AF ALI UTHANT MOREIRA LIMA DA COSTA

**Alterações ósseas na leishmaniose cutânea difusa (LCD) no
Estado do Maranhão : aspectos clínicos, de imagens e
histopatológico**

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira
Corbett

São Paulo

2004

**Aos meus pais (in memorian), Ariston
Gomes da Costa e Iraci Moreira Lima da
Costa, os grandes responsáveis.**

**A todos os pesquisadores, que um dia
trabalharam com doenças que se
manifestam no sistema músculo-
esquelético.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me oferecer desafios e me ensinar a enfrentá-los.

A todos os pacientes que participaram do estudo. Minha gratidão eterna.

À minha querida família: Adriana, esposa dedicada, que com paciência, devoção e compreensão me auxilia nas atividades do dia a dia; aos meus três lindos filhos, Miguel Vinícius, Daniel Victor e Rafael Uthant, por serem a maior razão para continuar sempre avançando.

Ao Professor Dr Carlos Eduardo Pereira Corbett,. Minha gratidão, meu respeito e minha amizade, por ter aberto as portas do LIM-50 e acreditar nesta proposta. Quero registrar a maneira profissional com que orienta e conduz os seus pós-graduandos.

Quero agradecer ao Professor Dr Jackson Maurício Lopes Costa, pelo incentivo constante recebido em todas as etapas desse trabalho.

À minha amiga e conterrânea, Dra Claudia Gomes, pela oportunidade de compartilhar seu conhecimento e ajuda nos períodos que permaneci no LIM-50. A arte gráfica é

À Dra Márcia Laurenti, pelas sugestões e contribuições na fase final deste trabalho.

À equipe de profissionais do LIM-50: Lia Negrão pelo carinho e presteza no trabalho administrativo; Dalila pela ajuda na digitação do texto; a Thaise, Mussya e Edson Tadeu pelo apoio recebido nas atividades do laboratório, e a Zenaide pelo carinho e o famoso cafezinho.

Aos meus irmãos: Ag, Af, Ariston e Aline que apesar da distância ainda são meus grandes amigos.

Ao meu tio e amigo José Almir, que sempre esteve disposto a ajudar.

À Sra Maria Reis, antes de tudo minha amiga, por colocar o seu apartamento a minha disposição em São Paulo – SP.

À Diretoria Médica do Hospital Dr Carlos Macieira/ Pró-Saúde pela cooperação com este projeto de pesquisa, durante a internação dos pacientes.

À Dra Jesus Couto, por ter colaborado durante a coleta do material.

Ao Dr Bruno Martins, pela atenção dispensada em nos atender sempre que solicitado, para analisar os exames cintilográficos.

Aos meus amigos e colegas de profissão: Simões, Gerson, Reginaldo, Antônio Carlos e Gregório Jr por terem compreendido a importância da pesquisa, afastando-me das minhas obrigações profissionais em alguns períodos.

Aos meus alunos de graduação, motivo da constante busca de conhecimento e novos desafios.

À todos que contribuíram de alguma forma na elaboração e finalização deste trabalho.

"Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar." (Shakespeare)

"As novas gerações de médicos precisam relembrar a arte clínica para reconhecer doenças antigas, bem como suas novas formas de manifestação." (Indira Nath)

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. Introdução	1
1.1. Leishmanioses	1
1.2. Etiologia das Leishmanioses	1
1.3. Leishmaniose Tegumentar (LT).....	4
1.4. Leishmaniose Tegumentar no Brasil	6
1.5. Leishmaniose Tegumentar no Estado Maranhão.....	10
1.6. Patologia da Leishmaniose Tegumentar	10
1.7. Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	13
1.7.1. Leishmaniose cutânea	13
1.7.2. Leishmaniose cutâneo mucosa.....	14
1.7.3. Leishmaniose cutâneo difusa	15
1.8. Leishmaniose cutâneo difusa no Estado do Maranhão.....	20
1.8.1. Aspectos terapêuticos na LCD.....	27
1.9. Lesões ósseas na Leishmaniose tegumentar	28
1.10. Enfermidades que fazem diagnóstico diferencial com leishmaniose tegumentar.....	30
1.11. Modelos experimentais em animais	36
1.11.1. Aspectos éticos da cirurgia experimental	36
1.11.2. Aspectos técnico-científicos.....	36
2. Justificativa	39
3. Hipótese	40
4. Objetivos.....	41
4.1. Objetivo geral.....	41
4.1.1. Específicos primários	41

4.1.2. Específicos secundários	41
5. Métodos	42
5.1. Aspectos éticos	42
5.2. Equipe de apoio.....	43
5.3. Desenho do estudo	44
5.3.1. Estudo observacional em humanos (fase I)	44
5.3.2. Estudo experimental em animais (fase II).....	66
5.4. Limitações metodológicas do estudo	69
5.5. Análise dos dados.....	71
6. Resultados	72
6.1. Fase I do estudo	72
6.2. Fase II do estudo	114
7. Discussão	118
8. Conclusões	136
9. Anexos.....	139
10. Referências bibliográficas.....	144
Apêndices	

RESUMO

Introdução: ao longo da história da leishmaniose tegumentar (LT), o comprometimento do tecido ósseo foi pouco estudado, principalmente na forma clínica difusa (LCD). Os estudos que abordaram o tema concentraram-se nas observações clínicas, estudos radiográficos e na visão paleopatológica, numa tentativa de explicar as lesões ósseas que alguns indivíduos com LT apresentavam. A literatura sobre infecção óssea cita como agente causador de osteomielite no homem, principalmente, bactérias e fungos. **Objetivo:** estudar as alterações ósseas na leishmaniose cutânea difusa (LCD), através da cintilografia óssea trifásica, radiografias e histopatológico. **Métodos:** o presente estudo analisa a associação entre a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e as alterações ósseas em oito pacientes com LCD, procedentes de diversos pólos de produção da doença (LT) no Estado do Maranhão. Foram realizados, nesta investigação, dois estudos: observacional em humanos, utilizando exames de imagens (cintilografia óssea trifásica e radiografias) e histopatológico do tecido ósseo (Hematoxilina-Eosina, Imunohistoquímica, Ziehl-Neelsen e Gomori-Grocott); e um estudo experimental de infecção óssea crônica produzida pela *Leishmania*, em camundongos BALB/c, através do histopatológico (Hematoxilina-Eosina). **Resultados:** a análise clínica mostrou a presença de deformidades nas extremidades distais dos membros superiores e inferiores em 50% dos casos, com limitação funcional associadas às lesões cutâneas. Nos estudos de imagens, a cintilografia mostrou hipercaptação na fase tardia em várias áreas de uma mesma região, caracterizando processos inflamatórios múltiplos no tecido ósseo em todos os pacientes. A radiografia

