

## DETECÇÃO DE PARASITAS EM LESÕES CICATRICIAIS APÓS CURA CLÍNICA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO AMAZONAS, BRASIL.

Renata Wanderley NOGUEIRA<sup>1</sup>; Francimeire Gomes PINHEIRO<sup>2</sup>; Luanda de Paula FIGUEIRA<sup>3</sup>  
Antonia Maria Ramos FRANCO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/INPA; <sup>2</sup>Co-orientadora CPCS/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora CPCS/INPA; <sup>4</sup>Orientadora CPCS/INPA

### 1. Introdução

As leishmanioses são, na maioria das vezes, zoonoses infecto-parasitária que afetam várias espécies de animais silvestres, domésticos e o homem, apresentando clinicamente um caráter multifacetado (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993). Esta doença infecciosa não-contagiosa requer uma maior atenção principalmente no que se refere ao padrão de cura da mesma, que atualmente é eminentemente clínica, considerando-se curado o paciente que apresenta sua lesão totalmente cicatrizada. Muitos casos são diagnosticados clinicamente pelo aspecto da lesão. Para se evitar a ocorrência de enganos no diagnóstico, estes podem ser reduzidos com o auxílio dos métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (Silveira *et al.*, 1999). Atualmente, a utilização da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) vem auxiliando na detecção de casos de difícil diagnóstico, principalmente no que se refere à forma mucosa, causada pela *Leishmania braziliensis* (Vianna, 1911) Matta, 1916 e casualmente, por contiguidade pela *L. guyanensis* (Floch, 1954).

O objetivo deste estudo foi detectar a ocorrência de parasitos em cicatrizes de lesões cutâneas causadas pela Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em pacientes clinicamente curados, oriundos de áreas endêmicas do Estado do Amazonas e atendidos pela demanda espontânea no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Também foi realizado o diagnóstico da permanência de infecção e tentativa de isolamento em cultivo de flagelados que ainda estivessem viáveis nas cicatrizes cutâneas de pacientes que haviam sido diagnosticados com LTA e recebido tratamento, comprovando-se assim que a cura parasitológica nem sempre é sinônimo de cura clínica.

### 2. Material e métodos

Foram avaliadas cicatrizes únicas de 10 pacientes com idade acima de 18 anos diagnosticados para LTA e com no mínimo 1 (um) ano após tratamento, oriundos do Município de Rio Preto da Eva (Amazonas/Brasil), independente do sexo e do tratamento farmacológico a que foram submetidos. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do INPA (processo nº 191, 02/2009), para seleção e exame dos pacientes.

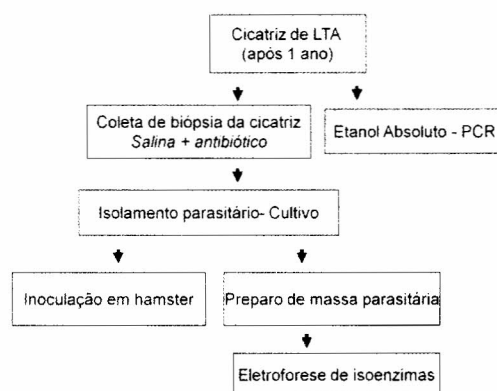


Figura 01. Organograma de coletas e processamento do material biopsiado de lesões cicatríciais de pacientes provenientes do Município de Rio Preto da Eva/AM-BR que apresentaram leishmaniose cutânea e cura clínica após um ano de tratamento.

Os pacientes selecionados foram acompanhados desde o momento do diagnóstico até o isolamento parasitário. Os fragmentos de tecidos isolados (Figura 01) foram acondicionados em frascos eppendorf individuais contendo etanol absoluto e salina com antibiótico (gentamicina 1mg/ml). Os pacientes assinaram termo de aceite para participação no estudo e foram informados da possível existência de DNA parasitário/parasitas viáveis em suas cicatrizes.

