimiocinas são mediadores essenciais para o recrutamento das células inflamatórias, para a execução das funções efetoras e para o controle da infecção (Tabela 5). O perfil de resposta inflamatória Th1, protetor contra infecções intracelulares, está associado à expressão de níveis elevados de CCL2/MCP-1, CXCL9 e CXCL10/IP-10 (Ritter & Körner, 2002).

Tabela 5- Citocinas e quimiocinas estudadas e seu papel na resposta imune frente aos patógenos intracelulares

Citocinas e Quimiocinas estudadas	Papel na resposta imune frente à <i>Leishmania braziliensis</i>
INF $\gamma$	Produzido por cepas de LT específicos e células <i>natural killer</i> , estimula perfil Th1 de resposta imune
TNF $\alpha$	Produzido por macrófagos e linfócitos T CD4+, estimula o perfil de resposta Th1 da resposta imune
IL-5	Produzido por linfócitos T e mastócitos, relacionado ao perfil Th2 da resposta imune
IL-10	Produzido por linfócitos T regulatórios, relacionado à inibição da síntese de citocinas
CCL2/MCP1	recrutamento de monócitos, linfócitos T de memória e células dendríticas
CCL3/MIP-1 $\alpha$	recrutamento de leucócitos (inflamação aguda)
CCL11/eotaxina	recrutamento de eosinófilos
CXCL9	recrutamento de linfócitos T específicos ativados
CXCL-10/IP-10	deslocamento de monócitos/macrófagos, linfócitos T, células <i>natural killer</i> , células dendríticas. Adesão de linfócitos T às células endoteliais. Angiogênese

Moll (1997) observou que a expressão de MCP-1 era importante para a mobilização de macrófagos para a lesão e para o desenvolvimento da sua ação leishmanicida. Vasquez & Soong (2006) demonstraram que macrófagos da medula óssea oriundos de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com CXCL10/IP10 ou com CXCL2/MCP-1 e posteriormente expostos à *L. amazonensis* foram capazes de controlar a proliferação do parasita e apresentaram maior produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e óxido nítrico.

Infecção por *L. braziliensis* estimula maior produção de CXCL-10 e maior expressão de seu receptor CXCR3 pelos monócitos (Vargas-Inchaustegui *et al*, 2010).

Neutrófilos são rapidamente mobilizados para o ponto de inoculação do microrganismo, de onde são capazes de estimular o recrutamento de células fagocíticas; a produção de CCL3 por parte desses neutrófilos é fator

crítico para atração das células dendríticas imaturas para o local de inoculação da *L. major* sendo importante no primeiro momento da resposta inflamatória (Charmoy *et al*, 2010).

Como acima mencionado, características do parasita também podem influenciar o padrão de resposta inflamatória do hospedeiro e, por conseguinte, a forma clínica da LTA. Na região endêmica de Corte de Pedra, Bahia, são encontradas populações multiclonais de *L. braziliensis* associadas à LC, LM e LD (Schriefer *et al*, 2004). Leopoldo *et al* (2006) observaram que diferentes sub-espécies de *L. braziliensis* eram capazes de estimular a resposta imune em diferentes intensidades.

Homens adultos, lavradores parecem ter mais chance de apresentar a forma disseminada da LTA (Turezt *et al*, 2002), sugerindo a existência de exposição ocupacional, com participação do vetor e do parasita na gênese da doença.

#### 4. Aspectos diagnósticos

Diante de lesões típicas de LTA, principalmente em pacientes oriundos de áreas endêmicas, o diagnóstico clínico epidemiológico pode ser realizado. Porém, idealmente, sempre que possível, o diagnóstico clínico epidemiológico deve ser confirmado por métodos laboratoriais.

##### 4.1. Exames diretos

##### 4.1.1. Exames parasitológicos

Os exames parasitológicos visam à demonstração do parasita, o que pode ser feito em material obtido por escarificação, aspirado ou biópsia, por meio da pesquisa direta, do isolamento em meios de cultura e de

exames de imunohistoquímica, que detectam antígenos de *Leishmania* no tecido.

Comumente, esses métodos permitem apenas a observação do parasita, sem, no entanto, possibilitar a determinação da espécie de *Leishmania*. Em laboratórios de referência, parasitas recuperados de cultura, podem ter a espécie identificada por meio de pesquisa de anticorpos espécie específicos (Grimaldi *et al*, 1996) ou da avaliação do perfil de isoenzimas por eletroforese (Cupolillo *et al*, 1995). A sensibilidade desses métodos varia de cerca de 58% para a cultura e de 88% para a imunohistoquímica (Goto *et al*, 2012).

#### 4.1.2. Exames moleculares

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) possibilita a identificação do parasita assim como a determinação da espécie de *Leishmania* em amostras de tecido.

O exame de PCR tem se mostrado sensível e específico no diagnóstico da LTA (de Oliveira *et al*, 2003,), superando os resultados obtidos com outros métodos como o exame direto, as sorologias e a cultura (Andrade *et al*, 2005). Chrusciak-Talhari *et al* (2011) identificaram a espécie de *Leishmania* em 100% das amostras de pele estudadas, enquanto que Neves *et al* (2011) a identificaram em 93% dos casos de LC. Weirather *et al* (2011) desenvolveram método sistematizado de PCR quantitativo capaz de detectar, quantificar e determinar a espécie de *Leishmania* a partir de espécimes clínicos.

#### 4.1.3. Exame histológico

Os padrões histológicos podem ser auxiliares no diagnóstico da LTA. Nas formas ricas em parasitas, como na LCD, as formas amastigotas

de *Leishmania* podem ser visualizadas. Nas formas em que há escassez de parasitas, as alterações teciduais podem ajudar no diagnóstico, na presença de quadro clínico compatível (Tabela 2).

#### 4.2. Exames indiretos

##### 4.2.1. Exames imunológicos

A sorologia por Imunofluorescência Indireta (IFI) é método pouco utilizado em que se pesquisa anticorpos anti-*Leishmania*. Não é recomendado como único método diagnóstico, pois existe a possibilidade de reação falso positiva em indivíduos aparentemente saudáveis ou com *Trypanosoma cruzi*, *L. chagasi*, esporotricose, paracoccidiodomicose e com o pênfigo foliáceo sulamericano (SVS-MS, 2007).

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) se baseia na resposta de hipersensibilidade celular tardia. É feita pela injeção, na epiderme, a cerca de 3 cm da dobra cubital, de 0.1ml do antígeno. A leitura é realizada com 48 a 72 horas. O teste é negativo na ausência de pápula ou endureção ou quando estas são inferiores a 5mm. O teste positivo se caracteriza por pápula ou endureção maior ou igual a 5 mm. Ulceração também é classificada como positividade. A Reação de Montenegro é positiva em mais de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar cutânea e cutâneo-mucosa. Podendo ser falso-negativa nas seguintes situações: no primeiro mês do início das lesões, na leishmaniose disseminada e cutâneo difusa, nos pacientes imunossuprimidos. Reação cruzada com protozoário do gênero *Trypanosoma*, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose e alergia ao diluente são causas de falso-positividade da IDRM. Após a cura clínica, a IDRM pode permanecer positiva por vários anos, assim como pode ser positiva em indivíduos saudáveis, moradores de



áreas endêmicas, o que limita a sua utilização como método diagnóstico único da doença.

## 5. Aspectos Terapêuticos

As drogas de escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, encontrados em duas apresentações farmacêuticas: antimoniato de N-metilglucamina e estibugluconato de sódio; no Brasil, somente a primeira é disponível para uso (SVS/MS, 2007).

Os antimoniais atuam inibindo mecanismos bioenergéticos da *Leishmania*, como a glicólise e a oxidação de ácidos graxos, sendo consideradas drogas leishmanicidas (SVS/MS, 2007).

O antimonial pentavalente, após administração parenteral, é rapidamente eliminado por via renal e após 6 horas, 80% da droga injetada já foi eliminada pela urina. Injeções repetidas vão, progressivamente, aumentando os níveis de retenção da droga, que fica concentrada nos tecidos hepático e esplênico, no entanto, não se sabe a concentração de antimônio disponível na pele e na mucosa (SVS/MS, 2007).

A Organização Mundial de Saúde recomenda uma dose de antimonial de 15 mg Sb<sup>V</sup>/Kg/d, durante 20 dias para a doença cutânea. Não havendo cicatrização da lesão em até 12 semanas do fim do tratamento, ele deverá ser repetido por mais 30 dias. Para a leishmaniose mucosa, a dose recomendada é de 20 mg Sb<sup>V</sup>/Kg/d durante 30 dias. Em caso de falha na cicatrização após 12 semanas, a medicação pode ser repetida mais uma vez. A administração é feita por via parenteral. A via intramuscular é muito dolorosa, deste modo, dá-se preferência à via endovenosa, sem necessidade de diluição e com aplicação lenta.

O antimônio pentavalente conta com um grande número de efeitos colaterais a ele relacionados: artralgias, mialgias, sintomas gastro-intestinais, febre, fraqueza e alterações eletrocardiográficas, Insuficiência Renal Aguda, além das várias limitações de uso: gestação, idade superior a 50 anos, cardio, nefro e hepatopatias (SVS/MS, 2007).

Na ausência de resposta ao antimônio, recomenda-se o uso das drogas de segunda escolha, como a anfotericina B e a pentamidina.

A anfotericina B é um antibiótico com ação leishmanicida intra e extracelular, considerada medicação de primeira escolha no tratamento de gestantes. Podendo ser encontrada sob duas formulações principais: desoxicolato sódico e lipossomal. No Brasil, a anfotericina B lipossomal não está registrada na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento da LTA.

A anfotericina B liga-se amplamente às proteínas do plasma, atingindo altas concentrações no fígado, baço, pulmões e rins. Parcialmente metabolizada no fígado, é eliminada por via biliar e urinária (Catalán & Montejo, 2006).

A infusão endovenosa de anfotericina B desoxicolato pode produzir febre, calafrios, tremores, vômitos, cefaleia e queda da tensão arterial. Tais efeitos podem ser minimizados com hidratação e administração de antieméticos, anti-histamínicos, anti-térmicos e hidrocortisona no momento da infusão (Catalán & Montejo, 2006; Neves *et al*, 2011).

A nefrotoxicidade é o efeito adverso mais relevante e limitador tanto de dose, quanto de tempo de tratamento, sendo reversível após suspensão da droga, mas a recuperação da função renal pode demorar semanas (Catalán & Montejo, 2006). Mais de 25% dos pacientes apresentam hipopotassemia e hipomagnesemia durante o tratamento. Outros efeitos colaterais observados

são: anemia normocítica normocrômica, tromboflebite no local da infusão e arritmias cardíacas.

A infusão da anfotericina B lipossomal está associada a poucos efeitos colaterais, permitindo doses diárias e totais maiores em menor tempo.

A dose recomendada do desoxicolato sódico de anfotericina B é de 1mg/Kg/dose, diariamente ou em dias alternados, até atingir as doses totais de 1-1,5g para as formas cutâneas e de 2,5-3g para a forma mucosa (SVS-MS, 2007).

Em relação à leishmaniose disseminada, não há recomendação especial quanto à dose ou ao tempo de tratamento.

As pentamidinas são aminas aromáticas, hipoglicemiantes, capazes de comprometer o metabolismo dos protozoários (Neves *et al*, 2011). São comercializadas sob duas formas: isotionato e mesilato.

O isotionato de pentamidina é completamente absorvido após administração parenteral, apresenta ampla distribuição nos tecidos e a eliminação se dá por via urinária (Costa, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso da pentamidina são: dor, induração a abscesso estéril no local da injeção, náuseas, vômitos, cefaleia, adinamia, tonturas, mialgia, hipotensão, hipo e hiperglicemia. Diabetes pode ser observado em dose acumuladas superiores a 1g (SVS/MS, 2007).

A miltefosina é um análogo da fosfatidilcolina, vem sendo utilizada para tratamento da Leishmaniose Visceral na Índia (Sundar *et al*, 2002); sua eficácia para o manejo a LTA do Novo Mundo está em estudo. Essa medicação foi desenvolvida com objetivos antitumorais e age inibindo a biossíntese de fosfolípídeo e esterol, no entanto o mecanismo de ação anti-*Leishmania* ainda não está bem esclarecido (Schraner *et al*, 2005).

A miltefosina é administrada em comprimidos, via oral, na dose de 2,5mg/Kg/dia, máximo de 150mg/dose, durante 28 dias. Os efeitos colaterais mais frequentemente observados são náuseas, vômitos e dor abdominal (Machado *et al*, 2010).

## IX. JUSTIFICATIVA

A LD é forma emergente e ainda insuficientemente descrita de LTA, associada, na maioria dos casos relatados na Bahia, à *Leishmania braziliensis*.

Em Corte de Pedra, foram diagnosticados 422 casos de LD no período de 1988 a 2011, compreendendo 2,6% dos casos de LTA acompanhados na região.

O acompanhamento dos pacientes no ambulatório de Corte de Pedra, Bahia, tem sugerido que a história da LD é associada a extenso envolvimento cutâneo e mucoso, muitas vezes, com lesões desfigurantes, de difícil tratamento e recidivas frequentes.

Estudos enfocando a imunopatogênese da LD tem mostrado a existência de resposta inflamatória tipo Th1, porém de menor intensidade quando comparada aos pacientes de LC. Podem contribuir para tal, características do hospedeiro, do parasita e do ambiente.

Assim é que a LD assume importância clínica pela gravidade do acometimento tegumentar, pela dificuldade no tratamento, pelo comprometimento da qualidade de vida dos pacientes e pelas questões de imunopatogênese que merecem ser mais estudadas.

## **X. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

Desenho do estudo: para a caracterização dos aspectos clínicos da leishmaniose disseminada foi realizado estudo de série de casos. Para a análise da resposta imune no sangue periférico e no tecido, foi realizado estudo de corte transversal. A caracterização da resposta terapêutica foi realizada por meio do estudo de coorte.