demonstrou características de reabsorção óssea parcial das falanges distais dos dedos das mãos e pés, bilateral em seis pacientes. Revelou, também, lesões líticas nas falanges proximais das mãos em dois pacientes. O exame histopatológico demonstrou a presença de um quadro de osteomielite crônica em quatro pacientes, sendo detectado a *Leishmania*. Foi realizada pesquisa para micobactérias e fungos no tecido ósseo, que foram negativas. O modelo experimental caracterizou um quadro de infecção óssea crônica, demonstrando o comprometimento do tecido cartilaginoso secundariamente. **Conclusões:** todos os pacientes apresentaram algum tipo de comprometimento ósseo. As deformidades localizaram-se nas extremidades distais em seis pacientes. A cintilografia óssea e a radiografia foram importantes na localização e no seguimento das lesões ósseas. Através do exame histopatológico ficou evidente a relação entre a *L.(L.) amazonensis* e infecção óssea, caracterizando um quadro de osteomielite crônica. Portanto, fica a proposta de modificação da classificação etiológica da osteomielite crônica, incluindo o protozoário, *Leishmania (L) amazonensis*, como agente causador.

Palavra-chave: Leishmaniose, Leishmaniose cutânea difusa, *Leishmania (L) amazonensis*, osteomielite, clínica, imagem, patologia, Maranhão, Brasil.

SUMMARY

Introduction: Since the early history of Cutaneous Leishmaniasis (CL), there are few studies on the bone involvement in CL, mainly related to the Cutaneous Diffuse Leishmaniasis (CDL). The studies were mainly related to the clinical observation, radiographical aspects and the paleopathological view, on the attempt to explain the bone lesions found in some individuals with CL. The literature on bone infection reports the bacteria and fungi as agents of osteomyelitis in man. **Objective:** to study the bone changes in Cutaneous Diffuse Leishmaniasis (CDL), through the scintigraphy, radiography and histopathological aspects. **Methods:** the study analyzed the association of the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the bone changes in eight patients with CDL, from eight endemic poles of the disease in the State of Maranhão. Two studies were carried out: human observations using images exams such as scintigraphy, radiography and histopathology of the bone tissue using the Hematoxilin – Eosine, Ziehl Neelsen and the Gomori-Grocott stain and also by immunohistochemistry. An experimental study of chronic bone infection induced by the *Leishmania* in BALB/c mice, were carried out analyzed through the histopathology (Hematoxylin-Eosin). **Results:** the clinical analysis showed deformity in the upper and inferior extremities in 50% of the cases, with functional limitation. On the studies of images, the scintigraphy showed hipercaptation on the late phase, in different areas of the same region, characterizing multiples inflammation in the bone of all patients. The radiography demonstrated characteristics of bone partial reabsorption of the feet and hands, bilateral in six patients. Lithic changes were also detected in fingers, of two patients. The histopathology showed chronic osteomyelitis in four patients, with detection of the *Leishmania (L.) amazonensis* parasite. The research for mycobacteria and fungi in the bone tissue were negatives. The experimental model showed chronic infection of the bone tissue, demonstrating that the cartilage was secondarily involved. **Conclusion:** all patients presented some type of bone changes. The deformities were located in the extremities in six patients. The

scintilography of the bone and radiography were important for localization and follow up of the bone lesions. The histopathological exams showed the relationship between *Leishmania (L) amazonensis* and bone infection, characterizing chronic osteomyetitis. We proposed that the *Leishmania (L) amazonensis* should be included as agent of chronic osteomyelitis.

Key words: leishmaniasis; diffuse cutaneous leishmaniasis(DCL); *Leishmania*, (*Leishmania*) *amazonensis*; osteomyielitis; clinical, imaging; pathology; Maranhão; Brazil.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses pertencem a um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, sendo consideradas uma das seis grandes doenças endêmicas mundiais, juntamente com a malária, hanseníase, esquistossomose, filarioses e tripanossomíases, que causam sérios problemas para a saúde humana, ocorrendo casos em todos os continentes, exceto na Oceania (Killick-Kendric 1987; Grimaldi et al. 1989; Who 1990; Vlassoff 1993).

São divididas em dois importantes grupos: as leishmanioses tegumentares que afetam a pele e mucosas (dermotrópica) e as leishmanioses que comprometem as vísceras (viscerotrópica). Encontram-se entre diferentes espécies de animais silvestres e domésticos nas regiões menos desenvolvidas do velho e do novo mundo, sendo o homem um hospedeiro acidental (Shaw e Lainson 1987; Marzochi 1992).

1.2 Etiologia das Leishmanioses

As leishmanioses são responsáveis por um amplo espectro de morbidade, alcançando mais de 79 países, com uma taxa de incidência de

400 mil novos casos por ano e uma prevalência mundial maior que 12 milhões de pessoas, estimando-se que 350 milhões de indivíduos no mundo tem risco de adquirir a infecção (Ashford et al. 1992; OPAS 1994; Franco 1997).

Morfologicamente todas as espécies do gênero *Leishmania* que parasitam o homem são semelhantes. Por razões de clareza e simplicidade serão adotados nomes específicos atribuídos aos parasitos segundo a enfermidade que produzem, sem entrar no mérito das distinções do ponto de vista estritamente taxonômico, de acordo com Lainson e Shaw (1987):

Reino Protista HAECKEL, 1866

Sub-reino Protozoa GOLGFUS, 1817

Filo Sarcomastigophora HONIGBERG e BALAMUTH, 1963

Sub-filo Mastigophora DEISING, 1866

Classe Zoomastigophorea CALKINS, 1909

Ordem Kinetoplastida HONIGBERG, 1963 emend. VICKERMAN, 1976

Sub-ordem Trypanosomatina KENT, 1880

Família Trypanosomatidae DOFLEIN, 1901 emend. GROBBEN, 1905

Gênero *Leishmania* ROSS, 1903

Segundo Lainson e Shaw (1987), as espécies do gênero *Leishmania* foram classificadas em dois subgêneros, de acordo com o comportamento evolutivo do parasito no tubo digestivo do flebotomíneo vetor: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson e Shaw 1987). Desse modo, as espécies que antes pertenciam ao complexo *braziliensis*, com desenvolvimento desde o intestino

posterior (píloro e íleo) até o intestino anterior (esôfago), estão atualmente agrupadas no subgênero *Viannia*. E às espécies que pertenciam aos complexos mexicana, donovani, tropica e major, com desenvolvimento desde o intestino médio (estômago) até o anterior (esôfago), agrupadas no subgênero *Leishmania*. Os flebotomíneos responsáveis pela manutenção da transmissão entre animais, não são primariamente antropofílicos, contudo, espécies como o *Psychodopygus wellcomei*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia longipalpis* na evolução da complexa e desordenada adaptação do homem ao meio ambiente, são considerados vetores com extrema capacidade de reproduzir seu ciclo completo em antropofilia (Killick-Kendric 1987; Rêbelo et al. 1996)

As Leishmanias são transmitidas por dípteros da família *Psychodidae*, *Latreille* (1756), conhecidos como birigui, mosquito palha, cangalhinha, e outros. Somente as fêmeas são hematófagas, com ciclos de atividades crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos. Dois gêneros são incriminados como vetores das leishmanioses: o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo, e o *Lutzomyia* (Lu.) no Novo Mundo (Killick-Kendric 1987). Cada espécie de *Leishmania* está adaptada a um número restrito de vetores e reservatórios, o que determina características próprias para o ciclo de transmissão de cada espécie (Lainson et al. 1994).

