

CARACTERÍSTICAS DAS LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E NÍVEIS SÉRICOS DE TNF- α

Thayanne Guerreiro Sá BEZERRA¹
Thais Tibery ESPIR²
Antonia Maria Ramos FRANCO³

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; Co-Orientadora: CAPES/INPA; ³Orientadora CSAS/INPA

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa não contagiosa, que acomete pele e/ou mucosa. Constitui uma enfermidade polimórfica da pele, caracterizada pela existência de uma variedade de formas clínicas, variando de lesões auto resolutivas a lesões desfigurantes (Silveira *et al.* 2004; 2009). Na Amazônia brasileira, a LTA é causada por sete espécies de *Leishmania*, sendo *Leishmania (Viannia) guyanensis* a de maior incidência no estado do Amazonas (Figueira 2008; Guerra *et al.* 2011). Fatores relacionados à capacidade vetorial, ao parasita e a constituição genética e imunológica do hospedeiro estão relacionados às diferentes formas clínicas encontradas no curso da infecção (Reis *et al.* 2006; Roberts *et al.* 2000). A resistência do hospedeiro está associada à ativação seletiva e diferenciação das células efectoras, as quais secretam um padrão de citocinas específico. O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e desempenha papel crucial na resposta imune de fase aguda da doença (Bilate 2007). Na LTA o TNF- α tem sido associado ao controle da infecção, pois é produzida principalmente por células que ativam macrófagos (Abbas *et al.* 2009) e levam a destruição parasitária (Reis *et al.* 2006; Carvalho 2012). O conhecimento dos fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro humano no curso da LTA tem contribuído para entender a patogênese da doença, sendo assim, este trabalho teve como objetivo geral analisar as diferentes características cutâneas e os níveis séricos de TNF- α no soro de 13 indivíduos infectados *por Leishmania (Viannia) guyanensis* comparado a indivíduos sem infecção (grupo controle).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e Origens dos isolados humanos : Neste projeto foram incluídos 13 pacientes que aceitaram participar da pesquisa, residentes em Rio Preto da Eva-AM, atendidos no Hospital Regional Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão localizado no KM135 da AM 010. Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, com diagnóstico clínico-parasitológico positivo para LTA, na forma cutânea. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INPA, com protocolo número 006/2.010.

Exames Parasitológicos e Isolamento Parasitário: Todos os pacientes foram submetidos a exame direto por escarificação da borda das lesões cutâneas para pesquisa de formas amastigotas em lâminas, utilizando-se corante Panótico e microscopia óptica. O material escarificado da borda das lesões foi semeado em meio de cultivo ágar sangue NNN (Neal *et al.*) e posteriormente expandido em meio líquido Schneider completo (pH 7,2 contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado), para preparação de massa parasitária utilizada na caracterização bioquímica e criopreservação.

Deteção de citocinas nos soros de pacientes infectados: Foi dosado a citocina (TNF- α) em amostra do soro de pacientes infectados e em indivíduos não infectados (controle negativo). Para dosagem da citocina TNF- α , foi utilizada a técnica de citometria de fluxo CBA (Cytometric Bead Array) com o "Kit BDTM Human T_H1/T_H2 Cytokine" (Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD® Biosciences, San Diego, CA, USA) seguindo as orientações descritas pelo fabricante. Para análise estatística foi realizada utilizando o software *Graphpad Prism*® 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico dos casos suspeitos de leishmaniose foi baseado nos dados epidemiológicos e exame clínico, associados à positividade de um dos exames laboratoriais. Todos os pacientes envolvidos na pesquisa apresentavam primo-infecção causada por *L. (V.) guyanensis*. Do total dos 13 pacientes, 11 eram do sexo masculino (84%) e 2 do sexo feminino (15%), a idade variou de 18 a 55 anos, apresentando de 1 a 8 lesões. O tempo de evolução das lesões variou de 14 a 150 dias e o tamanho das lesões foi bastante variável (8x5 e 30x20 mm) conforme observado na tabela 1.

Tabela 1. Dados clínico-epidemiológicos de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar atendidos no Hospital Regional Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão.

Código da amostra	Sexo	Idade (anos)	Tempo de Infecção (dias)	Nº de lesões	Tamanho da Lesão (mm)	Característica das lesões
MHOM/BR/08/IM5515	M	55	20	07	30x20	Lesão em placa
MHOM/BR/09/IM5595	M	21	30	01	12x15	Nodular
MHOM/BR/10/IM5637	F	31	60	01	17x18	Lesão em placa
MHOM/BR/10/IM5653	M	18	90	01	30x20	Úlcera franca
MHOM/BR/10/IM5694	M	29	14	01	20x23	Nodular
MHOM/BR/11/IM5697	M	19	14	01	13x16	Lesão em placa
MHOM/BR/11/IM5772	M	26	120	01	10x8	Lesão em placa
MHOM/BR/11/IM5773	M	30	10	01	32x21	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5775	M	24	21	04	8x5	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5828	M	43	150	01	11x8	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5869	M	24	60	08	60x60	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5874	F	23	120	01	80x14	Úlcera franca
MHOM/BR/11/IM5875	M	49	30	01	11x7	Lesão em placa

Legenda: Isolados: M- mamífero; HOM- *Homo sapiens*; BR-país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; Sexo: M- masculino; F- feminino. Pacientes que apresentaram mais de uma lesão foi incluído o valor da lesão de maior tamanho. ⁺=baseado em Naiff *et al.* (2009).