Área do Estudo: O distrito de Corte de Pedra pertence ao município de Presidente Tancredo Neves, cobre uma área de 8.000km<sup>2</sup>, estando localizado no sudeste do estado da Bahia, a 280 Km de Salvador, onde se situa o Serviço de Imunologia do Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES). Corte de Pedra está em região de Mata Atlântica, quase completamente desmatada para atividade de cultivo, porém ainda restam algumas poucas áreas de preservação. O Posto de Saúde de Corte de Pedra é movido por agentes de saúde, bastante familiarizados com a doença. Médicos, incluindo Otorrinolaringologistas, Dermatologistas e Clínicos visitam este posto de saúde regularmente. Nessas visitas, novos casos de LTA são diagnosticados, realizadas biópsias e avaliação imunológica dos indivíduos, bem como é feito o acompanhamento do tratamento da LTA. Este Posto de Saúde é referência para o diagnóstico e tratamento de LTA de 15 municípios vizinhos, num raio de 30 km (Presidente Tancredo Neves, Valença, Taperoá, Nilo Peçanha, Ituberá, Igrapiúna, Camamu, Teolândia, Wenceslau Guimarães, Gandu, Pirai do Norte, Nova Ibiá, Itamari, Ibirapitanga, Mutuípe). Anualmente, uma média de 700 pacientes foram acompanhados nessa unidade de saúde nos últimos 23 anos. Outras doenças como Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas) e Leishmaniose Visceral, que poderiam

interferir na avaliação imunológica e diagnóstica dos pacientes não são observadas naquela região. Desde 1984, o Posto de Saúde de Corte de Pedra tem servido como base de estudos sobre LTA.

População do estudo: para os objetivos específicos 1 e 2, foram acompanhados 121 pacientes com diagnóstico inicial de LD, atendidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, Município de Tancredo Neves, Bahia, no período de 2009 a 2011. Para os objetivos específicos 3 e 4 foram selecionados, 64 pacientes (32 com LC e 32 com LD) acompanhados nessa unidade nos anos de 1998 a 2001. Esses de 64 pacientes foram escolhidos pela disponibilidade de sangue e amostra de pele já processados.

Definição diagnóstica: leishmaniose disseminada caracteriza-se pela presença de ao menos 10 lesões distribuídas em dois ou mais segmentos corporais não contíguos. As lesões são pleiomórficas - pequenas placas, pápulas, exulcerações e lesões acneiformes - associadas ou não a lesões típicas de Leishmaniose Cutânea (Costa, 1986; Turetz, 2002). LC é caracterizada pelo aparecimento, no local da inoculação, de pápula eritematosa, que evolui para nódulo e posteriormente se ulcera, dando origem à apresentação clássica da doença: uma ou mais lesões ulceradas, de bordas elevadas e fundo granuloso, localizadas nas áreas expostas do corpo (Aguiar Pupo, 1946).

Critérios de inclusão: para os estudos de série de casos e de coorte foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de LD admitidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, Bahia, no período de 2009 a 2011. Para o estudo de corte transversal, foram incluídos 32 pacientes com diagnóstico de LD e 32

com diagnóstico de LC admitidos no mesmo serviço de saúde no período de 1998 a 2001.

Critérios de cura clínica: foram definidos como curados os pacientes que apresentaram desaparecimento das lesões, com reepitelização completa das úlceras até 90 dias do início do tratamento e sem sinais de recidiva por um período de 6 meses.

Caracterização Clínica: todos os pacientes atendidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra com diagnóstico clínico de LD submetidos à avaliação clínica dermatológica que constava de exame da pele, com contagem e caracterização das lesões, pesquisa de linfadenopatia e de envolvimento mucoso.

Avaliação laboratorial: foram avaliadas 109 intradermoreações de Montenegro (IDRM). Em 12 pacientes o registro desse exame foi perdido, seja porque a reação foi realizada em outro serviço e não tivemos acesso ao resultado, seja porque o paciente não compareceu no dia marcado para a leitura. Biópsia para PCR, cultura e/ou estudo histopatológico foi realizada em 65 pacientes. As amostras de tecido foram obtidas após anestesia local e coleta por meio de punch de 4mm, conservadas em formalina a 10% por, no máximo 24 horas e depois de desidratadas, colocadas em parafina; as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff. Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado para o isolamento do DNA de *Leishmania*. O DNA purificado foi re-suspenso em Tris-EDTA (TE) e conservado a -20°C até o momento da utilização. Detecção do subgênero *Viannia* foi feito por meio dos primers 5'-



GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3' e 5'-CTAATTGTGCACG-3'. Os fragmentos cutâneos obtidos foram inoculados em meio de cultura, entre 24°C e 26°C; a pesquisa das formas promastigotas de *Leishmania* foram realizadas a partir do quinto dia da inoculação.

Avaliação da resposta imune: foi realizada avaliação dos níveis séricos e da expressão tecidual de citocinas (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-10) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9, CXCL10).

- Produção *in vitro* das citocinas e quimiocinas, após estimulação: células mononucleares de sangue periférico foram obtidas a partir de sangue venoso heparinizado e separado por meio do gradiente de Ficoll-Hypaque, lavado e re-suspenso até a concentração de  $3 \times 10^6$  células/ml, em meio de RPMI 1640 com soro AB inativado pelo calor. As células foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* a 37°C, em CO<sub>2</sub> a 5%, durante 72 horas. O sobrenadante foi coletado e estocado a -70°C. As citocinas e quimiocinas foram medidas por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA e Pharmingen, San Diego, CA, USA).
- Expressão tecidual de citocinas e quimiocinas: amostras de biópsia da borda das úlceras de ambos os grupos de pacientes e das pápulas dos pacientes com LD foram congeladas num composto “Optimal Cutting Temperature Compound – O.C.T” Foi utilizado o método da avidina-biotina peroxidase, com anticorpos contra MIP-1 $\alpha$  (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), INF $\gamma$  (Genzyme, Cambridge, MA, USA), TNF $\alpha$  (Genzyme), TGF $\beta$ , CXCL9, IL-10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CCL11/eotaxina, CXCL10/IP-10 e CCL12

(PeproTech). As amostras de tecido foram incubadas, a 37°C, durante 90 minutos, com anticorpos-ponte biotinilados (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA e Santa Cruz Biotechnology). As lâminas de controle foram submetidas à incubação com IgG controle, em substituição aos anticorpos primários. A coloração foi feita com 3,30-diaminobenzóico (Vector Laboratories) e hematoxilina. As lâminas foram microfotografadas numa magnificação de 200 vezes e as áreas coradas, contadas usando Adobe Photoshop CS3, os resultados foram expressos em proporção, média e desvio padrão do número de área corada.

Análise estatística: Os dados foram armazenados em banco de dados criado no programa GraphPad InStat, mesmo software utilizado para o tratamento estatístico. Para a caracterização dos aspectos clínicos, foi utilizado o cálculo da média e desvio padrão. Para a avaliação das variáveis contínuas não paramétricas foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Para a avaliação de risco foram utilizados os Testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher. Foram considerados significantes níveis de  $p < 0,05$ .

Aspectos éticos: consentimento livre e esclarecido foi obtido dos pacientes com mais de 18 anos de idade e dos responsáveis pelos pacientes com menos de 18 anos (Anexo 2). O projeto do estudo foi aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 3).

## **ARTIGO 1**

“Disseminated Leishmaniasis: clinical, immunological and therapeutics aspects.” Drug Development Research 72:1-5, 2011

## Disease Overview

## Disseminated Leishmaniasis: Clinical, Immunological, and Therapeutic Aspects

Maria Elisa Alves Rosa and Paulo Roberto Lima Machado\*

Serviço de Imunologia, Hospital Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil 40110-160

Strategy, Management and Health Policy				
Enabling Technology, Genomics, Proteomics	Preclinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV

**ABSTRACT** Disseminated leishmaniasis (DL) is a distinct, severe, and emerging form of American tegumentary leishmaniasis. DL has been characterized by more than 10 multiple and pleomorphic cutaneous lesions, distributed in more than two noncontiguous parts of the body. Mucosal involvement is detected in up to 44% of cases. The development of the DL involves a complex and poorly understood network involving parasite, host immune response, and the environment, where *L. braziliensis* polymorphism plays a major role. A decrease in the type 1 immune response in the peripheral blood of DL patients appears to be caused by the attraction of *Leishmania*-activated T cells to the multiple cutaneous lesions. DL is a difficult to cure disease and failure to pentavalent antimony therapy is observed in at least 60% of cases. Drug Dev Res 72:437–441, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** disseminated leishmaniasis; *L. braziliensis*; immunopathogenesis; American tegumentary leishmaniasis

### INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a noncontagious infectious disease, caused by several *Leishmania* species; it can be associated with a spectrum of clinical forms: cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML), anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), and disseminated leishmaniasis (DL).

DL is an emergent and severe form of ATL, initially described in 1920 by Torres in Bahia, Brazil [Costa et al., 1986]. It has also been observed in other regions of Brazil and South America [Galvão et al., 1993; Ogawa et al., 2006; Calvopina et al., 2005]. DL has also been reported in the Old World [Alborzi et al., 2008]; some cases are associated with immunosuppression [Agostini et al., 1998; Schraner et al., 2005; Lindoso et al., 2009].

DL can be caused by several species of *Leishmania*, like *L. amazonensis* [Carvalho et al., 1994], *L. guyanensis* [Couppié et al., 2004], and *L. panamensis* [Calvopina

et al., 2005], but the main causative agent in the New World is *L. braziliensis* [Turetz et al., 2002].

The site of Corte de Pedra, located in the south of the state of Bahia, provides the opportunity to study the different clinical manifestations of *L. braziliensis* infection. For instance, *L. braziliensis* can cause CL, ML, DL, and atypical forms of ATL [Jones et al., 1987; Barral-Netto et al., 1995; Guimarães et al., 2009]. Periodic surveys in this region show that the frequency of DL has been increasing over the past few years. DL was considered a rare disease, responsible for 0.2% of cases of all ATL identified from 1978 to 1984 in this

Grant sponsor: Brazilian National Research Council (CNPq).

\*Correspondence to: Paulo Roberto Lima Machado, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Serviço de Imunologia, 5 andar, Rua João das Botas s/n, Canela 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil. E-mail: prlmachado@uol.com.br

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ddr.20450

endemic area [Jones et al., 1987]. However, from 1992 to 1998, this figure rose to 1.9% [Turetz et al., 2002]. More recently, we documented DL in more than 3% of ATL cases diagnosed in the Health Post of Corte de Pedra in the year 2009, indicating that DL is rapidly spreading in the region.

To understand the dynamics of the spread of DL, we mapped its distribution in our endemic area during 1993–2002. We found two peaks in the incidence of DL, the first associated with a clustering in the inner region around Corte de Pedra, and the second with a spread into the coastal region [Scheriefer et al., 2009].

### ETIOPATHOGENESIS

A complex and poorly understood network involving parasite, host immune response, and the environment is implicated in the development of DL.

#### Role of the Parasite and Host Immune Response

DL is a disease associated with *L. braziliensis* infection in the great majority of cases in Brazil. Although the first case reports of DL in Bahia showed *L. amazonensis* as well as *L. braziliensis* as the causative agents [Costa et al., 1986; Carvalho et al., 1994], during the last decades we only have isolated *L. braziliensis* from DL cases [Turetz et al., 2002]. In the endemic area of Corte de Pedra, the identification of a multiclonal *L. braziliensis* population structure showed that *L. braziliensis* genotypes are accompanied by specific disease manifestations, including DL [Schiefer et al., 2004; Leopoldo et al., 2006]. We found evidence that antigens prepared from genotypically distinct strains of *L. braziliensis* induce different degrees of immune response. For instance, *L. braziliensis* antigens derived from DL patients stimulates higher interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and (TNF $\alpha$ ) production than *L. braziliensis* antigens from CL patients [Leopoldo et al., 2006].

However, the evaluation of peripheral cytokine production in DL patients shows lower IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  production when compared with CL [Turetz et al., 2002], suggesting that a peripheral decrease in the type 1 immune response allows parasite growth and dissemination. Interestingly, in contrast to DCL, which is associated with a high in situ parasite load [Convit et al., 1972], *Leishmania* amastigotes are not readily found in DL lesions, and an absence of type 1 immune response against *Leishmania* antigens is not documented in DL [Carvalho et al., 1994; Leopoldo et al., 2006].

Data from in situ studies by our group show that lymphocytic infiltration and the expression of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL11, and CXCL10 do not differ among CL and DL, whereas CXCL9 is produced mainly by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from DL patients compared with CL

(unpublished data). CXCL9 is a chemokine induced by IFN $\gamma$  and associated with T-lymphocyte recruitment and proliferation [Whiting et al., 2004; Teixeira et al., 2006]. These data suggest that a decrease in the type 1 immune response in the peripheral blood of DL patients is attributable to the attraction of *Leishmania*-specific T cells to the multiple cutaneous lesions. Therefore, the preserved tissue immune response in DL may explain the absence or low number of parasites in the lesions, as well as the development of ulcers similar to that observed in CL.

The presence of DL cases in HIV carriers or immunosuppressed patients is reported in association with other *Leishmania* species [Agostini et al., 1998; Schraner et al., 2005; Lindoso et al., 2009]. We found no evidence for any type of immunosuppression in DL patients from the *L. braziliensis* endemic area of Corte de Pedra. This data favors the parasite's role in determining the outcome of ATL.

#### Role of the Environment

Adult males and agricultural workers are at higher risk of acquiring DL as compared with patients with localized CL [Turetz et al., 2002], suggesting that exposure to the parasite is associated with occupational activities in plantation fields located in previous Atlantic forest regions. The link of DL to specific exposures to occupational products or vectors is unknown and should be investigated.

More recently, we have documented an increasing number of DL cases in patients <18 years old, suggesting a pattern of peridomestic transmission of the disease.