As Leishmanias possuem dois estágios de desenvolvimento distintos: as formas promastigotas e amastigotas. As promastigotas são encontradas nos insetos vetores e, durante o repasto sangüíneo, essas formas passam da prosbócide com a saliva, para a derme do vertebrado transformando-se

em formas amastigotas, que são microorganismos arredondados ou ovóides e vivem obrigatoriamente dentro de células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados (Pearson e Sousa 1996). Chang et al. (1990) afirmaram que a *Leishmania* é o único protozoário parasita que sobrevive e se reproduz no fagolissoma de macrófago em um pH de 4,5 protegendo-se neste meio graças a uma ATPase transportadora de próton que mantém o ambiente intracelular em um pH de 6,5.

1.3 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, caracteriza-se por apresentar um polimorfismo de lesões que podem manifestar-se na pele, tais como: impetiginóide, ectimatóide, vegetante, verrucóide, tuberoso, nodular, infiltrativo, lupóide e outros (Silveira et al. 1997). Quando ocorre comprometimento mucoso, o qual pode surgir junto com as lesões cutâneas ou, o que é mais freqüente, meses ou vários anos depois da cicatrização das lesões de pele, inicia-se por eritema e discreta infiltração da mucosa, seguido de granulação e ulceração, chegando por último à perfuração do tecido cartilaginoso do septo nasal ou do palato. Em ordem de freqüência, as lesões mucosas se manifestam, principalmente, no nariz, palato duro, faringe e laringe. Na LT, não existe comprometimento de órgãos internos (Marsden et al. 1984; Costa et al. 1986; Marsden 1986; Silveira et al. 1999).

As espécies do complexo *Leishmania* geralmente não envolvem a mucosa, causando somente lesões cutâneas com a possibilidade de cicatrização espontânea (Who 1990).

No continente americano, com exceção do Canadá, Chile e Uruguai, há registros da LT, possuindo uma ampla distribuição, estendendo-se desde a América do Norte, no território do Texas (EUA), atravessando a América Central e chegando até o norte da Argentina. Na América do Sul, o Brasil representa a área endêmica de maior extensão territorial e um dos países com as mais elevadas taxas de notificação da infecção. Existem casos confirmados em todos os estados brasileiros, causando, principalmente, cicatrizes, deformações e mutilações do tegumento cutâneo e mucoso (Pessôa e Vianna 1978; Marsden 1986; Lainson 1997; Who 1990; FUNASA 2000).

Rabello (1923) foi quem propôs pela primeira vez a denominação do termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) à Academia de Dermatologia Brasileira, termo este, que se estende às formas clínicas cutânea, mucosa e difusa encontradas no Novo Mundo. Pessôa e Barreto (1948) relataram que as leishmanioses eram conhecidas antes do século XX como um grupo de enfermidades dermatológicas semelhantes entre si e, com um diagnóstico clínico associado a lesões cutâneas, geralmente ulcerada e às vezes comprometendo também as mucosas oral e nasal.

1.4 Leishmaniose Tegumentar (LT) no Brasil

No Brasil, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) vem registrando índices crescentes no número de casos da LTA nos últimos 20 anos em todos o território nacional, sendo que, entre os anos de 1985 a 1999 foram notificados um total de 388.155 casos autóctones, comparando-se os dados de 1985 (13.654 casos) com os de 1999 (30.550), observa-se que o coeficiente de detecção (CD) da LTA passou de 10,45/100.00 habitantes para 18,63/ 100.000 habitantes. De 1980 a 1995 foram notificados 304.519 casos, com uma média de 19.033 ao ano. A doença vem ocorrendo de forma endêmica e epidêmica, com recrudescência de focos esporádicos e com 2 padrões epidemiológicos distintos: o relacionado a novas áreas de colonização e trabalho rural, associado a reservatórios silvestres e outro ocorrendo em área peri-domiciliar e domiciliar, com freqüência em regiões periurbanas. Nestas, tem-se registrado o envolvimento de animais domésticos, havendo a possibilidade do homem atuar como reservatório (Costa et al. 1986; FUNASA 2000).

Entre os fatores imediatos que contribuíram para o aumento dos casos da LTA nesse período considerou-se:

- O processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados semi-urbanizados na periferia de centros urbanos, desmatamento e assentamento em áreas florestais, e o processo predatório de colonização;

- A falta de ação contínua e inquéritos em animais presentes no convívio peridomiciliar e intradomiciliar;
- O diagnóstico e tratamento tardio dos casos humanos;
- O aumento da densidade de vetores;
- A não implementação de medidas educativas em fontes de trabalho e área de focos;
- Adaptação de vetores e parasitas a ambientes modificados e/ou reservatórios.

As regiões mais atingidas são Norte, Nordeste, e alguns estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste (Marzochi 1992; Marzochi et al. 1999). No ano de 1995 foram notificados 35.779 casos, sendo que 75% destes ocorreram nas regiões Norte e Nordeste. Em relação ao ano anterior, observou-se um aumento de 59% no número de casos detectados.

A real prevalência das diferentes leishmanioses no continente americano é difícil de ser estabelecida, devido aos casos subnotificados, diagnóstico incorreto, afecções inaparentes, variações de respostas do hospedeiro e multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos. No Brasil, um dos países mais afetados por esta enfermidade, ocorre uma distribuição por todas as suas regiões. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde (MS) notificou, em média, 30.000 novos casos de LTA anualmente (Ministério da Saúde 1997 e 2000).

Em 1996, a região Nordeste contribuiu com aproximadamente 39% dos casos registrados, predominando nos Estados do Maranhão, Bahia e Ceará; A Região Norte com 35% dos casos, predominando no Pará, Rondônia e Amazonas; Na Região Centro-Oeste, o Estado do Mato Grosso destacou-se com uma taxa de 16% do número de casos; A Região Sudeste com maior prevalência no Estado de Minas Gerais (8%) e na Região Sul com 2 % dos casos registrados, principalmente, no Estado do Paraná (Ministério da Saúde do Brasil 1997, Marzochi et al. 1999).