Diferentes formas clínicas das lesões foram observadas na população estudada; conforme observado na Figura 1. Lesões do tipo úlcera franca, foram as mais encontradas (39%) e se caracterizam por úlcera com bordas elevadas, em moldura, fundo granulomatoso, com ou sem exsudato e em geral são indolores, seguido de lesão em placa (46%) que se caracteriza por bordas elevadas em relação ao tecido normal, sua altura é pequena em relação à extensão, consistente a palpação e com superfície lisa. Dois pacientes (15%) apresentaram lesões do tipo nodular eritematoso com bordas inflamatórias (forma hipodérmica nodular não ulcerada). As diferentes formas clínicas descritas podem estar relacionadas ao padrão de transmissão, a espécie envolvida, ao estado nutricional do hospedeiro, fatores genéticos e o perfil de resposta imune dos indivíduos (Castro 2011).



Legenda (A-C): A-Úlcera franca; B- Lesão em placa; C- Nodular.

Figura 1. Características clínicas (forma cutânea) da leishmaniose tegumentar em Rio Preto da Eva/AM.

A figura 2 apresenta os níveis séricos de TNF- α , em amostra de soro dos 13 pacientes com Leishmaniose cutânea (LC) e em cinco indivíduos sem infecção (controle negativo). Na análise comparativa entre indivíduos infectados e não infectados observou-se diferença estatística significativa nos níveis séricos de TNF- α ($p < 0,0016$), demonstrando maior presença desta citocina durante processo infeccioso. Embora, os níveis séricos de TNF- α expresso no soro dos pacientes com lesão em placa ter sido maior do que o observado nos pacientes com os outros tipos de lesões (úlcera franca, nodular) não foi encontrado diferença estatística significativa na comparação entre tipos de apresentação clínica da doença.

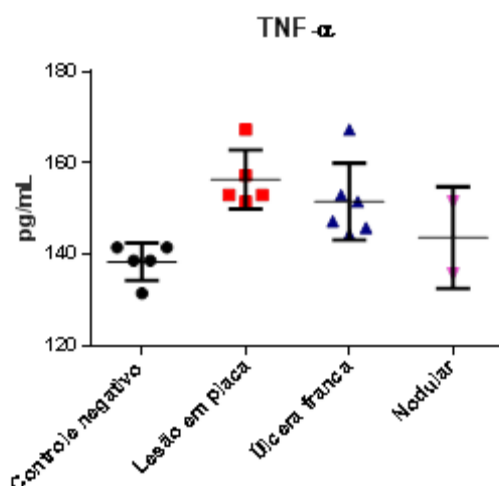


Figura 02. Níveis séricos TNF- α em amostra do soro de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e população não infectada. São apresentados os resultados individuais e valores médios \pm desvio padrão (linhas horizontais e verticais).

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização e controle da infecção. A Interleucina gama (IFN- γ) tem papel importante na defesa contra microrganismos intracelulares como na *Leishmania*, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Campos, 2007). Com ativação de TNF- α , a indução da resposta inflamatória, no curso clínico da doença promove proteção aos tecidos, restringindo assim os danos no local da infecção (Bilate 2007). Contudo, a produção excessiva dos níveis séricos dessa citocina pró-inflamatória leva a um processo inflamatório intenso, podendo acarretar em efeitos prejudiciais ao hospedeiro, corroborando para manifestações clínicas (Reis *et al.* 2006). Portanto, os resultados dos níveis séricos do TNF- α obtidos em população residente de área endêmica, como no caso do Amazonas, têm colaborado para elucidar o perfil imunológico do hospedeiro humano frente ao parasita e controle e resolução da doença.

CONCLUSÃO

Ficou demonstrada a presença de maior expressão de TNF- α em indivíduos com infecção ativa por *L. (V.) guyanensis* quando comparado a indivíduos não infectados. Diferentes apresentações clínicas da doença foram observadas na infecção causada pela mesma espécie do parasita. Não houve correlação entre os níveis séricos de TNF- α e as distintas formas cutâneas apresentadas pelo grupo infectado.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S.I. 2009. *Imunidade contra micróbios*. Imunologia Celular & Molecular. Revinte RC. Ed_3, Rio de Janeiro, 16. ISBN 85- 7309-364-1.
- Bilate, B. 2007. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*, 8: 2.
- Campos, M.R. 2007. *Caracterização molecular de antígenos de Leishmania (Leishmania) chagasi Potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Ciências, na área de concentração: Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos. Recife. 25pp.
- Figueira, L. de P.; Zanotti, M.; Pinheiro, F.G.; Franco, A.M. 2008. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41(5): 512-514.
- Guerra, J.A.O.; Coelho, L.I.R.C.; Pereira, F.R.; Siqueira, A.M.; Ribeiro, R.L.; Miranda, T.L. *et al.* 2011. American Tegumentary Leishmaniasis and HIV-AIDS Association in a Tertiary Care Center in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(3): 524–527.
- Reis, L.; Brito, M.; Souza, M.; Pereira, V. 2006. Mecanismos Imunológicos na Resposta Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Atualização*, 35: 103-115.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil- A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 239-251.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Castro Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P. 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 31: 423-431.