### CLINICAL AND LABORATORIAL ASPECTS

DL is clinically different from CL and DCL. DL is defined by the presence of  $\geq 10$  mixed-type lesions (e.g., acneiform, papular, nodular, and/or ulcerated), located in  $\geq 2$  body parts (head, trunk, arms, and legs), and some patients present with hundreds of lesions all over the body (Figs. 1 and 2). The number of lesions may range from 10 to 800 [Carvalho et al., 1994; Turetz et al., 2002]. Many cases present a dissemination phase, in which a single initial lesion, usually in one extremity, is followed by disseminated lesions that may involve the entire body, after a period of few days up to 8 weeks. Most DL patients (55%) have widespread dissemination (legs, arms, trunk, and face) at the time of presentation, and all cases present lesions above the waistline [Turetz et al., 2002]. The rapid spread of the lesions and occurrence of systemic symptoms (fever, chills, malaise) in 50–75% of cases suggests direct hematogenic dissemination [Carvalho et al., 1994; Turetz et al., 2002]. Interestingly, some patients



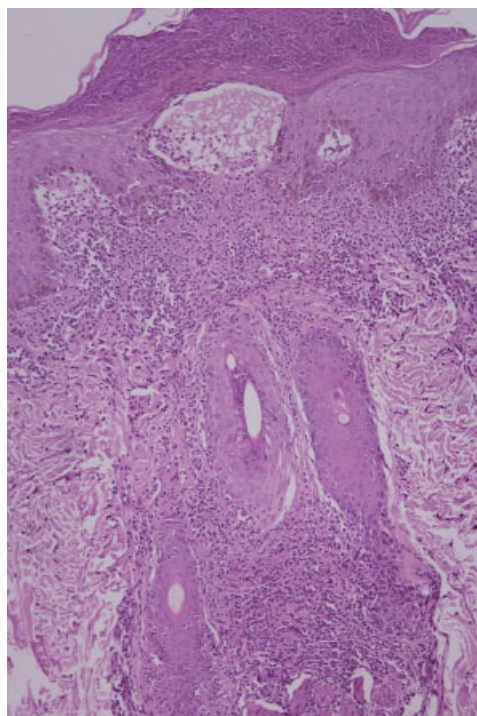
**Fig. 1.** DL patient with erythematous and hyperkeratotic papules and superficial nodules on the face, also presenting acneiform lesions in the thorax. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]



**Fig. 2.** DL patient presenting a leishmaniasis classical ulcer in lower limb (initial lesion) associated with multiple papules and acneiform lesions in the trunk. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

(25%) develop disseminated disease after initiation of treatment with pentavalent antimony ( $Sb^V$ ) for the initial localized lesion [Turetz et al., 2002]. A high frequency of nasal mucosal involvement is observed in DL and may vary from 29% [Turetz et al., 2002] to 38% [Carvalho et al., 1994] and up to 44% in a recent case series Figure 2.

The diagnosis of DL is based mainly on the clinical characteristics as described above. The intradermal leishmania skin test, along with histopathological aspects and parasite identification, can be used to confirm ATL



**Fig. 3.** Histopathology of a DL papular skin lesion caused by *L. braziliensis* stained by H&E.  $\times 20$ . Dermis with chronic inflammation rich in macrophages, lymphocytes, and plasma cells involving hair follicles. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

and to differentiate it from other clinical forms. The positivity of the leishmania skin test varies among the clinical forms of ATL. Whereas it has a sensitivity of 84–100% for CL and ML [Shaw et al., 1975], patients with DCL are negative [Convit et al., 1972]. In DL the Montenegro skin test can be positive or negative [Carvalho et al., 1994], with 67% of positivity in 36 patients tested (unpublished data). Additionally, the negativity of the leishmania skin test in DL cases is transitory and is restored after treatment [Carvalho et al., 1994]. DL histopathology shows a mononuclear infiltrate with a predominance of plasma cells. In some patients, a granulomatous reaction and few amastigotes are observed. The acneiform lesions show a follicular pattern, with an intense inflammatory infiltrate around the follicles [Carvalho et al., 1994] (Fig. 3).

The main differential diagnosis of DL is with anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) (Table 1). DCL is characterized by multiple infiltrating nodules and plaques resembling lepromatous leprosy, as well as by the absence of ulcers, no mucosal involvement, and a negative skin test for *Leishmania* antigen. The main causative agents of DCL are *L. aethiops* in the Old World and *L. amazonensis* in the New World [Bryceson, 1970; Convit et al., 1972].

**TABLE 1. Clinical, Histological, Parasitological, and Delayed-Type Hypersensitivity Response in DL and DCL**

	Disseminated leishmaniasis	Diffuse cutaneous leishmaniasis
Clinical picture		
Skin lesions	Acneiform lesions, papules	Infiltrated nodules and plaques
Ulcers	Present	Absent
Mucosal involvement	Up to 44% of cases	Absent
Parasite in tissue	Absent or few	Abundant
Leishmania species <sup>a</sup>	Mainly <i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. aethiops</i>
Montenegro skin test	Positive >60% of cases	Negative

<sup>a</sup>Immunocompetent host.

Co-infection with HIV/AIDS modifies the clinical presentation of CL caused by several *Leishmania* species. Thus, HIV-co-infected patients may present with multiple cutaneous lesions resembling DL or DCL associated or not with mucosal and visceral involvement [Nogueira-Castañón et al., 1996; Lindoso et al., 2009]. The presence of a disseminated phase associated with systemic symptoms and the presence of a mixture of multiple acneiform and papular skin lesions after an initial ulcerated lesion, along with parasite paucity in the infiltrate and a Montenegro positive skin test, favors the diagnosis of a “classical” DL in an immunocompetent host.

### THERAPEUTIC OUTCOME OF DL

DL is a difficult disease to cure and pentavalent antimonials (Sb<sup>v</sup>) in the form of meglumine antimoniate (Glucantime) in its highest dosage of 20 mg/kg/day, for 30 days, is used for treatment. More than 60% of cases will require more than one course of Sb<sup>v</sup> to cure [Turetz et al., 2002].

Amphotericin B is an alternative drug for cases where Sb<sup>v</sup> is not effective or cannot be used. We have successfully treated 9 DL patients refractory to Sb<sup>v</sup> therapy with desoxycholate amphotericin B. All patients were cured with a 3-mg/kg/dose, 3 times a week, with a total dose ranging from 650 mg to 1 g. However, the administration of Amphotericin B is limited in the rural setting by its toxicity and hospitalization requirement.

More recently, miltefosine, an oral drug active against several *Leishmania* species, cured a patient with DL that had failed to respond to previous Sb<sup>v</sup> and Amphotericin B therapy [González and Vélez, 2006]. The use of miltefosine in DL patients remains anecdotal and limited by its cost and unavailability in several countries, including Brazil. Therefore, DL remains a therapeutic challenge and much effort

remains to find a better therapeutic approach to this severe form of ATL.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Ednaldo Lima do Lago, Maria Neuza Lago, and Dr. Luiz Henrique Guimarães for patient's assistance in the endemic area; Dr. Sérgio Arruda for the histopathology photograph. PRLM is investigator of the CNPq.

### REFERENCES

- Agostini C, Dorigoni N, Malfitano A, Caggese L, Marchetti G, Corona S, Gatti S, Scaglia M. 1998. Mediterranean Leishmaniasis in HIV-infected patients: epidemiological, clinical and diagnostic features of 22 cases. *Infection* 26:93–98.
- Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhari M, Motazedian MH, Hatam GR, Kadivar MR. 2008. Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 79:435–437.
- Barral-Netto M, Machado P, Barral A. 1995. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. *Eur J Dermatol* 5:104–113.
- Bryceson ADM. 1970. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. Immunological studies and pathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 64:380–387.
- Calvopina M, Gomez EA, Uezato H, Kato H, Nonaka S, Hashiguchi Y. 2005. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 73:281–284.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 56:315–325.
- Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66:603–610.
- Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89:319–323.
- Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg* 71:558–560.
- Galvão CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa M do R, Costa JM. 1993. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania vianna braziliensis* in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 26:121–123.
- González LM, Vélez ID. 2006. Miltefosine for disseminated cutaneous leishmaniasis. *Biomedica* 26(Suppl 1):13–16.
- Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:712–715.
- Jones TC, Johnson WDJ, Barretto AC, Lago E, Marsden PD. 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis* 156:73–83.

- Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, de Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM. 2006. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis* 25:75–80.
- Lindoso JAL, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MIS, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H. 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 160:311–318.
- Nogueira-Castañón MC, Pereira CA, Furtado T. 1996. Unusual association of American cutaneous leishmaniasis and acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Dermatol* 35:295–297.
- Ogawa MM, Casseb Ruete L, Michalany N, Tomimori-Yamashita J. 2006. Disseminated cutaneous leishmaniasis, an emerging form of cutaneous leishmaniasis: report of two cases. *Int J Dermatol* 45:869–871.
- Schraner C, Hasse B, Hasse U, Baumann D, Faeh A, Burg G, Grimm F, Mathis A, Weber R, Günthard HF. 2005. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin Infect Dis* 40:e120–e124.
- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun* 72:508–514.
- Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, Ritt G, Góes-Neto A, Schriefer ALF, Riley LW, Carvalho EM. 2009. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15:871–876.
- Shaw JJ, Lainson R. 1975. *Leishmaniasis in Brazil*:X. 1975. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients from cutaneous and mucocutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69:323–335.
- Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22:32–40.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson Jr WD, Carvalho EM. 2002. Disseminated Leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186:1829–1834.
- Whiting D, Hsieh G, Yun JJ, Banerji A, Yao W, Fishbein MC, Belperio J, Strieter RM, Bonavida B, Ardehali A. 2004. Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J Immunol* 172:7417–7424.



## **ARTIGO 2**

“Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response.” Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene 105:438-444, 2011

Published in final edited form as:

Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011 August ; 105(8): 438–444. doi:10.1016/j.trstmh.2011.05.002.

## Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response

Paulo R. Machado<sup>a</sup>, Maria Elisa A. Rosa<sup>a</sup>, Diego Costa<sup>b</sup>, Moema Mignac<sup>a</sup>, João S. Silva<sup>b</sup>, Albert Schriefer<sup>a</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>c</sup>, Olivia Bacellar<sup>a</sup>, and Edgar M. Carvalho<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (CNPq/MCT), Salvador, BA, Brazil

### Abstract

Disseminated leishmaniasis (DL) is an emerging form of *Leishmania braziliensis* infection characterised by multiple cutaneous lesions on different parts of the body and a high rate of mucosal involvement. Systemic production of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  in DL patients is lower than in cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *L. braziliensis*, which may account for parasite dissemination due to the decreased ability to control parasite growth. In this study, the systemic and in situ immune response of DL and CL patients was characterised through evaluation of chemokine and cytokine production. In situ evaluation showed similar production of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), CCL3, CCL11 and chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10) in papular and ulcerative lesions from DL as well as in ulcerated lesions from CL. Serum levels of CXCL9, a chemokine that attracts T-cells, was higher in serum from DL than from CL. These data indicate that a decrease in the type 1 immune response in peripheral blood of DL patients is due to attraction of *Leishmania* antigen-activated T-cells to the multiple cutaneous lesions. This may account for the absence of or few parasites in the lesions and for the development of ulcers similar to those observed in CL.

© 2011 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author. Present address: Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, 5º andar, Rua João das Botas s/n, Canela 40110-160, Salvador, Bahia, Brazil. Tel.: +55 71 3237 7353; fax: +55 71 3245 7110. imuno@ufba.br, edgar@ufba.br (E.M. Carvalho).

**Authors' contributions:** PRM, OB, MEAR, AS, JSS and EMC designed the study protocol; PRM and MEAR carried out the clinical assessment; OB carried out the immunoassays and the systemic cytokine/chemokine determination; DC and MM carried out the in situ cytokine/chemokine determinations; AS carried out *Leishmania* isolation and identification; PRM, OB, DC, JSS, MM and MMT analyzed and interpreted the data; PRM, MEAR and OB drafted the manuscript; MMT, DC, JSS, AS, MM and EMC revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. EMC and PRM are guarantors of the paper.

**Conflicts of interest:** None declared.

**Ethical approval:** This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (Salvador, Brazil).

## Keywords

Disseminated leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; Cytokines; Chemokines; Immunopathogenesis; Cutaneous leishmaniasis

## 1. Introduction

Disseminated leishmaniasis (DL) is an emerging form of *Leishmania braziliensis* infection, distinguished by its unique clinical and immunological characteristics.<sup>1–3</sup> It is characterised by the presence of a great number of cutaneous lesions spanning more than one area of the patient's body, mixed types of skin lesions and a high frequency of mucosal involvement.<sup>2,3</sup> The patient typically reports a single initial lesion, usually on the extremities, followed by dissemination that may involve the entire body, sometimes associated with fever and chills. The importance of DL is outlined by the severity of the disease, therapeutic challenge and an increasing prevalence. Whilst in 1986 only 0.2% of all cases of *L. braziliensis* infection were DL, in 2000 this figure rose to 2%.<sup>2,3</sup>

DL is distinct from cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL).<sup>3–6</sup> The pathogenesis of DL is not established. In a small number of previously studied cases, we observed a higher frequency of patients with a negative skin test to *Leishmania* antigen<sup>1</sup> and a lower production in vitro of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  to *Leishmania* antigen than in patients with CL.<sup>3</sup> Therefore, a decrease in the T-cell response has been hypothesised to play a major role in parasite dissemination, and abnormal chemokine production may be associated with this phenomena. The role of chemokines linking innate to adaptive immunity and in recruiting inflammatory cells to tissue is well established, but remains unknown in DL. For instance, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and CCL3 are associated with antileishmanial activity,<sup>7</sup> and tissue expression of CCL2 is decreased in DCL.<sup>8</sup> It is clear that the majority of fresh acneiform lesions of DL disappear during the first course of antimony therapy,<sup>2</sup> but the majority of DL patients require more than a course of antimony therapy to cure and relapse may occur.<sup>3</sup> It is not known why a high failure rate to antimony therapy is observed in these patients. Host and parasitic factors may account both for dissemination and response to therapy. The aim of this study was to characterise better the systemic and tissue immune response in patients with DL compared with patients with localised CL. Cytokines [IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ) and IL-10] and chemokines [CCL2, CCL3, CCL11, chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) and CXCL10] were measured in peripheral blood, and tissue expression of these molecules was determined at the lesion site.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

This study included 32 DL patients recruited from 1998 to 2001 at the health post of Corte de Pedra, Bahia State, Brazil. The criteria for diagnosis were a clinical picture of DL as described below, in conjunction with parasite isolation by PCR or a positive skin test for *Leishmania* antigen plus histopathological features characteristic of leishmaniasis. DL was identified according to a case definition of ten or more mixed-type lesions (e.g. acneiform, papular, nodular and/or ulcerated), located on two or more body parts (head, trunk, arms and legs).<sup>3</sup> CL patients were matched by sex and age ( $\pm 5$  years) with DL cases. Although not matched by occupation, all DL and CL patients lived in the same endemic area where up to 70% of these patients are farm workers. Patients with CL were characterised by a typical ulcerated lesion with raised borders and had a maximum of three cutaneous lesions. DL and CL patients had a disease duration of 1–2 months. There was no clinical evidence of HIV

co-infection in CL or DL patients, and no patient had a positive HIV serology. DL patients were treated with i.v. pentavalent antimonial (Sb<sup>v</sup>) (meglumine antimony; Sanofi-Aventis, Paris, France), 20 mg/kg body weight daily for 30 days. Criteria for cure were complete involution of papular lesions and/or total scarring of ulcers 90 days after initiation of therapy. Informed consent was obtained from each participant.