No tocante à etiologia da LTA no Brasil, atualmente são identificadas seis espécies de *Leishmania* causadoras da doença, todas com distribuição na Amazônia, sendo cinco do subgênero Viannia e uma do subgênero *Leishmania*:

- *L. (V.) braziliensis*
- *L. (V.) guyanensis*
- *L. (V.) lainsoni*
- *L. (V.) shawi*
- *L. (V.) naiffi*
- *L.(L.) amazonensis*

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é transmitida pelo *Lu. flaviscutellata*, a qual era previamente considerada como causa somente de lesões localizadas da pele (Silveira et al. 1991), estando agora associada com alguns casos de lesão mucosa e leishmaniose visceral (Sampaio et al. 1985; Barral et al. 1991), sendo também a responsável pelos raros casos de

leishmaniose cutânea difusa (LCD) em nosso país (Costa et al. 1992; Barral et al. 1995).

Deve-se a Lainson e Shaw (1972), a descrição da *Leishmania amazonensis* as cepas encontradas em roedores da região amazônica. No entanto, o mérito do isolamento da *Leishmania (L.) amazonensis* em roedores silvestres (*Oryzomys goeldi*) na região Norte, e a reprodução da infecção experimentalmente em camundongos e hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram de Nery-Guimarães e Azevedo (1951), que caracterizaram as lesões, através de estudo histopatológico, por um infiltrado inflamatório composto principalmente por histiócitos altamente parasitados, diferentemente do padrão histopatológico apresentado por pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis*, que tem por características uma densidade muito baixa de parasitas nas lesões ulceradas.

O complexo *Viannia* causa a leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa e mucosa, tendo parasitas como a *Leishmania (Viannia) guyanensis* responsável por lesões cutâneas que somente por contigüidade podem atingir as mucosas, estando associada sua transmissão com o *Lu. umbratilis*.

A transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* associa-se com o *L. wellcomei*, na Amazônia (Ready et al. 1983; Lainson et al. 1994) e *L. whitmani*, na Bahia (Costa 1986). Mais recentemente foram descritas as *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) naiffi*, no Estado do Pará/ Brasil, causando apenas lesões cutâneas (Grimaldi et al. 1991; Shaw 1994).

1.5 Leishmaniose Tegumentar (LT) no Estado do Maranhão

Terra (1913) e Orsini (1940) detectaram lesões ulceradas em indivíduos procedentes de vários estados do Brasil, entre esses, o Maranhão, considerado região com graves problemas em relação a LTA. Em 1979, realizou-se estudo no Município de Buriticupu (MA), durante um surto epidêmico da doença com 300 casos, todos com lesões cutâneas, destacando um caso de leishmaniose cutânea difusa (LCD) refratário a vários ensaios terapêuticos (Silva et al. 1979, Costa et al. 1992).

Segundo o Ministério da Saúde, o Estado do Maranhão apresentou o coeficiente de detecção (CD) mais elevado do nordeste brasileiro 90,32 casos/100.000 habitantes, seguido pelo Ceará com 63,48 casos/100.000 habitantes, no que diz respeito ao número de casos absolutos deteve a maior casuística do Brasil com 4.725 casos, o que reflete a gravidade representada pela LTA no Estado (Ministério da Saúde do Brasil 1997).

1.6 Patologia da Leishmaniose Tegumentar (LT)

A leishmaniose tegumentar está inserida no contexto das doenças infecciosas crônicas, granulomatosas, com uma variedade de reservatórios naturais, que se caracteriza por uma reação inflamatória, do tipo granulomatosa, no sítio de inoculação do parasito, mas dependendo do hospedeiro e da cepa infectante pode produzir lesões longe do sítio primário

da infecção (Ridley 1987; Silva et al. 1979). A resposta inflamatória varia de indivíduo para indivíduo e com a cepa do parasito. Com base nos vários padrões de lesões apresentadas pelos pacientes, Ridley (1980), propôs o seguinte sistema de classificação em LC:

Grupo I- Granuloma extensivo constituído por macrófagos, que às vezes mostram-se vacuolizados e repletos de parasitos. Poucos linfócitos e plasmócitos são encontrados no local da lesão. Não são observadas células gigantes e a ocorrência de necrose é rara.

Grupo II- Granuloma focal com área central de necrose. É constituído de histiócitos, em torno dos quais observam-se plasmócitos e linfócitos, além de células gigantes imaturas que podem ser vistas.

Grupo III- Granuloma desorganizado, onde se observam histiócitos, células endoteliais e fibroblastos jovens.

Grupo IV- Granuloma com células gigantes de corpo estranho ou células tipo Langerhans associadas a um intenso infiltrado linfocitário e poucos plasmócitos.

Grupo V- Granuloma tuberculínico, são observadas células epitelióides e grande quantidade de células gigantes.

A inflamação crônica é uma reação do hospedeiro composta basicamente por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Estas células podem formar agregados focais bem delimitados, denominados granulomas (Williams e Williams 1983; Brito e Franco 1994; Mariano 1995).

A reação granulomatosa é normalmente constituída por macrófagos ativados, células epitelióides, células gigantes e linfócitos. Pode haver

proliferação de fibroblastos e vasos sangüíneos em torno do granuloma. Todavia, nem sempre o granuloma é constituído por todos esses tipos celulares, pois isto depende da natureza do patógeno, do hospedeiro e da espécie do animal (Mariano 1995).

As células epitelióides se originam dos macrófagos, mas perdem parcialmente a capacidade de fagocitar e se especializam em produzir enzimas líticas que são lançadas no interstício. Elas podem se arranjar em camadas ou formar agregados celulares discretos. São normalmente encontradas na região central da lesão ou em torno das áreas de necrose. Nos preparados histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina (H&E), as células epitelióides apresentam citoplasma discretamente granular e núcleo alongado e pálido (Williams e Williams 1983).

As células gigantes são células multinucleadas que resultam da fusão de vários macrófagos, cujos núcleos se dividem rapidamente sem que haja citocinese. A célula gigante pode ser do tipo Langhans (tuberculóide) ou do tipo corpo estranho; a célula tipo Langhans é formada por vários núcleos que se dispõem de forma organizada na periferia celular, tendo aspecto de ferradura. A célula do tipo corpo estranho, por sua vez, apresenta os núcleos arranjados aleatoriamente no citoplasma da célula (Coelho 2002; Sandor et al. 2003).

1.7 Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar

A LT manifesta-se através de várias formas clínicas, devido a características particulares que as Leishmanias apresentam, principalmente, diversidade de tropismo, podendo apresentar-se clinicamente de maneira variada (Bryceson 1996). Na pele as lesões podem caracterizar a forma localizada (única ou múltipla), a disseminada (lesões muito numerosas em várias áreas do corpo) e a forma difusa (FUNASA 2000).