As biópsias conservadas em salina foram semeadas em meio de cultivo NNN. Os parasitos isolados eram então caracterizados pelo método bioquímico de eletroforese de isoenzimas (Figueira, 2006). Das amostras conservadas em etanol absoluto, foi feita extração de DNA, posteriormente quantificado por espectrofotômetro com amplitude variando de 260 a 320nm e utilizado nas reações de amplificação pela Ln-PCR. Esta reação já é um método padronizado no laboratório de Leishmaniose (Pinheiro, 2004) visando a amplificação da região de mini-exon de *Leishmania* em amostras de tecidos humanos. Os ensaios foram padronizados para a detecção de poucos flagelados reconhecendo, pelo menos, três grupos representativos de leishmania dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Este método possibilita processar um grande número de amostras sincronicamente, muito útil em estudos epidemiológicos.

### 3. Resultados e discussão

Foram coletados e processados dez fragmentos de cicatrizes dos pacientes que apresentaram LTA no Município de Rio Preto da Eva/Amazonas-Brasil (Tabela 01).

Tabela 01. Características dos 10 pacientes clinicamente curados oriundos do Município de Rio Preto da Eva/Amazonas-BR, examinados neste estudo.

Registro da amostra	Sexo	Localização	No. Cicatrizes	Ano do Tratamento
MHOM/09/BR/IM5530	F	AM-010/Km 60 Estrada	01	2006
MHOM/09/BR/IM5531	F	Bairro Monte Castelo II - RPE	02	2004
MHOM/09/BR/IM5532	F	AM-010/Km 05 - Ramal Baixo Rio	02	2005
MHOM/09/BR/IM5533	M	AM-010/Km 05 - Ramal Baixo Rio	01	2006
MHOM/09/BR/IM5534	M	AM-010 - Ramal da Cachoeira	04	2007
MHOM/09/BR/IM5580	F	AM-010/Km 133 - Ramal do Cafezal	01	2007
MHOM/09/BR/IM5581	M	AM-010/Km 136 - Ramal do Cafezal	01	2004
MHOM/09/BR/IM5582	F	AM-010/Km 125 - Ramal do Banco	01	2005
MHOM/09/BR/IM5583	M	AM-010/Km 125 - Ramal do Banco	02	2008
MHOM/09/BR/IM5584	M	AM-010/Km 125 - Ramal do Banco	01	2004

Tabela 02. Resultado dos exames das biópsias obtidas de pacientes oriundos do Município de Rio Preto da Eva/Amazonas-Brasil.

Registro da amostra	Cultura	Inóculo em Hamster	PCR-Ln (reação)	
			1º	2º
MHOM/09/BR/IM5530	-	-	+	-
MHOM/09/BR/IM5531	-	-	+	+
MHOM/09/BR/IM5532	-	-	+	+
MHOM/09/BR/IM5533	-	-	+	+
MHOM/09/BR/IM5534	-	-	+	+
MHOM/09/BR/IM5580	-	+	+	+
MHOM/09/BR/IM5581	-	+	+	+
MHOM/09/BR/IM5582	-	-	+	+
MHOM/09/BR/IM5583	-	-	+	+
MHOM/09/BR/IM5584	-	-	+	+

Nenhuma das amostras semeadas em meio de cultivo apresentou crescimento parasitário num período de 30 dias de observação. Fragmento de biópsia macerado foi inoculado em focinho de hamster e observado por três meses. Nesse período houve surgimento de lesão no focinho de dois dos animais (Tabela 02). Os animais continuam em observação até num tempo limite de seis meses e se os demais apresentarem lesões, seu tecido foi isolado em meio de cultivo para obtenção de massa parasitária, para a posterior caracterização bioquímica dando continuidade a este estudo.

Observou-se a presença de bandas na extração do material genético, que foi posteriormente quantificado em espectrofotômetro (Tabela 03), com concentrações que variaram entre 6,5 a 145 ug/uL. Verificou-se a amplificação de DNA parasitário de todas as amostras testadas na primeira PCR (Figura 02). Na segunda PCR houve identificação de bandas, no qual se observa a confirmação de DNA parasitário nas biópsias de cicatriz dos pacientes (Figura 03).