## 2.2. Soluble Leishmania antigen (SLA)

SLA used for skin test and in vitro studies was prepared with an isolate of *L. braziliensis* as previously described.<sup>9</sup>

## 2.3. PCR for Leishmania

DNA isolation was carried out from biopsy samples using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Purified DNA was re-suspended in Tris-EDTA (TE) buffer and was stored frozen at -20 °C until use. Detection of the subgenus *Viannia* used the primers 5'-GGGGTTGGTGAATATAGTGG-3' and 5'-CTAATTGTGCACG-3'.

## 2.4. Evaluation of cytokine production

Levels of CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 $\alpha$ )/CCL3, CCL11/eotaxin, CXCL10/IFN $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10) and CXCL9/monokine induced by IFN $\gamma$  (MIG) were measured in the serum of 21 DL patients and 21 CL patients by ELISA.<sup>7</sup> For determination of cytokines and chemokines, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinised venous blood layered over a Ficoll-Hypaque gradient, then washed and re-suspended in complete medium (RPMI 1640 with 10% heat-inactivated pooled human AB serum) at a concentration of  $3 \times 10^6$  cells/ml. These cells were added to 24-well plates and were kept unstimulated or were stimulated with SLA (10  $\mu$ g/ml) for 72 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were then collected and stored at -70 °C. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 and IL-5 levels were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; and Pharmingen, San Diego, CA, USA). Serum levels of chemokines (CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 and CXCL10) were determined by ELISA.<sup>10</sup>

## 2.5. Evaluation of cytokine and chemokine expression in situ by immunohistochemistry

Skin biopsies from lesion borders of patients with localised CL and DL were frozen in O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Immunohistochemistry was performed using the avidin-biotin peroxidase method with mouse anti-human MIP-1 $\alpha$  (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), IFN $\gamma$  (Genzyme, Cambridge, MA, USA) and TNF $\alpha$  (Genzyme) and rabbit anti-human TGF $\beta$ , CXCL9 and IL-10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CCL11/eotaxin, CXCL10/IP-10, CCL12/MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  (PeproTech). After 90 min of incubation at 37 °C, slides were incubated with biotinylated goat anti-rabbit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. Staining was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories) and was counterstained with Mayer haematoxylin. Controls were performed by incubating slides with IgG isotype control instead of primary antibodies and proceeding as described above. The whole biopsy section areas were microphotographed with a final magnification of 200 $\times$  and brown-stained areas were counted using Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA) and ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Results are expressed as percent of biopsy area stained positive.

## 2.6. Statistical analysis

A Mann–Whitney test was performed for all continuous non-parametric variables. Data were statistically significant if the probability of a type I error was  $< 0.05$ .

## 3. Results

Demographic and clinical features of the 32 patients with DL are shown in Table 1. Patients were primarily adults and male, with a short duration of illness ( $< 60$  days) and had up to 412 lesions. The trunk and face were most commonly involved (Figure 1). *Leishmania braziliensis* was identified by PCR in 15 DL cases and in 12 CL cases. Histopathology showed absent or few parasites both in CL and DL lesions (data not shown). Failure after one course of Sb<sup>v</sup> therapy was observed in 22 (76%) of 29 DL patients.

### 3.1. Serum levels of chemokines

Serum levels of CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 and CCL11 were similar in the two groups of patients (Figure 2A). There was a trend for higher levels of CCL3 in CL ( $252 \pm 503$  pg/ml) than in DL patients ( $67 \pm 106$  pg/ml). The serum concentration of CXCL9 was higher in DL ( $3560 \pm 4683$  pg/ml) than in CL ( $1108 \pm 1061$  pg/ml) ( $P = 0.004$ ) and there was a trend for higher levels of CXCL10 in DL ( $661 \pm 634$  pg/ml) than in CL ( $448 \pm 330$  pg/ml) (Figure 2B). Data are given as mean  $\pm$  SD.

### 3.2. Analysis of cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from disseminated leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis patients

As shown in Figure 3A, the concentration of TNF $\alpha$  ( $112 \pm 188$  pg/ml, range 0–884 pg/ml) and IFN $\gamma$  ( $490 \pm 530$  pg/ml, range 0–1782 pg/ml) in supernatants of antigen-stimulated PBMCs from DL patients was lower ( $P < 0.0001$ ) than in supernatants of PBMC from CL patients ( $641 \pm 775$  pg/ml and  $1561 \pm 1166$  pg/ml, respectively). Undetectable concentrations of IFN $\gamma$  expressed as 0 pg/ml were only observed in 3 (9.4%) of 32 cases of DL. IL-5 and IL-10 levels were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in DL ( $54 \pm 61$  pg/ml and  $22 \pm 53$  pg/ml, respectively) than in CL patients ( $161 \pm 117$  pg/ml and  $44 \pm 62$  pg/ml) (Figure 3B). In all cases, the IFN $\gamma$  level was higher than IL-5 and IL-10 levels. Data are given as mean  $\pm$  SD.

In the present series, 44% of the patients with DL had mucosal involvement. However, different from the deep ulcers and nasal septum perforation observed in classical ML patients, the patients presented nodular and superficial ulcers. Previous studies comparing the immunological response in patients with ML and CL have shown that ML is characterised by high production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  and low production of IL-10.<sup>11–13</sup> Therefore, levels of these cytokines in patients with DL and mucosal lesions were compared with those without mucosal disease. Whilst there was no difference in IFN $\gamma$  production between these two groups of patients ( $665 \pm 538$  pg/ml vs.  $460 \pm 538$  pg/ml), production of TNF $\alpha$  by PBMCs from patients with DL with mucosal lesions was higher ( $191 \pm 275$  pg/ml) than in those without mucosal disease ( $93 \pm 211$  pg/ml) ( $P = 0.02$ ).

### 3.3. In situ chemokine and cytokine production in disseminated leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis

Tissue expression of CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9, CXCL10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 and TGF $\beta$  was analysed in the ulcerated lesions of CL patients and was compared with papular and ulcerated lesions from matched DL patients (Table 2). Among the chemokines, similar tissue expression was found both in DL and CL lesions, although there was a trend for a generally lower production in papular DL compared with ulcerated CL and DL. Expression of CXCL10 was higher in ulcerated DL lesions, although this was not significant (Figure 4).

Analysis of CXCL9 expression in the tissue was not possible due to cross-reaction of the antibodies leading to high background levels.

In situ expression of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 and TGF $\beta$  also showed a similar pattern, with a higher (non-significant) TGF $\beta$  expression in ulcerated DL (Table 2).

#### 4. Discussion

The host immunological response plays a pivotal role in the pathogenesis of tegumentary leishmaniasis. Whilst in CL and ML an exaggerated type 1 immune response is associated with tissue damage,<sup>12,13</sup> in patients with DCL an absence of cell-mediated immune response allows parasite multiplication and dissemination.<sup>14,15</sup> DL patients may present a hundred lesions and, compared with CL and ML, have a lower production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ .<sup>3</sup> Therefore, it has been suggested that a decrease in the peripheral production of Th1 cytokines may favour dissemination of the lesions in DL. Here we compared the systemic and tissue immune response in CL and DL. These data indicate that the tissue immune response observed in DL is similar to that detected in CL. As these patients present multiple lesions, it is likely that the majority of *Leishmania*-reactive T-cells are in the lesion, leading to a decrease in parasite antigen-specific T-cells in the blood and consequently decreased production of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  observed in PBMC cultures of DL compared with patients with CL.

The hypothesis that parasite dissemination in DL is associated with a decrease in type 1 immune response comes from studies that show a decreased production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in supernatants of PBMCs of DL in comparison with CL and also an absence of delayed-type hypersensitivity response to *Leishmania* antigens in some DL patients.<sup>3</sup> This hypothesis was supported by the role of the absence of type 1 immune response in DCL, the anergic form of CL, which is also associated with multiple cutaneous lesions.<sup>6</sup> However, DCL differs from DL in clinical, histopathological and immunological features. Specifically, in DCL the lesions usually do not ulcerate and histopathology shows an increase in macrophages with a high number of amastigotes inside the cells.<sup>6,14</sup> In DL the papular and acneiform lesions progress to ulcer, lymphocyte infiltration and granulomas are found, and an absence or low numbers of parasites are documented.<sup>2</sup> These histopathological findings are similar to those observed in CL. We confirmed here that IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  systemic levels are significantly lower in DL compared with CL. However, it is clear that the majority of these patients produce IFN $\gamma$  and some of them produce as much IFN $\gamma$  as patients with CL.

Chemokines play a relevant role in the migration of activated T-cells and are themselves induced by T-cell-derived cytokines. For example, CXCL9 and CXCL10 act on chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3), which are preferentially expressed on Th1 lymphocytes and are themselves induced by IFN $\gamma$ .<sup>7</sup> CXCL11 can induce production of IL-12 by dendritic cells, whereas CCL2 and CCL3 can attract monocytic cells and induce antileishmanial activity.<sup>7,16</sup> It has been shown that tissue expression of CCL2 is decreased in DCL in comparison with CL.<sup>8</sup> We found no differences regarding the in situ expression of cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) and chemokines (CCL2, CCL3, CCL11, CXCL10) comparing papular and ulcerated lesions of DL with the classical ulcerated lesion of CL. In the current series, CXCL9 levels were higher in DL compared with CL. Elevated levels of CXCL9 in the serum of DL patients contrast with the lower production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  by PBMCs of these same patients. However, it could indicate that *Leishmania*-specific T-cells were being recruited to the lesion site and were participating in the pathogenesis of the lesion, as pro-inflammatory cytokines are associated with tissue damage in *L. braziliensis* infection.<sup>12,13</sup>

Mucosal lesions were found in 44% of the DL patients in this study. ML is characterised by an increased secretion of TNF $\alpha$ ,<sup>13</sup> and treatment with pentoxifylline, a TNF $\alpha$  inhibitor, associated with antimony accelerates healing of ML.<sup>17</sup> Although DL patients produce lower levels of TNF $\alpha$  than CL and ML patients, it was shown here that systemic TNF $\alpha$  production in DL patients with mucosal lesions was higher than that observed in patients with DL without mucosal involvement. These data further support a role for TNF $\alpha$  in the pathogenesis of mucosal disease.

These data show that the tissue immune response in DL is similar to that observed in CL. It is possible that a transitory impairment of the T-cell response early in *Leishmania* infection may play a role in parasite dissemination. However, as the infection progresses, the local immune response is able to control parasite growth and only a few amastigotes remain in the lesion site. Later on, as a result of the local inflammatory response, the lesion becomes ulcerated.<sup>2</sup> The documentation that the histopathology of DL is similar to CL and characterised by lymphocyte and macrophage infiltration<sup>2</sup> supports this sequence of events not yet demonstrated. This study pointed out that other possibilities should be evaluated to explain the peculiar manifestation observed in this clinical form of leishmaniasis. First, because a down-modulation of the immune response is observed in the early phase of CL.<sup>18</sup> Second, because we recently showed that isolates of *L. braziliensis* from DL patients have genotypic and phenotypic differences compared with isolates from CL.<sup>19,20</sup> Therefore, the possibility that dissemination is due predominantly to parasite factors of *L. braziliensis* should be evaluated. Regarding the decreased levels of type 1 cytokines detected in supernatants of PBMCs from patients with DL, the current data argue in favour that it may be due to a low number of *Leishmania*-antigen specific T-cells in peripheral blood as these cells have been attracted to tissue in an attempt to kill parasites present in the multiple lesions observed in these patients. The presence of parasite antigen-specific T-cells at the lesion site explains the low parasite burden observed in DL as well as the in situ cytokine and chemokine profile similar to CL described here, which may explain the development of ulcerative lesions resembling what is found in CL.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Elbe Silva for secretarial assistance in the preparation of this manuscript as well as Ednaldo Lima do Lago, Maria Neuza Lago and Dr Luiz Henrique Guimarães for patient assistance in the endemic area.

**Funding:** This study was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and NIH grant # AI-30639. OB and PRM are investigators of the CNPq, and EMC is a senior investigator of the CNPq.