1.7.1 Leishmaniose cutânea (LC)

Esta forma atinge milhões de pessoas em vários países do Mundo. No velho Mundo é causada por *L.(L.) major* e *L.(L.) tropica* e, se caracteriza pelo aparecimento de múltiplas lesões. No Novo Mundo, existem várias espécies que podem ser responsáveis, entre as quais destacamos: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) panamensis*, *L.(L.) mexicana* e *L.(L.) amazonensis*. Difere do que se observa clinicamente na LC do Velho Mundo, as lesões causadas pelas Leishmanias do Continente Americano tendem a ser única, sendo rara a ocorrência de lesões múltiplas. A lesão ulcerada franca representa a manifestação cutânea mais comum da doença (cerca de 85% dos casos), caracterizada por contorno circular, borda saliente e infiltrada, fundo com granulação grosseira avermelhada e com discreto exsudato. Na ausência de infecção secundária, bacteriana ou micótica, apresenta pouca sensibilidade, podendo ser indolor. A lesão pode,

ainda, estar recoberta por crosta sero-hemática ou sero-purulenta, a qual, após ser removida expõe o aspecto ulcerado típico (Falqueto e Sessa 1996; Silveira e Mayrink 1997).

Os indivíduos com essa forma apresentam uma reação de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania*, ou seja, reação de Montenegro positiva (Grevelink e Lerner 1996).

1.7.2 Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) ou Leishmaniose mucosa

Na forma clínica LCM ocorre uma intensa resposta inflamatória, porém com escassos parasitos, ou seja, há uma exacerbação da resposta imune celular. A maior parte dos casos estão associados com *L. (V.) braziliensis* (Pearson 1993), mas existem relatos da doença causada por *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) mexicana* (Walton et al. 1977).

Manifesta-se pouco tempo após o aparecimento da lesão primária, ou surgem anos depois, após a cura clínica. Acredita-se que os parasitas da lesão primária se disseminem para as mucosas por via linfática ou hematogênica. As lesões ocorrem nas mucosas do trato respiratório superior, principalmente, na região nasobucofaringea, e a destruição dos tecidos moles e da cartilagem da nasofaringe provoca mutilação e a desfiguração da face desses pacientes. Na maioria dos indivíduos predomina uma reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Walton et al. 1977).

Ao exame clínico, pode-se observar infiltração, ulceração, perfuração do septo nasal, lesões úlcero-vegetantes, úlcero-crostosas ou úlcero-

destrutivas. Poderá ocorrer destruição parcial ou total da pirâmide nasal e outras estruturas acometidas na boca. Raramente atinge outras mucosas, como língua e órgãos genitais.

1.7.3 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

Forma clínica de interesse neste estudo, a LCD será abordada de maneira destacada, levando em consideração, principalmente os aspectos: histórico, clínico e imunológico. A LCD é considerada uma forma rara da LT, de comportamento evolutivo crônico e que compromete a pele. O processo inicia-se com um pequeno nódulo cutâneo, que gradualmente se dissemina por todo o corpo, semelhante à forma virchowiana da hanseníase. As áreas mais freqüentemente afetadas do corpo, são: face (nariz, regiões malares, lábio superior, pavilhão auricular) e membros superiores e inferiores. A doença poupa as regiões inguinal, axilar e o couro cabeludo, e face palmar das mãos e plantar dos pés. As lesões são eritematosas, sob a forma de pápulas, tubérculos, nódulos e infiltrações difusas, e menos freqüentemente, sob a forma tumoral. A infiltração pode envolver extensas áreas do corpo e, quando presente na face, confere ao paciente o aspecto leonino, confundindo-se com a hanseníase virchowiana (Costa et al. 1992; Costa et al.1998; FUNASA 2000).

Do ponto de vista imunológico, a LCD é considerada como o pólo anérgico da LT, sendo caracterizada pela ausência de reatividade ao antígeno de Montenegro (IDRM) e por não responder ao tratamento

medicamentoso (Silva 1945; Medina e Romero 1962; Bryceson 1969; Convit et al. 1972; Rabelo 1959 e 1978; Ridley 1987; Grevelink e Lerner 1996).

Na literatura mundial, os primeiros relatos sobre LCD foram, no Brasil (Silva 1945), na Venezuela (Convit e Lapenta 1946) e na Bolívia (Barrientos 1948) enfocando aspectos histopatológico, parasitológico e, principalmente, as características clínicas das lesões máculo-papulo-nodulares ricas em *Leishmanias*, com evolução crônica, refratariedade ao tratamento medicamentoso e semelhança com a hanseníase. Existem duas hipóteses que tentam explicar esta forma clínica com características únicas: seriam causadas por subespécies diferentes de *Leishmanias* ou por deficiência na resposta imunológica do hospedeiro (Grimaldi e MacMohon-Pratt 1991; Convit et al. 1993).

Este quadro clínico foi descrito, sucessivamente, em outros países da América Latina e do Continente Africano, recebendo várias denominações tais como: leishmaniose dérmica nodular não ulcerada e placas infiltradas e hiperpigmentadas (Silva 1945); leishmaniose disseminada (Convit e Lapenta 1946); leishmaniose disseminada de aspecto lepromatoso (Mayer et al. 1948); leishmaniose cutânea nódulo-tumoral (Nery-Guimarães 1951); leishmaniose anérgica disseminada (Convit et al. 1957), leishmaniose tegumentar queloidiana (Silva 1958), leishmaniose anérgica hansenóide (Silva 1978), leishmaniose cutânea anérgica difusa (Silveira et al. 2004) .

Entretanto, a denominação de leishmaniose cutânea difusa (LCD) vem sendo utilizada de maneira ampla, após os estudos de Bryceson (1969), mesmo nos casos com lesões localizadas com posterior disseminação, num

espaço de tempo que varia de meses a alguns anos (Convit 1957; Bittencourt e Guimarães 1968; Bryceson 1969).

No Brasil, a LCD tem uma ocorrência consideravelmente menor que a leishmaniose cutânea. Dos 520 casos de LT descritos por Silva et al. (1972), sete casos (1,34%) foram identificados como LCD nos Estados do Pará e no Maranhão, durante um surto epidêmico, em que foram identificados 300 pacientes com leishmaniose cutânea, encontrou apenas um caso (3%) de LCD (Silva 1978).

Os agentes etiológicos relacionados variam nas diversas regiões do globo. Na Etiópia foram identificadas a *L. aethiopica* (Bryceson 1969), a *L. tropica* (Bryceson 1970; Develoux et al. 1996) e a *L. major* (Develoux et al. 1996), todas pertencentes ao complexo *Leishmania*. No Novo Mundo, Medina e Romero (1957 e 1962) descreveram uma subespécie de *Leishmania mexicana*, denominada de *L. mexicana pifanoi* como responsável pela LCD na Venezuela. No México foi descrita a espécie *L. mexicana*, no Brasil a *L. amazonensis* todas pertencentes ao complexo *Leishmania* (Who 1990; Shaw 1994).