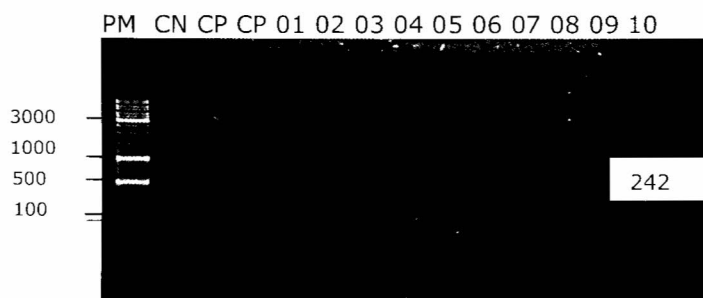


Figura 02. Gel de agarose 1% do produto obtido da amplificação da 1ª PCR com iniciadores específicos para o subgênero *Leishmania (Viannia) sp.*: PM: peso molecular - Ladder 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; no. 01 a 10: amostras de cicatriz de pacientes clinicamente curados de Leishmaniose Tegumentar Americana.

Tabela 03. Concentração de DNA de biópsia de pele da cicatriz de lesão cutânea ocasionada por *Leishmania sp.*

Registro da amostra	260nm (ng/uL)	280nm (ng/uL)	Concentração Final (ug/uL)
HOM/09/BR/IM5530	0,08	0,06	18,0
HOM/09/BR/IM5531	0,022	0,012	11
HOM/09/BR/IM5532	0,013	0,005	6,5
HOM/09/BR/IM5533	0,025	0,020	9,5
HOM/09/BR/IM5534	-	-	145
HOM/09/BR/IM5580	0,0230	0,0160	86,5
HOM/09/BR/IM5581	0,161	0,038	30,5
HOM/09/BR/IM5582	0,056	0,037	28,0
HOM/09/BR/IM5583	0,092	0,061	46,0

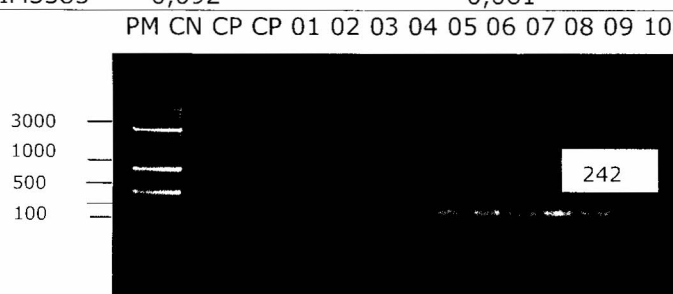


Figura 03. Gel de agarose 1% do produto obtido da amplificação da 2ª PCR com iniciadores específicos para o subgênero *Leishmania (Viannia) sp.* contendo 242pb: PM: peso molecular DNA - ladder 100pb; CN: controle negativo; 01 ao 10: amostras de cicatriz de pacientes clinicamente curados de Leishmaniose Tegumentar Americana.

O diagnóstico de infecção parasitária tem como base as manifestações clínicas, os antecedentes epidemiológicos e diversos métodos laboratoriais, em que os exames microscópicos se destacam. As principais vantagens das técnicas moleculares são a sensibilidade com que podem detectar patógenos e a rapidez com que a identificação do parasita pode ser feita. No caso de parasitas cuja identificação e implementação de terapia requerem o isolamento em cultivo do organismo ou a inoculação em animais, é evidente que o diagnóstico através de sondas moleculares ou a PCR seria vantajoso. Por outro lado, quando a microscopia direta é suficiente para a identificação morfológica a nível de gênero, e a quantidade de parasitas é suficientemente alta, então as abordagens com base na detecção de DNA não apresentam vantagens, a não ser pela possibilidade de automação e processamento de um grande número de amostras. Contudo, quando a quantidade de parasitas é baixa, os métodos moleculares, mais sensíveis, são preferíveis (Weiss, 1995).