## References

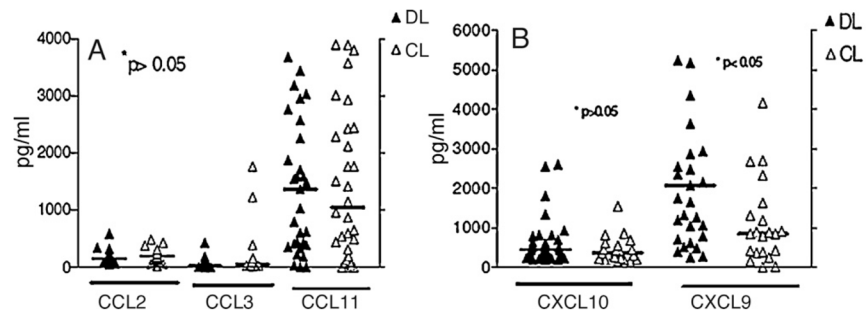
1. Costa JM, Marsden PM, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986; 89:319–23. [PubMed: 3806749]
2. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994; 56:315–25. [PubMed: 8023755]
3. 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; 186:1829–34. [PubMed: 12447770]
4. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80:859–76. [PubMed: 3037735]
5. Jones TC, Johnson WDJ, Barretto AC, Lago E, Marsden PD. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis.* 1987; 156:73–83. [PubMed: 3598227]

6. Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972; 66:603–10. [PubMed: 5071089]
7. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2006; 22:32–40. [PubMed: 16310413]
8. Ritter U, Körner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2002; 24:295–301. [PubMed: 12102714]
9. Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorenzo R, Lisboa A, et al. Selection of a specific skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 35:79–85. [PubMed: 3946739]
10. Teixeira AL Jr, Cardoso F, Souza AL, Teixeira MM. Increased serum concentrations of monokine induced by interferon-gamma/CXCL9 and interferon-gamma-inducible protein 10/CXCL-10 in Sydenham’s chorea patients. *J Neuroimmunol.* 2004; 150:157–62. [PubMed: 15081261]
11. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 1985; 135:4144–8. [PubMed: 4067312]
12. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31:143–8. [PubMed: 9686192]
13. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70:6734–40. [PubMed: 12438348]
14. 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; 34:474–9. [PubMed: 7591410]
15. Bomfim 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. [PubMed: 8932768]
16. Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2010; 126:389–96. [PubMed: 20206625]
17. Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:788–93. [PubMed: 17304449]
18. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1999; 180:1731–4. [PubMed: 10515843]
19. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes 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; 72:508–14. [PubMed: 14688132]
20. Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, Jesus AR, et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:75. [PubMed: 16638143]

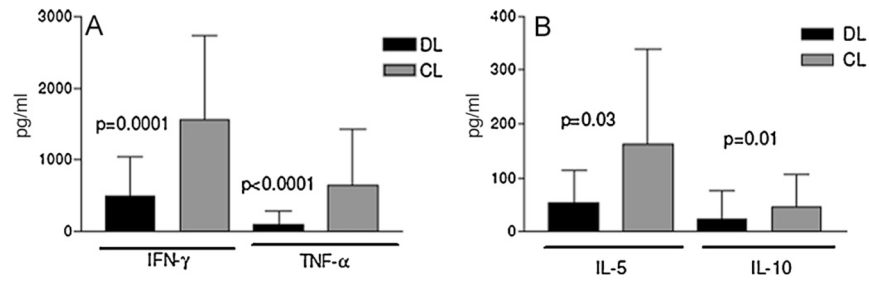




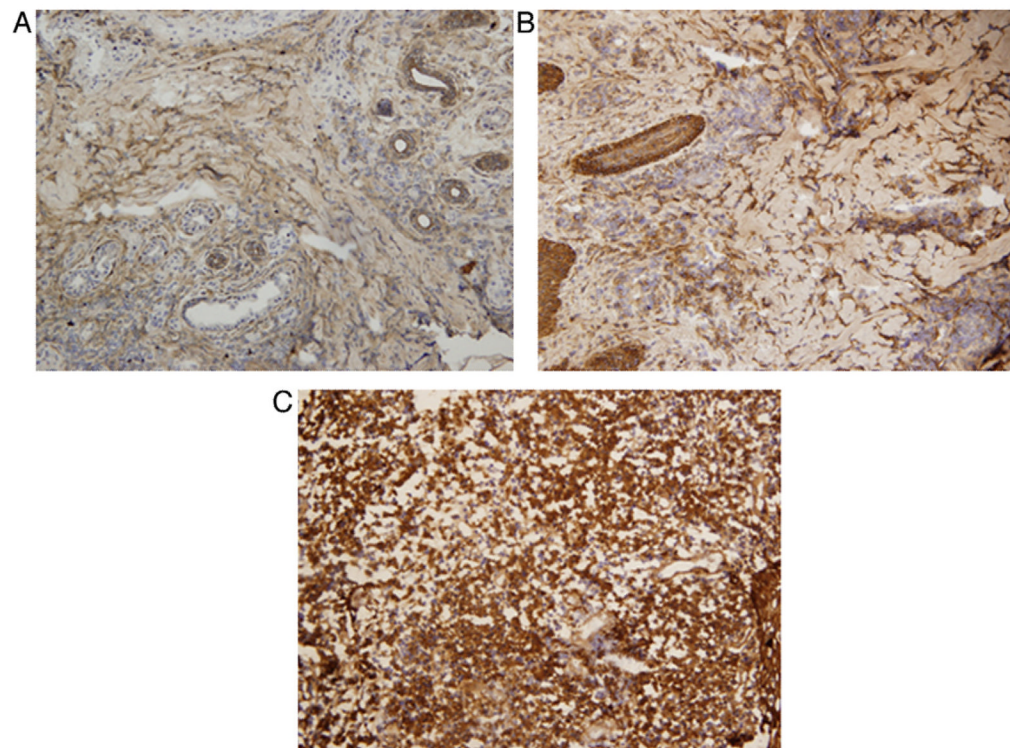
**Figure 1.**  
A disseminated leishmaniasis patient with intense facial and trunk involvement.



**Figure 2.** Chemokine production in 21 disseminated leishmaniasis (DL) and 21 cutaneous leishmaniasis (CL) patients: (A) chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 $\alpha$ /CCL3) and CCL11 production and (B) chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 production in serum were determined as described in Section 2.4. Chemokine levels were measured by ELISA. Symbols refer to data for individual patients and the horizontal bar indicates the median.



**Figure 3.** Cytokine profiles in 12 disseminated leishmaniasis (DL) and 8 cutaneous leishmaniasis (CL) patients: (A) IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  and (B) IL-5 and IL-10 production in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) supernatants stimulated with *Leishmania* antigen were determined as described in Section 2.4. Levels of cytokines were measured by ELISA. Data are given as mean (blocks)  $\pm$  SD (bars).



**Figure 4.** Tissue expression (% of stained area) of chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10) in cutaneous leishmaniasis (CL) and disseminated leishmaniasis (DL): biopsy section showing production of CXCL10 in (A) a CL ulcerated lesion, (B) a DL papule and (C) a DL ulcer (final magnification, 200 ×).

**Table 1**

Demographic and clinical findings of the 32 patients with disseminated leishmaniasis

<b>Characteristic</b>	
Age (years) (mean $\pm$ SD)	34 $\pm$ 15
Gender M:F ( <i>n</i> )	27:5
No. of lesions [median (range)]	61 (15–412)
Positive skin test [ <i>n</i> / <i>N</i> (%)]	25/30 (83)
Mucosal disease test [ <i>n</i> / <i>N</i> (%)]	14/32 (44)
Failure following one course of Sb <sup>v</sup> [ <i>n</i> / <i>N</i> (%)]	22/29 (76)

Sb<sup>v</sup>: pentavalent antimonial.

**Table 2**

In situ production of cytokines and chemokines in 8 cutaneous leishmaniasis (CL) and 12 disseminated leishmaniasis (DL) patients

Cytokine/chemokine (% of staining area) (median $\pm$ SD)	CL	DL papule	DL ulcer <sup>a</sup>
IFN $\gamma$	19.2 $\pm$ 10.5	18.7 $\pm$ 6.1	18.9 $\pm$ 11.9
TNF $\alpha$	14.2 $\pm$ 6.5	8.0 $\pm$ 10.4	13.3 $\pm$ 16.5
IL-10	21.5 $\pm$ 12.6	17.6 $\pm$ 4.2	22.7 $\pm$ 15.4
TGF $\beta$	16.8 $\pm$ 16.3	21.7 $\pm$ 8.8	35.9 $\pm$ 7.1
CCL2	27.9 $\pm$ 10.4	16.7 $\pm$ 3.9	22.8 $\pm$ 10.9
CCL3/MIP-1 $\alpha$	12.4 $\pm$ 7.9	19.5 $\pm$ 7.5	19.1 $\pm$ 15
CXCL10	17.6 $\pm$ 16.8	23.8 $\pm$ 3.4	23.1 $\pm$ 18.1
Eotaxin	25.8 $\pm$ 4.5	17.6 $\pm$ 5.9	23.8 $\pm$ 13

TGF $\beta$ : transforming growth factor-beta; CCL: chemokine (C-C motif) ligand; MIP-1 $\alpha$ : macrophage inflammatory protein 1-alpha; CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand.

<sup>a</sup>The *P*-value was > 0.05 when comparing the three groups.

## **XI. RESULTADOS:**

### Características Demográficas

Foram avaliados 121 pacientes com diagnóstico de LD no dia da admissão no Posto de Saúde de Corte de Pedra, nos anos de 2009 a 2011, correspondendo a 3,3% dos casos de LTA acompanhados no Serviço nesse período. Noventa e nove (82%) eram do gênero masculino e 22 (18%), do gênero feminino. A idade variou de 9 meses a 81 anos, com idade média de 35 +/- 16,8 anos (Tabela 6).

Cem pacientes (83%) eram lavradores e 21 (17%) eram estudantes (Tabela 6).

Tabela 6- Características demográficas dos 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011

<b>Características Demográficas</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
<b>Gênero*</b>		
<b>Masculino</b>	99	82
<b>Feminino</b>	22	18
<b>Idade</b>	35 (+/-17a - 9m-80a)	
<b>&lt; 18 anos</b>	101	83,5
<b>Adultos</b>	20	16,5
<b>Atividade</b>		
<b>Lavrador</b>	100	83
<b>Estudante</b>	21	17
<b>Total</b>	121	100

\*p > 0,05 Teste t

### Características Clínicas

Oitenta e três (68,6%) pacientes apresentaram lesão inicial ulcerada, de bordos elevados e fundo granuloso, localizada em área exposta, à qual se seguiram múltiplas lesões acneiformes, pápulas, pequenas placas e

exulcerações; sendo que a maioria dos pacientes apresentou entre 10 e 50 lesões cutâneas (Tabela 7).

Dos 46 pacientes que tiveram a mucosa nasal examinada, 23 (50%) apresentaram sinais de comprometimento mucoso por *Leishmania* (Tabela 7). As lesões mucosas observadas foram nódulos e úlceras superficiais – estágios I e II, nódulo sem ulceração e úlcera superficial, respectivamente (Lessa, 2012).

Tabela 7- Características clínicas de 121 pacientes portadores de Leishmaniose Dissemida, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011.

Características Clínicas	Menores de 18 anos		Adultos		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Úlcera inicial</b>						
<b>Presente</b>	12	60	71	70,3	83	68,6
<b>Ausente</b>	8	40	30	29,7	38	31,4
<b>Número de lesões*</b>						
<b>10-50 lesões</b>	16	80	60	61,2	76	64,4
<b>51-100 lesões</b>	2	10	11	11,3	13	11
<b>&gt;100 lesões</b>	2	10	27	27,5	29	24,6
<b>Envolvimento Mucoso**</b>	8/17	47	15/29	51	23/46	50
<b>Linfadenopatia***</b>	13	65	41	40,6	54	44,6

N: frequência absoluta % frequência relativa \*p>0,1 T. Qui-quadrado \*\*p>0,1 T. Exato de Fisher \*\*\*p=0,05 T. Exato de Fisher

Linfadenopatia foi observada em 54 (44,6%) pacientes; em 44 deles, apenas uma cadeia ganglionar foi envolvida, sendo a cadeia inguinal a mais acometida (Tabelas 7 e 8).

Não houve diferença significativa entre adultos e menores de 18 anos, quanto à apresentação clínica da doença.



Tabela 8 – Frequências absoluta e relativa de cadeias ganglionares envolvidas em 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011.

<b>Cadeia Ganglionar</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
<b>Cervical</b>	10	17
<b>Sub-mandibular</b>	1	1,73
<b>Axilar</b>	10	17
<b>EpitrocLEAR</b>	1	1,73
<b>Inguinal</b>	35	61
<b>Retro-auricular</b>	1	1,73
<b>Total</b>	57	100

Cinquenta e dois (43%) pacientes relataram sintomas sistêmicos durante o período de disseminação das lesões. Sensação de febre foi referida por 34 pacientes e mal-estar geral em 20 casos; em 6 casos não foi realizado o inquérito quanto à existência de queixas sistêmicas (Tabela 9).

Tabela 9 – Frequências absoluta e relativa de sintomas sistêmicos observados durante o período de disseminação em pacientes com Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011.

<b>Sintomas sistêmicos</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
<b>Presentes</b>	52	43
<b>Sensação de febre</b>	24	20
<b>Mialgia</b>	13	11
<b>Cefaléia</b>	7	5,8
<b>Anorexia</b>	9	7,4
<b>Mal-estar</b>	20	16,5
<b>Ausente</b>	63	52
<b>Sem registro</b>	6	5
<b>Total</b>	121	100

### Aspectos laboratoriais

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) foi positiva em 65% (79) dos pacientes: 63 adultos e 16 menores de 18 anos (Tabela 10). Em doze casos, o registro da IDRM não foi realizado, seja porque o exame foi feito em outra unidade de saúde e não se teve acesso ao resultado, seja porque o paciente perdeu o dia da leitura.