A fonte de infecção e os mecanismos de transmissão da LCD são similares aos da leishmaniose cutânea. O vetor mais importante no Brasil é a *Lu. flaviscutellata*, inseto considerado pouco antropofílico. A doença pode ocorrer em ambos os sexos e em qualquer faixa etária, podendo acometer vários indivíduos de uma mesma família (Diaz et al. 1985). A infecção se inicia através da inoculação na pele de formas promastigotas, através da picada de flebotomíneos infectados. O parasita transforma-se em formas amastigotas no

interior das células do SFM, consideradas como preferenciais para proliferação parasitária (Bittencourt 1985; Guenon et al. 1990; Barral-Netto et al. 1995).

Na infecção leishmaniótica ocorre fusão de lisossomos secundários e vacúolos parasitóforos, com derramamento das enzimas lisossomiais que tem ação tóxica. Algumas formas amastigotas sobrevivem no interior desses vacúolos (Nathan et al. 1983). No meio extracelular as amastigotas estariam vulneráveis à ação de mecanismos líticos mediados por elementos séricos, entretanto, quando fagocitados por macrófagos escapariam desses mecanismos letais. Segundo Locksley e Scott (1991) e Barral-Netto et al. (1995), a lise pelos macrófagos seria o mecanismo mais importante de destruição parasitária e controle da infecção.

Os fatores que influenciariam a capacidade de destruição das Leishmanias não são bem conhecidos. Determinadas citocinas parecem desempenhar importante papel na lise do parasita no interior dos macrófagos, como o Fator de Necrose Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), citocinas produzidas por células T incluindo o Interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) (Murray et al. 1983; Nathan et al. 1983). Nathan et al. (1983) descreveram que os macrófagos ativados teriam capacidade aumentada para produção de radicais tóxicos de oxigênio e nitrogenados podendo destruir as Leishmanias (Green et al. 1990, Corradin e Mauel 1991).

Mesmo com a presença dessas substâncias alguns parasitas sobrevivem dentro dos macrófagos, talvez, pela presença de outras substâncias que inibiriam ou diminuiriam a liberação do Interferon gama, tais

como a interleucina 4 (IL-4) e a Interleucina 10 (IL-10) ou fator de Crescimento e Transformação beta (TGF β), (Barral-Netto et al.1992).

A ocorrência de LCD depende da espécie do parasito, além dos mecanismos de resistência natural e adquirida do hospedeiro (Barral-Netto et al. 1986). Essa forma manifesta-se clinicamente por máculas, pápulas, ou nódulos, não se observando ulcerações, evoluindo com o aparecimento de outras lesões semelhantes na vizinhança, num período variável de tempo, ocorrendo disseminação hematogênica do parasito (Convit et al. 1972; Costa et al. 1992; Barral et al. 1995).

As lesões não ulceram, porém são formadas por agregados de macrófagos repletos de parasitas. A LCD pode ser causada pela *L.(L.) aethiopica* no Velho Mundo e pela *L.(L.) amazonensis* no Novo Mundo (Maüel e Behin 1987).

Bittencourt e Freitas (1983) consideram a ação de traumas ou infecções secundarias nas lesões ulceradas de pacientes com LCD, com elasticidade tecidual comprometida, responsável, por facilitar micro traumatismos e conseqüentemente a migração de microorganismos existentes na pele, para o sitio da lesão. Entretanto os traumatismos de repetições, sobre as lesões localizadas nas superfícies articulares das extremidades de pacientes com LCD, podem provocar exulcerações ou lesões hiperkeratóticas, verrugoso-vegetante ou queloidiforme, não justificando a ocorrência de ulcerações francas (Costa et al. 1992; Saldanha et al.1995; Costa 1998).

Algumas lesões da LCD podem envolver espontaneamente, mesmo as lesões extensas, deixando cicatrizes apergaminhadas e enrugadas com acentuada atrofia da pele (Bryceson 1969; Costa et al. 1995).

1.8. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão

A grande mobilidade social observada nas últimas décadas, e a descontinuidade dos programas de controle e combate aos vetores das grandes endemias favoreceram o recrudesimento das leishmanioses em várias cidades do Brasil (Mendes et al. 2002).

A ocorrência de LCD é significativa no Maranhão, tendo sido identificados até 1998, 10 casos, representando 32% da casuística nacional (Costa 1998). Recentemente, o Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social da Universidade Federal do Maranhão-NPTMS/UFMA fez uma atualização do número de casos desta doença ocorridos no Estado, através de revistas especializadas, prontuários hospitalares e teses, constatando 16 casos a partir de 1960.

Utilizou-se análise de espacialização de LT do Programa de Vigilância e Monitoramento da LT no Brasil, desenvolvido pelo Ministério da Saúde (MS)/Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em parceria com o Departamento de Endemias Samuel Pessoa- ENSP/FIOCRUZ, que divide o país em circuitos e pólos de produção da doença, de acordo com a concentração dos casos (www.funasa.gov.br Boletim eletrônico, 2002).

Circuito espacial de produção de LT é definido como uma área extensa, complexa e contínua, a partir de elevada concentração de casos da doença em um período considerado de tempo, sendo constituída por diversos pólos, na maior parte das vezes se superpondo a mais de um município. Os circuitos são decorrentes de processos sócio-ambientais particulares e dinâmicos, podendo apresentar tendência à expansão ou retração, em função das características de seus determinantes e podem ser compostos de uma ou mais unidades federadas.

Já um pólo de leishmaniose tegumentar é considerado como uma unidade espacial que se destaca por sua densidade intensa de casos em contraste com áreas vizinhas, podendo ser apresentado como um núcleo, tendo habitualmente seus limites pouco definidos.

O Maranhão possui uma área de 333.365,6 Km², sendo considerado o oitavo estado do Brasil em extensão territorial. Possui 217 municípios. Faz divisa ao leste e sudeste com o Estado do Piauí; ao sul e sudoeste com Tocantins e a oeste e noroeste com o Estado do Pará.

O Estado do Maranhão possui oito pólos, descritos abaixo:

PÓLO MA -1

Situado em área pertencente à pré- Amazônia, na microrregião do Gurupí e mesorregião do Oeste Maranhense, drenado pelos rios Gurupí, Maracaçumé e Turiaçú.

Municípios do pólo: Amapá do Maranhão, Boa Vista do Gurupí, Cândido Mendes, Carutapera, Centro do Guilherme, Godofredo Viana, Gov. Nunes Freire, Junco do Maranhão, Luís Domingues, Maracaçumé, Maranhãozinho, Turiaçu.