A PCR tem sido extensamente empregada no diagnóstico molecular de doenças humanas e estudos epidemiológicos, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (Feliciangeli *et al.*, 1998). Já em outros estudos onde pesquisadores utilizaram a técnica da PCR para análise de biópsias de cicatrizes de pacientes curados clinicamente após tratamento quimioterápico específico, o método possibilitou a detecção do DNA de *Leishmania (Viannia) sp.* em 93,7% (30/32) dos exames, porém apenas 9,3% (3/32) cicatrizes apresentaram crescimento em cultivo (Mendonça *et al.*, 2004). Além disso, em algumas destas cicatrizes, os parasitos foram cultivados e estavam infectantes para animais de laboratório, sugerindo que a persistência de parasitos é regra e não exceção na

leishmaniose (Rodrigues *et al.*, 2002). Os resultados obtidos no estudo aqui apresentado demonstraram um percentual de positividade mais elevado quando comparado à pesquisa de Mendonça *et al.* (2004). Verificou-se que todos os 10 pacientes que apresentavam cicatrizes, muitas causadas por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (identificadas anteriormente) tiveram a PCR positiva com 20% (2/10) de recuperação do parasito através do isolamento em animal de experimentação (hamster) confirmando a longa persistência do patógeno após a cura clínica da doença. Fato discutido em diversas outras infecções, quanto às estratégias/mecanismos de sobrevivência dos parasitos, muitos dos quais estão relacionados com a modulação das atividades anti-parasitárias das células do hospedeiro, síntese de inibição da produção de citocinas, redução da ativação de linfócitos T, ou mesmo pelo escape do patógeno para/em células que não facilitam a ação da resposta imune (Belkaid *et al.*, 2001). Schubach *et al.* (1998) também utilizaram a PCR, detectando DNA do parasito em 80% das cicatrizes dos pacientes. Os autores sugerem que o flagelado persiste na pele por muitos anos após o tratamento. Portanto, é necessário buscar maneiras que se tenha um critério de cura mais efetivo não só tomando por base um critério de cura clínico, mas também, um critério de cura parasitológico, visto que a presença do parasito pode não ser o ponto principal, mas ser um dentre os vários fatores que possam vir a causar como consequência as recidivas em pacientes anteriormente definidos como curados.

#### 4. Conclusão

Este estudo possibilitou reforçar a discussão quanto a persistência e viabilidade parasitária na leishmaniose tegumentar após a cura clínica devido a constatação de parasitas em cicatrizes de lesões de pacientes tratados para a patologia.

#### 5. Refêrências Bibliográficas

- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, et al. 2001. The role of interleukin IL-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*; 194:1497-506.
- Feliciangeli, M.D.; Gómez, B.; Sánchez, E. 1998. Man-vector contact of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using DOT-ELISA. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 14: 28-32.
- Figueira, L. P. 2006. *Caracterização Molecular de Isolados Humanos de Leishmania (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 72pp.
- Mendonça, M.G.; Brito, M.E.F.; Rodrigues, E.H.G. 2004. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure?. *The Journal of Infectious Diseases*; 189:1018-23.
- Pinheiro, F. G. 2004. *Infecção natural em Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por Leishmania sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Amazonas, Brasil*. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, p.130.
- Rodrigues, E.H.G.; Brito, M.E.F.; Mendonça, M.G.; Werkhauser, R.P.; Coutinho, E.M.; Souza, W.V.; Albuquerque, M.F.P. M.; Jardim, M.L.; Abath, F.G.C. 2002. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in the area of endemicity in Northeastern Brazil. *Journal of clinical Microbiology*. 3572-3576.
- Schubach, A.; Haddad, F.; Oliveira, M. P. N.; Degraive, W.; Pirmez, C.; Grimaldi, G. Jr.; Fernandes, O. 1998. Detection of *Leishmania* by polymerase chain in scars of treated human patients. *Journal Infection Disease*; 178(3): 911-914.
- Silveira, T. G. V.; Arraes, S. M. A. A.; Bertolini, D. A.; Teodoro, V.; Lonardoni, M. V. C.; Roberto, A. C. B. S.; Ramos, M.; Sobrinho, A. N.; Ishikawa, E.; Shaw, J. 1999. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*, 32(4):413-423.
- Thomaz-Soccol, V.; Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Pratlong, F.; Martini-Dumas, A.; Serres, E. 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*; 68:107-108.
- Weiss, J.B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.8, p.113-130.