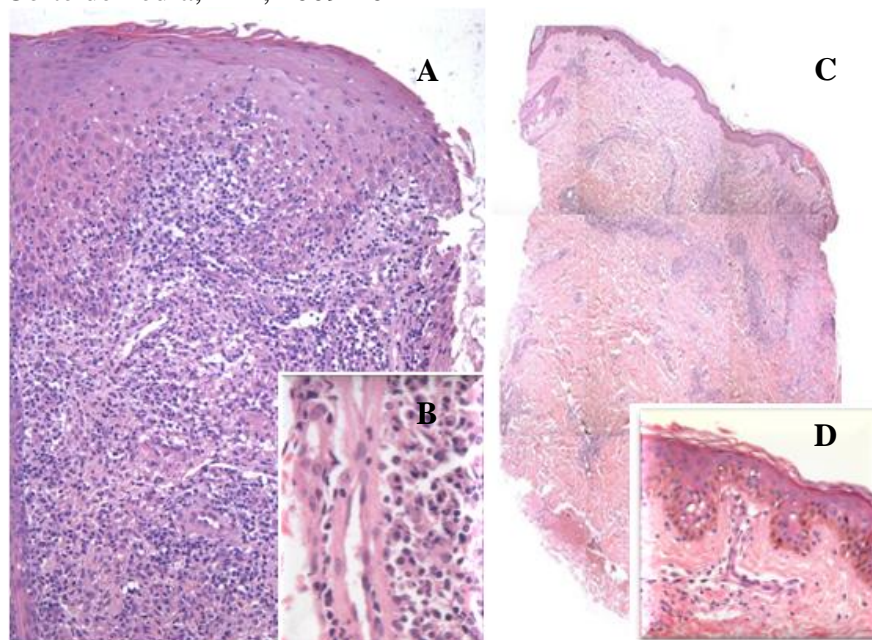
O parasita foi isolado e identificado como *L. braziliensis* em 63 dos 65 casos pesquisados (97%), por meio de cultura e/ou PCR (Tabela 10). Não foi observada outra espécie de *Leishmania*.

As biópsias mostraram epiderme com hiperqueratose, acantose, espongirose e exocitose de células inflamatórias. A derme apresentou infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, inclusive na região perivascular. Também foram observados macrófagos, células gigantes e granulomas (Figura 1).

Tabela 10- Aspectos laboratoriais em 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 2009-2011

Aspectos laboratoriais	Menores de 18 anos		Adultos		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Reação de Montenegro</b>						
<b>Positiva</b>	16	80	63	62,4	79	65
<b>Negativa</b>	2	10	28	27,7	30	25
<b>Sem registro</b>	2	10	10	9,9	12	11
<b>Identificação do parasita</b>	-	-	63/65	97	63/65	97

Figura 1 - Histopatologia da borda da úlcera e da pápula de 121 pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA , 2009-2011



LD: (A) hiperqueratose, acantose, exocitose de células inflamatórias; (B) e (D); infiltrado linfoplasmocitário perivascular; (C) focos de infiltrado inflamatório na derme

## Aspectos terapêuticos

Dos 121 pacientes acompanhados, 114 (94%) foram tratados com antimonial pentavalente. Quarenta e dois pacientes (36,8%) curaram somente com o antimonial pentavalente, 19 precisaram de mais de uma série da medicação (Tabela 11).

Falha terapêutica ao antimonial pentavalente foi observada em 33 (29%) dos casos. Os pacientes adultos apresentaram maior frequência de falência ao tratamento com a medicação, quando comparados aos pacientes com menos de 18 anos (Tabela 11).

Determinada a falha terapêutica ao antimonial pentavalente, foi utilizada a anfotericina B desoxicolato em 33 pacientes. Em todos esses casos foi observada cura clínica (Tabela 11). O critério para substituição do antimonial pentavalente pela anfotericina foi clínico: ausência de melhora de mais de 50% das lesões após a segunda série ou lesões graves, destrutivas que não responderam à primeira série do antimonial.

Em seis pacientes a anfotericina B lipossomal foi utilizada em monoterapia, na dose de 3mg/Kg/dia, durante 7 dias, com dose total de 21mg/Kg, com resolução da doença em todos os casos.

Em dois pacientes foi utilizada a miltefosina (2,5mg/Kg/dia, 28 dias): em um foi obtida cura, em outro foi necessária uma série de 30 dias de antimonial pentavalente para completa cicatrização das lesões.

Dois óbitos foram constatados durante o acompanhamento, mas não foi possível determinar se tais eventos tiveram relação com a doença ou com o tratamento.

Em dezembro de 2011, ao final do seguimento, 28 (23%) pacientes haviam abandonado as consultas e 9 (7,4%) ainda estavam em tratamento (Tabela 11).

Tabela 11- Resposta terapêutica ao antimonial pentavalente em 114 pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra - BA, 2009-2011.

Resposta ao antimonial	Menores de 18 anos (%)	Adultos (%)	Total (%)	Valor de p*
<b>Cura</b>	12 (63,1)	30 (31,6)	42 (36,8)	0,005
<b>1 série</b>	8 (42,1)	15 (15,8)	23 (20,2)	-
<b>2 séries</b>	2 (10,4)	13 (13,7)	15 (13,1)	-
<b>3 séries</b>	1 (5,3)	2 (2,1)	3 (2,6)	-
<b>4 séries</b>	1 (5,3)	-	1 (0,9)	-
<b>Falha terapêutica</b>	1 (5,3)	32 (33,7)	33 (29)	0,005
<b>Em tratamento ou perda de acompanhamento</b>	6 (31,6)	31 (32,6)	37 (32,5)	-
<b>Óbito</b>	-	2 (2,1)	2 (1,7)	-
<b>Total</b>	19 (100)	95 (100)	114 (100)	-

\*Teste Exato de Fisher

Não houve relação entre o número de lesões, linfadenopatia ou envolvimento mucoso com falência do tratamento com antimonial ou necessidade de anfotericina B (Tabela 12).

Tabela 12. Influência dos aspectos clínicos na resposta ao tratamento com antimonial pentavalente em pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Disseminada acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra – BA, 2009-2011.

Aspectos Clínicos	Cura com SB <sup>V</sup> /miltefosina	Resgate com anfotericina B	Risco	p
<b>Menores de 18 anos</b>	12	1		
<b>Adultos</b>	30	32	9,4	0,005*
<b>10-50 lesões</b>	50	15		
<b>51-100 lesões</b>	7	3		
<b>Acima de 100 lesões</b>	19	8	1,21	0,75**
<b>Lesão mucosa</b>	17	4		
<b>Sem lesão mucosa</b>	39	12	0,76	0,76*
<b>Linfadenopatia</b>	33	17		
<b>Sem linfadenopatia</b>	41	15	2,3	0,08*
<b>Montenegro pos.</b>	54	16		
<b>Montenegro neg.</b>	19	9	0,62	0,44*

\*Teste Exato de Fisher

\*\*Teste de Qui-quadrado

### Características imunológicas

Foram avaliados 32 pacientes com LD e 32, com LC, acompanhados no Posto de Saúde de Corte Pedra no período de 1998 a 2001.

Produção de citocinas e quimiocinas por células mononucleares no sangue periférico, após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL): os níveis de IL-5 e IL-10 foram significativamente menores nos pacientes com LD ( $54 \pm 61$  pg/ml e  $22 \pm 53$  pg/ml) quando comparados aos pacientes com LC ( $161 \pm 117$  pg/ml e  $44 \pm 62$  pg/ml); assim como os níveis de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Gráfico 3). Já a concentração de CXCL9 foi mais elevada nos pacientes com LD; a avaliação das demais quimiocinas não mostrou diferença (Gráfico 3). Não houve diferença significativa entre os pacientes com LD com e sem envolvimento mucoso, quanto à produção de IFN $\gamma$ , mas os níveis de TNF $\alpha$  foram mais elevados naqueles com lesão mucosa (Tabela 13).

Gráfico 3. Produção de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5 e IL-10 por células mononucleares de sangue periférico, após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada (DL) e Leishmaniose Cutânea (CL), 1998 – 2001.

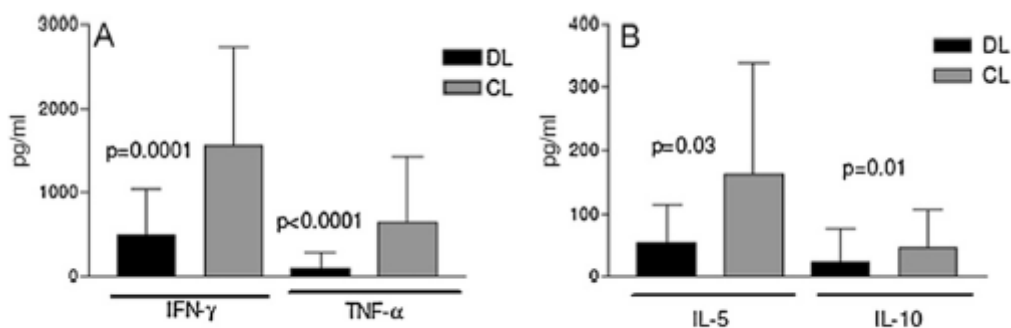


Gráfico 4. Produção de CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 e CXCL10 por células mononucleares de sangue periférico, após estímulo com antígeno solúvel de leishmania em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada (DL) e Leishmaniose Cutânea (CL), 1998 – 2001.

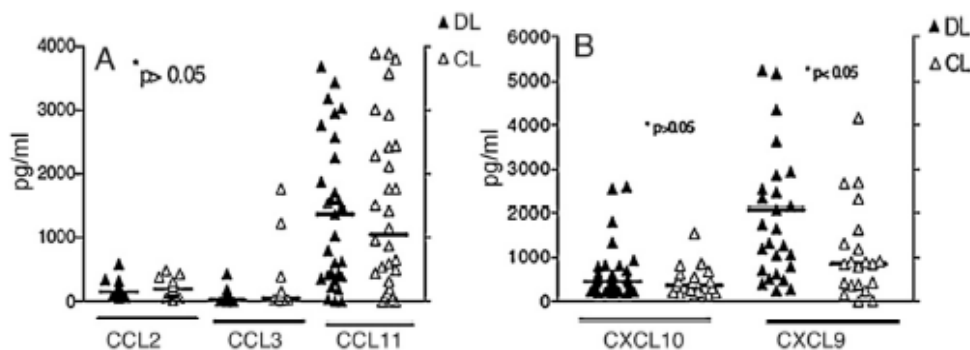


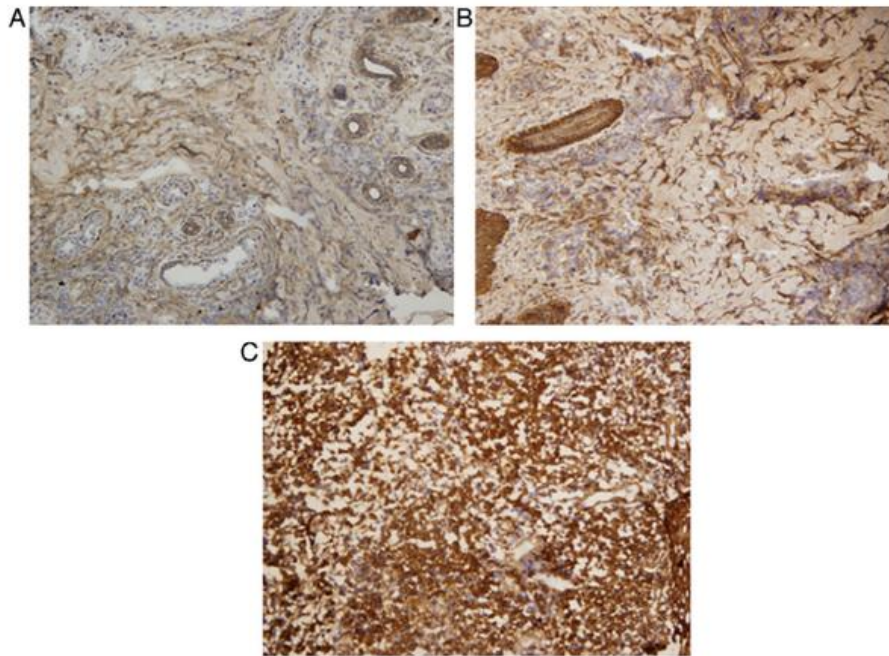
Tabela 13 - Produção de  $INF\gamma$  e  $TNF\alpha$  por células mononucleares de sangue periférico após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada, com e sem envolvimento mucoso, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA 1998 – 2001.

	Com lesão mucosa	Sem lesão mucosa	p*
<b><math>INF\gamma</math> (pg/ml)</b>	665 ± 538	460538	>0,05
<b><math>TNF\alpha</math> (pg/ml)</b>	191 ± 275	93 ± 211	0,02

\* Teste de Mann-Whitney

Produção tecidual de citocinas e quimiocinas: a expressão de CXCL10/IP-10 foi mais elevada nas úlceras dos pacientes com LD (Figura 2), no entanto, esse achado não foi estatisticamente significativo. Não foram observadas diferenças significantes nos níveis das demais citocinas e quimiocinas nas amostras extraídas das pápulas dos pacientes com LD e bordas das úlceras de ambos os grupos de pacientes (Tabela 14).

Figura 2 - Expressão tecidual de CXCL10/IP-10 em amostras de úlcera e pápula de pacientes com Leishmaniose Disseminada e Leishmaniose Cutânea, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA , 1998 – 2001.



Expressão tecidual medida por percentagem de área corada. (A) úlcera de LC; (B) pápula de LD; (C) úlcera de LD

Tabela 14. Produção tecidual de citocinas e quimiocinas em pacientes portadores de Leishmaniose Disseminada e Leishmaniose Cutânea, acompanhados no Posto de Saúde de Corte de Pedra, BA, 1998 – 2001.