PÓLO MA-2

Inserido na região do Pindaré, em áreas da baixada maranhense ao norte , da pré- amazônia e litoral ocidental maranhense. Drenado pelos rios Turiaçu e Pericumã.

Municípios: Alcântara, Bequimão, Cedral, Central do Maranhão, Cururupú, Guimarães, Mirinzal, Pinheiro, Porto Rico do Maranhão, Santa Helena, Serrano do Maranhão e Turilândia.

PÓLO MA-3

Está localizado em uma área pertencente ao litoral nordeste e cerrado.

Compreende diversos municípios, como: Anajatuba, Axixá, Bacabeira, Bacurituba, Cachoeira Grande, Cantanhede, Humberto de Campos, Icatú, Itapecurú-Mirim, Morros Nina Rodrigues, Paço do Lumiar, Presidente Juscelino, Pres.Vargas, Rosário, Santa Rita, São Benedito do Rio Preto, São José de Ribamar, São Luís e Vargem Grande.

PÓLO MA-4

Situado em área do Maranhão no litoral nordeste e cerrado, tendo como municípios envolvidos: Anapurús, Barreirinhas, Belágua, Brejo,

Chapadinha, Mata Roma, Milagres do Maranhão, Primeira Cruz, Santa Quitéria do Maranhão, Tímbiras e Urbano Santos.

PÓLO MA-5

Representado pela área definida por mata de cocais, situada entre a floresta amazônica e a caatinga. Estão incluídos os municípios de Afonso Cunha, Aldeias Altas, leste de Buriti, Caxias, oeste e norte de Codó, Cøelho Neto, Duque Bacelar, Matões, Sul de São João do Sóter e Timon.

PÓLO MA-6

Pertencem a este pólo as regiões dos cocais e chapadões, sendo drenado pelas bacias dos rios Itapecurú - Mirim e Mearim.

Os municípios que estão inseridos neste pólo são : Barra do Corda, Bernardo do Mearim, Buriti Bravo, Colinas, Dom Pedro, Esperantinópolis, Fortuna, Gonçalves Dias, Gov. Archer, Gov. Eugênio Barros, Gov. Luiz Rocha, Graça Aranha, Igarapé Grande, Jatobá, Joselândia, Lima Campos, Mirador, Nova Iorque, Paraibano, Parnarama, Passagem Franca, Pastos Bons, Pedreiras, Porção de Pedra, Pres. Dutra, Senador Alexandre Costa, Sta. Filomena do Maranhão, Sto. Antonio dos Lopes, São Domingos do Maranhão, São João dos Patos, São José dos Basílios, São Roberto, Sucupira do Norte, Trizidela do Vale e Tuntum.

PÓLO MA-7

Localizado na mesorregião do oeste maranhense e banhado pelos rios Gurupi e Tocantins.

Descrição dos municípios: Açailândia, Buritirana, Centro Novo da Maranhão, Cidelândia, Davinópolis, Governador Edson Lobão, Imperatriz, Itinga do Maranhão, João Lisboa, Montes Altos, Ribamar Fiquene, São Francisco do Brejão, São Pedro da Água Branca, Senador Lá Rocque e Vila Nova dos Martírios.

PÓLO MA-8

Este pólo compreende os municípios de Altamira do Maranhão, Alto Alegre do Pindaré, Amarante do Maranhão, Arame, Bela Vista do Maranhão, Bom Jardim, Bom Jesus das Selva, Bom Lugar, Brejo de Areia, Buriticupu, Grajaú, Itaipava do Grajaú, Lago da Pedra, Lagoa Grande do Maranhão, Marajá do Sena, Olho d'Água das Cunhas, Paulo Ramos, Pindaré Mirim, Pio XII, Santa Inês, Santa Luzia, Sítio Novo, Tufilândia, Vitorino Freire.

A tabela 1 e a figura 1 mostram a distribuição dos pacientes com LCD, localidades de procedência dos mesmos, baseados nas informações de prontuários, tese e artigos científicos inserindo os diversos pólos de produção da doença no Estado do Maranhão. Existiu um paciente, cuja identificação não foi descrita em seu relato e outro caso teve como local de procedência a região do planalto localizada mais ao sul do Estado (Costa 1998).

Para o presente estudo somente oito (50%) pacientes deste levantamento foram analisados.

Tabela 1 – Dados sobre procedência, município do pólo de produção da doença, relator, ano do relato, identificação das cepas, de todos os indivíduos com com LCD, no Estado do Maranhão (1960 – 2004)

Paciente nome	Município procedência/ Pólo de produção da doença	Relator do caso	Ano do relato	Identificação do parasito
1 #	#	Porto Marques et al.	1960	NR
2 #	RIACHÃO	Nery-Guimarães	1963	NR
PCS	ROSÁRIO	UFMA	1977	<i>L.(L.) amazonensis</i>
MECS	SANTA LUZIA	Silva et al.	1981	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- RFO	COELHO NETO	Fonseca et al.	1986	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- MAF	PINDARÉ	Costa et al.	1987	<i>L.(L.) amazonensis</i>
RNMG	PRESID. VARGAS	Costa et al.	1991	<i>L.(L.) amazonensis</i>
AAA	PINHEIRO	Costa et al.	1991	<i>L.(L.) amazonensis</i>
RNPS	BACABAL	Costa et al.	1991	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- MCMA	URBANO SANTOS	Costa et al.	1991	<i>L.(L.) amazonensis</i>
JRP	TURIAÇU	Silveira	1993	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- AMCF	PINHEIRO	Costa et al.	1995	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- JSC	MONTES ALTO	Costa et al.	2001	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- JMS	CAXIAS	Rabello et al.	2001	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- JM	CEDRAL	Costa et al.	2002	<i>L.(L.) amazonensis</i>
- MTR	ITAPECURU	Costa et al.	2002	<i>L.(L.) amazonensis</i>

Fonte: adaptado de Costa (1998).

- = Indivíduos que participaram deste estudo

= Não consta identificação

N R= Não realização da caracterização de cepa

L.(L.) amazonensis = *Leishmania Leishmania amazonensis*

Figura 1 – Mapa mostrando os pólos de produção da LT no Maranhão, identificação dos municípios de procedência dos 16 pacientes com LCD no período de 1960 a 2004

1.8.1 Aspectos terapêuticos na LCD

Na LCD, uma das suas particularidades é ser considerada uma doença de difícil cura ou presença de melhora apenas temporária, com recaídas frequentes após o tratamento com os antimoniais (trivalentes e pentavalentes) (Costa et al. 1992; Barral et al. 1995). Os primeiros relatos sobre sua terapêutica pertencem a Silva (1945), quando descreve o uso de injeções de tártaro emético (antimonial trivalente) em um paciente com LCD sem, entretanto, obter resultados satisfatórios. Posteriormente, Convit e Lapenta (1946) na Venezuela e Barrientos (1948) na Bolívia usaram também sem sucesso esta medicação como terapêutica da LCD em seus respectivos países.