<b>Citocinas e Quimiocinas*</b>	<b>LD (pápula)</b>	<b>LD (úlceras)</b>	<b>LC (úlceras)</b>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	18,7 $\pm$ 6,1	18,9 $\pm$ 11,9	19,2 $\pm$ 10,5
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	8 $\pm$ 10,4	13,3 $\pm$ 16,5	14,2 $\pm$ 6,5
<b>IL-10</b>	17,6 $\pm$ 4,2	22,7 $\pm$ 15,4	21,5 $\pm$ 12,6
<b>TGF<math>\beta</math></b>	21,7 $\pm$ 8,8	35,9 $\pm$ 7,1	16,8 $\pm$ 16,3
<b>CCL2</b>	16,7 $\pm$ 3,9	22,8 $\pm$ 10,9	27,9 $\pm$ 10,4
<b>CCL3/MIP-1<math>\alpha</math></b>	19,5 $\pm$ 7,5	19,1 $\pm$ 15	12,4 $\pm$ 7,9
<b>CXCL10/IP-10</b>	23,8 $\pm$ 3,4	23,1 $\pm$ 18,1	17,6 $\pm$ 16,8
<b>CCL11/eotaxina</b>	17,6 $\pm$ 5,9	23,8 $\pm$ 13	25,8 $\pm$ 4,5

\* percentagem de área corada, expressas por média e desvio padrão

p>0,05 quando os três grupos foram comparados

## **XII. RESUMO DOS RESULTADOS**

- 1- A Leishmaniose Disseminada permanece como forma emergente de Leishmaniose Tegumentar Americana, na região de Corte de Pedra, Bahia, Brasil.
- 2- Observou-se proporção considerável de pacientes menores de 18 anos, sugerindo uma aproximação do binômio parasita-vetor da região peridomiciliar.
- 3- É forma de difícil tratamento, sendo necessárias múltiplas séries de antimonial pentavalente ou associação com anfotericina B para cura.
- 4- Os aspectos clínicos possivelmente não influenciam na resposta terapêutica.
- 5- Não há diferença entre adultos e menores de 18 anos quanto à história clínica da doença.

Os pacientes com LD apresentam resposta Th1 semelhante aos pacientes com LC, porém deslocada para o território cutâneo, sugerindo que a resposta inflamatória tecidual esteja associada à exuberância do quadro clínico.



### **XIII. DISCUSSÃO:**

A cada ano, a frequência de casos novos de LD vem aumentando na região de Corte de Pedra (Jirmanus *et al*, 2012). Essa forma de LTA é de grande importância pelo extenso acometimento cutâneo e pela necessidade, em grande parte das vezes, de mais de uma série de antimonial ou da associação com anfotericina B para o tratamento, acarretando maior tempo de doença, comprometimento da qualidade de vida e da capacidade laboral do paciente.

As características demográficas – predominância de adultos, do gênero masculino, lavradores – seguem a tendência encontrada em todas as formas de LTA diagnosticadas na região de Corte de Pedra. No entanto, observamos uma frequência elevada de pacientes menores de 18 anos acometidos pela patologia, sugerindo a possibilidade de uma aproximação do trinômio parasita-vetor-hospedeiro do ambiente peri-domiciliar.

A história da doença é caracterizada pelo surgimento de lesão ulcerada, em área exposta. Dias a semanas depois, associam-se as lesões disseminadas: acneiformes, papulosas e pequenas exulcerações, conforme já observado em outros relatos (Carvalho *et al*, 1994; Turetz *et al*, 2002).

Na presente série, a mucosa nasal foi acometida em 50% dos casos. Estudos anteriores na mesma região, encontraram frequências semelhantes, variando de 29 a 48% (Carvalho *et al*, 1994; Turetz *et al*, 2002; Jirmanus *et al*, 2012), contrastando com os cerca de 3% de envolvimento mucoso observado por Jones *et al* (1987) e dos 1,2% contabilizados, no período de 1992 a 1998, por Turetz *et al* (2002) nos pacientes com LC. As lesões se apresentaram em estágios iniciais de gravidade, quando comparadas às úlceras profundas e a perfuração encontradas nos pacientes com LM (Marsden *et al*, 1994; Lessa *et*

al, 2012), sugerindo que a mucosa seria mais um local de envolvimento, sem denotar necessariamente maior intensidade da resposta inflamatória. Podem contribuir para o encontro de lesões menos destrutivas o aumento da frequência de casos de LD na região de Corte de Pedra associado ao trabalho de esclarecimento da comunidade quanto aos aspectos da doença, propiciando o diagnóstico mais precoce e a observação de lesões com tempo menor de evolução.

O teste de hipersensibilidade tardia para *Leishmania* varia conforme as diferentes formas clínicas de LTA; sendo positiva em 84 a 100% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa e negativa nos pacientes com LCD (Shaw *et al*, 1975). A Reação de Montenegro pode ser positiva ou negativa nos casos de LD (Guimarães *et al*, 2005); no presente estudo, foi observada uma frequência de positividade de 65% dos casos.

Características clínicas que pudessem sugerir maior gravidade ou menor responsividade ao tratamento, como maior número de lesões, mais de uma cadeia ganglionar acometida, lesão mucosa e negatividade na reação de Montenegro não interferiram no prognóstico. Não foram observadas diferenças entre adultos e menores de 18 anos quanto à evolução da doença.

Em todas as formas de LTA o padrão de resposta imune do hospedeiro desempenha papel central na apresentação clínica da doença.

Estudos iniciais sobre a imunopatogênese da LD mostraram que essa forma de LTA apresentava produção de  $INF\gamma$  e  $TNF\alpha$ , porém em níveis bem mais baixos quando comparados aos pacientes de LC (Turetz *et al*, 2002). Tais achados sugeriam que a disseminação se devia a uma falha na resposta imune do hospedeiro ao parasita.

Nesse estudo, confirmamos a observação de que a concentração sérica de  $INF\gamma$  e  $TNF\alpha$  é mais baixa nos pacientes portadores de LD, porém os níveis

elevados de CXCL9 – quimiocina relacionada à atração de linfócitos T ativados para o sítio de inflamação (Teixeira *et al*, 2006) - sugerem que haja um movimento dos linfócitos T específicos em direção aos tecidos, provavelmente na tentativa de controlar a multiplicação da *Leishmania*. Tal hipótese é compatível com o infiltrado linfocitário, com a formação de granulomas e com a escassez de parasitas observados nos exames histopatológicos da LD (Carvalho *et al*, 1994).

A semelhança na expressão de citocinas e quimiocinas nos tecidos aproxima ainda mais a imunopatogênese das formas disseminada e cutânea da LTA.

Assim, a presente série sugere que o perfil de resposta imune de ambos os grupos de pacientes é semelhante e as múltiplas lesões observadas nos pacientes de LD poderiam ser devidas à conjugação com outros fatores como características ambientais, do hospedeiro ou das diferentes sub-espécies de *L. braziliensis* (Leopoldo *et al*, 2006).

#### XIV. PROPOSTAS DE ESTUDO

1- Investigação do papel do parasita no desenvolvimento da LD: estudos realizados na região de Corte de Pedra têm demonstrado a existência de diferentes clones de *L. braziliensis* e que esses clones poderiam estimular graus variados de resposta imune (Leopoldo *et al*, 2006) e assim, estar associados às diferentes formas clínicas de LTA observados na região (Schriefer *et al*, 2004). Assim, propomos a pesquisa e identificação de clones de *Leishmania* associados à LD.

- Desenho do estudo: Corte Transversal
- População do estudo: pacientes com diagnóstico de LD
- Metodologia: realização de biópsia de pele para realização de PCR para identificação dos clones de *Leishmania*
- Análise estatística: a relação entre os diversos clones de *Leishmania* e LD será determinada por meio do Teste de Qui-quadrado

2- Associação dos níveis de citocinas e quimiocinas *in vitro* e *in situ* com prognóstico: avaliações das citocinas e quimiocinas realizados pelo nosso grupo mostraram que os pacientes de LD apresentam resposta imune tipo Th1 localizada nos tecidos. Propomos a avaliação do perfil dessas citocinas e quimiocinas e a evolução da doença.

- Desenho do estudo: Coorte
- População do estudo: pacientes com diagnóstico de LD
- Metodologia: coleta de sangue e amostra de pele para determinação da produção de citocinas e quimiocinas *in vitro* e *in*

*situ* associando-as ao tempo necessário para resolução das lesões, número de séries de antimonial pentavalente e necessidade de tratamento com anfotericina B

- Análise estatística: a análise de risco será feita por meio do Teste Exato de Fisher

3 Desenvolvimento de protocolo de tratamento: esse trabalho mostrou que 62% dos pacientes com LD necessitaram de mais de 1 série de antimonial ou da associação com anfotericina B para atingirem a cura. Ainda não existe uma padronização quanto aos critérios a serem utilizados na decisão terapêutica. A criação de um protocolo de tratamento proporcionaria uma otimização no uso das medicações e, principalmente, uma redução no tempo de tratamento com retorno mais precoce do paciente às suas atividades habituais.

- Desenho do estudo: ensaio clínico, randomizado
- Metodologia: pacientes clinicamente semelhantes serão comparados quanto à resposta aos diversos esquemas terapêuticos
- Análise estatística: os esquemas terapêuticos serão comparados quanto ao percentual de curados e o tempo necessário para a cura, através do Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

## **XV. CONCLUSÕES**

A Leishmaniose Disseminada é forma grave de Leishmaniose Tegumentar Americana, emergente na região de Corte de Pedra, Bahia, associada a extenso envolvimento mucoso e cutâneo, de difícil tratamento e caracterizada por resposta inflamatória Th1 concentrada nos tecidos.

## XVI. SUMMARY

### **Epidemiologic, Clinical, Immunologic and Therapeutic Aspects of Disseminated Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis***

Disseminated Leishmaniasis is a form of American Tegumentary Leishmaniasis, characterized by multiple and pleomorphic lesions distributed in more than two noncontiguous parts of the body. Important because it is emerging, severe and difficult to cure. **Objective:** description of the clinical, epidemiologic, immunologic and therapeutic aspects. **Study Design:** Series of cases, Transversal cut and Coorte. **Patients, Materials e Methods:** follow-up of 121 LD patients. *In vitro* and *in situ* expression of INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL5, IL10, CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 and CXCL10 were evaluated in 64 LD and Cutaneous Leishmaniasis (CL) patients. **Results:** adults, agriculturists men had more chances of acquire DL. Mucosal disease was observed in 50% of the cases, 64% presented 10 to 50 lesions, Montenegro skin test was positive in 65% and *Leishmania braziliensis* was identified in 97% of the patients. *In vitro* production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  were lower in DL patients. CXCL9 was higher in DL patients when compared with CL. *In situ* expression of cytokine and chemokine were similar in both forms. **Conclusions:** Cure was observed in 36,8% of patients using antimonial (Sb<sup>V</sup>); amphotericin B was used in 29%, with cure in all of them. Adults have more risk to treatment fail with Sb<sup>V</sup>. DL patients presented a type 1 immune response concentrated in the tissue.

**Keywords:** Disseminated Leishmaniasis, American Tegumentary Leishmaniasis, *L. braziliensis*

## **XVII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- 1- Agostini C, Dorigoni N, Malfitano A, Caggese L, Marchetti G, Corona S, Gatti S, Scaglia M. Mediterranean Leishmaniasis in HIV-infected patients: epidemiological, clinical and diagnostic features of 22 cases. *Infection*, 26:93-8, 1998.
- 2- Aguiar Pupo J.A. Estudo Clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista do Hospital das Clínicas*, 1:113-64, 1946.
- 3- Andrade BB, Boaventura V, Barral-Netto M, Barral A. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. *Gazeta Médica da Bahia*, 75(1): 75-82, 2005.
- 4- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho, EM. Polar e subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology*, 34(7):474-9, 1995.
- 5- Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, de Castro Figueiredo JF, Silva GF, Cimerman S, Bacha HA, Teixeira MC. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a study of four cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(6):713-9, 1999.
- 6- 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.) panamansis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73:281-4, 2005.
- 7- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 56:315-25, 1994.



- 8- Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23: 39-49, 2006.
- 9- Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE, Tacchini-Cottier F. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathogens*, 5;6(2), 2005.
- 10- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 84(2):255-60, 2011.
- 11- 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. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(6):319-23, 1986.
- 12- Costa, JML. O uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses. *Acta Amazônica*, 23(2-3):163-72, 1993.
- 13- Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5):558-60, 2004.

- 14- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 89(1):17-23, 1995.
- 15- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(5):511-2, 1992.
- 16- de Oliveira CI, Bafica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LA, Nascimento E, Costa JM, Barral A. Clinical utility of polimerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infection Diseases*, 37:e149-53, 2003.
- 17- Durant I, Beylot-Barry M, Weill FX, Doutre MS, Beylot C. Disseminated cutaneous Leishmaniasis revealing human immunodeficiency virus infection. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 131(11):947-51, 2004.
- 18- 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. *Clinical Infectious Diseases*, 34:E54-8, 2002.
- 19- Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), *Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas*. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, 319-28, 1994.
- 20- Galvão CE, Silva AC, Saldanha AC, Silva CM, Costa Mdo R, Costa JM. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 26(2):121-3, 1993.

- 21- González LM, Vélez ID. Miltefosine for disseminated cutaneous leishmaniasis. *Biomedica*, 26 Suppl 1:13-6, 2006.
- 22- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1):71-80, 2003.
- 23- Goto H, Lauletta Lindoso, JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2):293-307, 2012.
- 24- Grimaldi G, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1):37-42, 1996.
- 25- Guerra JA, Coelho LI, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida TM, Lacerda MV, Barbosa Md, Talhari S. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(3):524-7, 2011.
- 26- Guimarães LH, Machado PRL, Lessa HA, Lessa M, D'Oliveira Jr A, Carvalho EM. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia*, 75:66-74, 2005.
- 27- 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7):712-5, 2009.
- 28- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and Clinical Changes in American Tegumentary Leishmaniasis in na Area of *Leishmania (Viannia)*

- braziliensis* Transmission Over 20-Year Period. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3): 426-33, 2012.
- 29- Jones TC, Johnson WD Jr, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca F, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Journal of Infectious Diseases*, 156:73-83, 1987.
- 30- Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho E. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis in vitro cytokine production. *BMC Infectious Diseases*, 6:75, 2006.
- 31- Lessa, HA. Leishmaniose Mucosa: Aspectos Clínicos, Terapêuticos e Imunológicos. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, 86p., 1999.
- 32- Lessa HA, Lessa MM, Guimarães LH, Lima CM, Arruda S, Machado PR, Carvalho EM. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106(6):376-81. Epub May 11, 2012.
- 33- Lindoso JAL, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MIS, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British Journal of Dermatology*, 160:311-18, 2009.
- 34- Machado ES, Braga M da P, Da Cruz AM, Coutinho SG, Vieira AR, Rutowitsch MS, Cuzzi-Maya T, Grimaldi júnior G, Menezes JA. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by

- Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87(4):487-92, 1992.
- 35- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 21;4(12):e912, 2010.
- 36- 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(8):438-44, 2011.
- 37- Marzochi M, Marzochi K. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1(1): 91, 1994.
- 38- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 859-76, 1986.
- 39- Marsden, PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis L(V)b* in Três Braços, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27:93-101, 1994.
- 40- Moll H. The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Institute Mitteilungen*, 99:73-8, 1997.
- 41- Montenegro J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 13:187, 1926.

- 42- 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*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(6):1092-101, 2011.
- 43- Ogawa MM, Casseb RL, Michalany N, Tomimori-Yamashita J. Disseminated cutaneous Leishmaniasis, an emerging form of cutaneous leishmaniasis: report of two cases. *International Journal of Dermatology*, 45:869-71, 2006.
- 44- Posada-Vergara MP, Lindoso JA, Tolezano JE, Pereira-Chiocola VL, Silva MV, Goto H. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases* 15;192(10):1819-22, 2005.
- 45- Rincón MY, Silva SY, Dueñas RE, López-Jaramillo P. A report of two cases of disseminated cutaneous leishmaniasis in Santander, Colombia. *Revista de salud pública (Bogotá, Colômbia)* 11(1):145-50, 2009.
- 46- Ritter U, Körner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 24(6):295-301, 2002.
- 47- Schraner C, Hasse B, Hasse U, Baumann D, Faeh A, Burg G, Grimm F, Mathis A, Weber R, Günthard HF. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clinical Infectious Diseases*, 15;40(12):e120-4, 2005.
- 48- 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. *Infection and Immunity*, 72:508-14, 2004.
- 49- 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. *Journal of Experimental Medicine*, 168:1675-84, 1988.
- 50- 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. *Immunology Review*, 112:161-82, 1989.
- 51- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, Manual de Vigilância em Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição atualizada, 2007.
- 52- Shaw JJ, Lanson R. Leishmaniasis in Brazil: some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 69:323-35, 1975.
- 53- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100:525-34, 2005.
- 54- Silveira FT, Lainson R, Gomes CMD, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 31:423-31, 2009.

- 55- Sousa AQ, Pompeu MM, Sólón FR, Frutuoso MS, Teixeira MJ, Silva TM. Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10(3):230, 2006.
- 56- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 28;347(22):1739-46, 2002.
- 57- Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barra-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 22:32-40, 2006.
- 58- Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, Soong L. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and Immunity*, 78(1):301-8, 2010.
- 59- Vasquez RE, Soong L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infection and Immunity*, 74(12):6769-77, 2006.
- 60- Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *International Journal of Dermatology*, 47(9):926-32, 2008.
- 61- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11):3892-904, 2011.



# **ANEXOS**

# Anexo 1 – Prontuário do Posto de Saúde de Corte de Pedra

Centro de Referência em Leishmaniose Dr. Jackson M. L. Costa - Corte de Pedra, PTN, BA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (CID 10: 55.1)

## A. Parte Clínica

1. Data de preenchimento: \_\_\_\_\_ LTCP \_\_\_\_\_  
2. Identificação RG/CN \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_ Apelido: \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_ Educação: \_\_\_\_\_  
Gravidez? Sim Não Duração da gravidez: \_\_\_\_\_ Método para prevenção da gravidez: \_\_\_\_\_  
Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data de Nas.: \_\_\_\_\_  
Residência atual: \_\_\_\_\_  
Tempo de Moradia: \_\_\_\_\_ Referência \_\_\_\_\_

## Local de Contágio:

<i>Excluído o Paciente</i> Nº de familiares em casa: _____ Nº com leishmaniose tegumentar no passado e no presente: _____ Nº com leishmaniose tegumentar durante o ano passada: _____ Sintomas sistêmicos?: _____	<b>Doenças antecedentes?</b> Diabetes Sim Não Hipertensão Sim Não Doença cardíaca Sim Não Doença renal Sim Não
---	--

Alguma hipersensibilidade a medicamento? Sim Não Qual medicamento: \_\_\_\_\_

Linfadenopatia: Sim Não Duração: \_\_\_\_\_ Localização: \_\_\_\_\_

## 3. Exame Físico

PA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ P \_\_\_\_\_ R \_\_\_\_\_  
Tº \_\_\_\_\_ °C Peso \_\_\_\_\_ (kg) Altura \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_  
Localização e Tamanho das lesões e linfonodos

Lesão da pele: Sim Não Disseminada: Sim Não  
Nº lesões ulceradas: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_  
Nº lesões não ulceradas\*: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_  
Nº cicatrizes antigas: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_  
\* tipo de lesão: papulosa ( ), nodular ( ), verrucosa ( )  
SUS



Centro de Referência em Leishmaniose - Corte de Pedra LTCP \_\_\_\_\_

## 3. Exame Físico ORL (DATA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_)

Lesões mucosas ativas: Sim Não Duração: \_\_\_\_\_

Envolvimento:

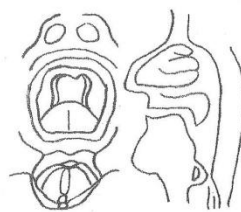
Nasal ( ) Bucal ( ) Faringe ( ) Laringe ( )

Outros: \_\_\_\_\_

Gravidade: Superficial Sim Não Profunda Sim Não

Estágio da lesão mucosa: I ( ) II ( ) III ( ) IV ( ) V ( )

Descrição do exame ORL: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



## B. Exames

### 1. Leishmaniose

	IDRM	
	Data	Leitura
1.		
2.		

	CULTURA	
	Data	Resultado
1.		
2.		

Histopatologia: Sim Não Pos Neg PCR (fonte: \_\_\_\_\_) Sim Não Pos Neg

### 2. Outros exames

PPD (Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_; Leitura \_\_\_\_\_) ECG Normal? Sim Não

Glicemia \_\_\_\_\_ B-HCG Pos Neg HIV Pos Neg outros: \_\_\_\_\_

Parasitológico de fezes	Data	Espécie	Data	Tratamento
1ª amostra				
2ª amostra				
3ª amostra				

Centro de Referência em Leishmaniose - Corte de Pedra LTCP \_\_\_\_\_

## C. Tratamento para leishmaniose

1. Terapêutica anterior com antimônio Sim Não Quando (ano) \_\_\_\_\_ Nº dias \_\_\_\_\_ Dosagem \_\_\_\_\_

Tratamento com outro medicamento? Sim Não Qual? \_\_\_\_\_

### 2. Terapêutica atual

Aplicador (a) do tratamento: \_\_\_\_\_

Agente de Saúde da área: \_\_\_\_\_

Data	Tratamento	Avaliação	Observação
	Peso do paciente (kg) _____ Droga: _____ Dosagem diária (ml): _____ Nº de dias: _____	Entrou num estudo? Sim Não Qual? _____	
	Peso do paciente (kg) _____ Droga: _____ Dosagem diária (ml): _____ Nº de dias: _____	<input type="checkbox"/> Cicatrização total <input type="checkbox"/> Cicatrização parcial <input type="checkbox"/> Úlcera ativa Tamanho: _____ <input type="checkbox"/> Lesões cutâneas novas: _____ <input type="checkbox"/> Lesões mucosas novas: _____ <input type="checkbox"/> Linfonodo presente Sim Não Tamanho: _____	Uso regular do tratamento: Sim Não Data do fim do tratamento: _____ Presença de efeitos secundários: Não Sim Descrever: _____
	Peso do paciente (kg) _____ Droga: _____ Dosagem diária (ml): _____ Nº de dias: _____	<input type="checkbox"/> Cicatrização total <input type="checkbox"/> Cicatrização parcial <input type="checkbox"/> Úlcera ativa Tamanho: _____ <input type="checkbox"/> Lesões cutâneas novas: _____ <input type="checkbox"/> Lesões mucosas novas: _____ <input type="checkbox"/> Linfonodo presente Sim Não Tamanho: _____	
	Peso do paciente (kg) _____ Droga: _____ Dosagem diária (ml): _____ Nº de dias: _____	<input type="checkbox"/> Cicatrização total <input type="checkbox"/> Cicatrização parcial <input type="checkbox"/> Úlcera ativa Tamanho: _____ <input type="checkbox"/> Lesões cutâneas novas: _____ <input type="checkbox"/> Lesões mucosas novas: _____ <input type="checkbox"/> Linfonodo presente Sim Não Tamanho: _____	

## Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal da Bahia  
Serviço de Imunologia  
Termo de Consentimento para investigação clínica

Título do Projeto: **RESPOSTA IMUNE E CO-INFECÇÃO VIRAL NA LEISHMANIOSE DISSEMINADA**

Paciente.....

Para ser lido por todos os adultos participantes do estudo e pelos responsáveis legais pelos menores participantes do estudo: As informações a seguir descreverão o estudo e a forma como você e o seu filho participarão. O investigador responderá quaisquer perguntas que você ou seu filho possam fazer sobre o estudo. Por favor, escute cuidadosamente e não hesite em perguntar qualquer coisa sobre as informações prestadas.

Propósito do Estudo: Nós estamos convidando você e/ou sua criança para participar de um estudo sobre a leishmaniose disseminada, que nós estamos fazendo no posto de saúde de Corte de Pedra. Esta doença é causada pela picada de um mosquito infectado e causa muitas lesões na pele. Nós estamos pedindo para você/sua criança participar deste estudo porque você/sua criança apresenta essa doença. Os objetivos deste estudo são caracterizar melhor as mudanças que esta infecção causa no seu organismo, avaliar se a infecção com os vírus HTLV e HIV podem ter associação com a apresentação desta forma de leishmaniose e verificar se existem fatores no seu dia-a-dia que possam estar relacionados à manifestação da doença. *HTLV e HIV são vírus que podem estar presentes no organismo, capazes de diminuir suas defesas contra as infecções.*

Procedimentos a serem seguidos : Se você/sua criança decidir participar voluntariamente depois de ler este consentimento, você responderá a um questionário sobre as características do seu dia-a-dia, serão colhidos 30 a 50 ml de sangue e será feita uma biópsia (retirada pequena amostra) de uma das suas lesões de pele. *Pequenos procedimentos, como a biópsia de pele, apresentam pequeno risco de complicação, como sangramento ou infecção local, todos de manejo fácil e para o qual a equipe de trabalho está preparada para conduzir.* Você receberá o tratamento já estabelecido para leishmaniose disseminada.

Sigilo: Pela sua participação neste estudo, há um risco que sua informação pessoal e médica seja conhecida por outros. Porém, nós faremos todo esforço para manter confidencial os achados de exame físico e as informações do prontuário médico; só você/sua criança, os profissionais do posto de saúde de Corte de Pedra e os médicos investigadores terão acesso a elas. Você /sua criança não será identificado em qualquer relatório ou publicações resultantes deste estudo.

Participação Voluntária: Sua participação ou de criança neste estudo é voluntária. Você/sua criança pode recusar a participar ou desistir da participação a qualquer momento que você/sua criança assim decidir. Sua recusa ou de sua criança em participar de todo o estudo ou em parte deste, ou sua decisão ou da criança de não mais participar do estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você precise no posto de saúde de Corte de Pedra. Isto também não vai prejudicar suas futuras relações ou de sua criança com o posto de saúde. Você/sua criança não terá qualquer custo extra neste estudo. Informação adicional pode ser obtida no Serviço de Imunologia do Hosp. Univ. Prof. Edgard Santos com Dr. Paulo Machado ou Dra. Maria Elisa. Tel: (71)3339-6234, (71)3237-7353, (71)87556865.

Contatos: Se você /sua criança tiverem qualquer outra questão sobre a sua participação ou de sua criança neste estudo ou sobre seus direitos e de sua criança como objeto de pesquisa , por favor contacte o Dr. Paulo Machado ou Dra. Maria Elisa, nos telefones acima.

Consentimento: Eu ouvi e entendi estas informações. Minhas perguntas foram respondidas. Eu voluntariamente consinto a participação:

Assinatura do Paciente

Data

Hora

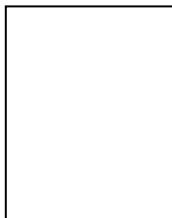


**Impressão do Polegar do Paciente**

Ouvi e entendi este formulário de consentimento, minhas perguntas foram respondidas. Consinto voluntariamente na participação da criança da qual sou o pai/mãe ou responsável legal:

---

Assinatura do Pai/ Mãe ou Responsável legal                      Data                      Hora



**Impressão do Polegar do Pai/ Mãe ou Responsável legal**

---

estemunha                      Data                      Hora

---

Assinatura do Investigadores                      Data                      Hora

## Anexo 3: Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do COM-HUPES

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA - HUPES

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** DETERMINANTES DO HOSPEDEIRO E DO PARASITO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA: RESPOSTA IMUNE PROTETORA E PATOLÓGICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Edgar Marcelino de Carvalho Filho

**Versão:** 1

**Instituição:** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

**CAAE:** 01229212.0.0000.0049

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 51639

**Data da Relatoria:** 21/06/2012

**Apresentação do Projeto:**

-

**Objetivo da Pesquisa:**

-

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

-

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

-

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

-

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

-

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

A aprovação foi feita mediante análise do projeto impresso, pois no período em que o projeto foi submetido e avaliado a Comissão do CEP-HUPES não tinha acesso a Plataforma Brasil.

SALVADOR, 06 de Julho de 2012

Assinado por:  
Roberto José da Silva Baduró

## Anexo 4: Publicações adicionais realizadas durante o período do doutorado

### **ARTIGO 3**

“The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil.” *Infection, Genetics and Evolution* 10(5):607-13, 2010

### **ARTIGO 4**

“American Tegumentary Leishmaniasis in Bahia.” *Nederlands Tijdschrift Voor Dermatologie en Venereologie* 20(10): 645-50, 2010

### **ARTIGO 5**

“Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(3):426-33, 2012