Com o advento dos antimoniais pentavalentes, a LCD passou a ser tratada com este medicamento, sendo constante os insucessos, tanto no Brasil como em outros países em que a doença foi descrita. O percentual de falha terapêutica com a utilização do Sb^{+5} , usado como única droga no tratamento da LCD é de 95% segundo alguns autores (Convit e Kerdel-Vegas 1965; Convit et al. 1987; Bryceson 1970a; Rodriguez et al. 1985; Costa et al. 1992; Barral et al. 1995).

Até o presente momento as drogas consideradas de primeira escolha no tratamento da LCD são os antimoniais pentavalentes: “Antimoniato-N-metil-gluamina (Glucantime[®]) e Estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (Sampaio 1984; Marsden 1985; Olliaro e Bryceson 1993; Costa et al. 1998; MS 2000).

Os constantes insucessos na terapia da LCD têm levado os pesquisadores à utilização de vários tratamentos alternativos no intuito de tentar-se a cura da doença, livrando, desta forma, os pacientes do estigma psicossocial conferido pela moléstia devido ao seu caráter deformante, à sua evolução crônica e à necessidade de períodos prolongados de internação hospitalar na vigência de esquemas terapêuticos, o que isola, na maioria das vezes, o paciente do seu ambiente social e de suas atividades habituais (Convit et al. 1987; Costa et al. 1991 e 1992; Barral et al. 1995).

O Ministério da Saúde (2000), recomenda na forma cutânea difusa (LCD) causada por *Leishmania(L.) amazonensis*, a dose de 20 mg/Sb⁺⁵/kg/dia, durante 30 dias. São utilizados os mesmos critérios adotados para a forma cutânea. De um modo geral, a resposta à terapêutica é habitualmente parcial, devendo os pacientes ser acompanhados por um serviço especializado durante longo período.

As drogas consideradas de segunda linha para o tratamento das leishmanioses são Anfotericina B e Pentamidinas, que pelas dificuldades de administração e potencial tóxico precisam de internação hospitalar, sendo por isso reservadas para casos clínicos especiais como a LCD. Bryceson (1970a), na Etiópia, refere cura clínica e conversão da IDRM, após a utilização de dimetassulfonato de pentamidina e Anfotericina B em 17 (51,5%) pacientes de sua casuística, sem haver recaída com um seguimento de três anos.

O sulfato de aminosidina é um aminoglicosídeo extraído de culturas do *Streptomyces cherestomyceticus*. É um potente bactericida caracterizado por apresentar amplo espectro de ação, sendo ativo contra a maioria dos patógenos Gram- negativos e um grande número de Gram-positivos. No tratamento de infecções bacterianas, atua por apresentar uma alta afinidade com a subunidade ribossômica 30S, causando uma interpretação errônea do RNA mensageiro e conseqüente união anômala dos aminoácidos, formando proteínas anômalas (Novarini et al. 1975). No caso do tratamento das leishmanioses o seu mecanismo de ação é desconhecido (Chunge et al. 1990).

1.9 Lesões ósseas na Leishmaniose Tegumentar (LT)

Os primeiros achados de comprometimento ósseo na LT foram de Arias Aranda (1930) e Arias Aranda e Rosa (1931), que mencionaram um quadro de osteomielite crônica em dois pacientes com leishmaniose, com ulceração e crostas no dorso da mão, traduzido por uma osteíte crônica

através de radiografias. Nos mesmos estudos, os autores afastaram a possibilidade dessas lesões serem produzidas por tuberculose ou sífilis.

Estudos foram realizados envolvendo observações clínicas, radiográficas e histopatológica, considerando algumas hipóteses para os mecanismos da fisiopatogênia das alterações do tecido ósseo e cartilaginoso na LT, que ainda não foram esclarecidos, como segue abaixo.

Pupo (1946), observando lesões contíguas aos ossos e articulações das extremidades dos membros, verificou a coexistência de deformidades através de exames clínico e radiológico, afirmando a necessidade de estudos que esclareçam a natureza das lesões ósseas. O autor acredita que os principais fatores responsáveis fossem distúrbios de irrigação, efeitos tóxicos da própria infecção e imobilidade. Costa (1953) definiu a leishmaniose tegumentar como condrófila, dizendo que a LT compromete geralmente pele e mucosas, sendo comum o ataque a cartilagens, e que o comprometimento do tecido ósseo não parecia ser freqüente. Descreveu ainda, um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa de longa data, chamando a atenção para um quadro de dactilite, deformidades articulares e nódulos não supurados nos dedos das mãos, sendo detectada a presença de *Leishmania braziliensis* no material obtido a partir de punção articular em uma das articulações, além de uma reação periosteal através de radiografias, acreditando ser comum agressão à cartilagem articular e dando importância ao diagnóstico diferencial com a tuberculose óssea, sífilis terciária, esporotricose e hanseníase.

Outros autores defendem a ação direta da *Leishmania* causando lesões ósseas (Pessôa e Barreto 1948; Marsden 1986). A disseminação hematogênica é defendida por Guimarães e Silva (1957), que relataram um caso de destruição óssea, com osteoporose e afinamento de falanges através de radiografias, sem lesões cutâneas. Silva (1958), descreve um caso de LT de 18 anos de evolução, resistente aos tratamentos administrados, caracterizado por grande número de lesões nodulares e sem agredir as mucosas, apresentando deformidades e reabsorção óssea dos dedos das mãos e pés.

No entanto, Bittencourt e Guimarães (1968) e Bittencourt e Freitas (1983) defendem que o comprometimento ósseo seja secundário à fibrose da pele e de partes moles adjacentes, estando relacionado à intensa proliferação fibroblástica com acentuada retração cicatricial, determinando uma espécie de encarceramento local.

Saldanha et al. (1995) chegaram a descrever um quadro de mutilações e deformidades dos dedos das mãos e pés em dois pacientes com LCD, acreditando ser devido à cicatrização retrátil da pele e tecidos adjacentes. Os autores observaram, também, através de radiografias presença de osteopenia, afilamento das falanges médias e distais e diminuição dos espaços articulares desses dedos.

Ogawa et al. (2002) descreveram um caso de uma úlcera crônica, irregular e dolorosa no hálux esquerdo de uma mulher, sem traumatismo prévio. Observaram edema e hiperemia local, que aumentava progressivamente, e mesmo com o tratamento sistêmico para infecção bacteriana evoluiu com destruição óssea. A reação de Montenegro fortemente positiva, e o estudo histológico da lesão cutânea demonstrando um processo inflamatório crônico com formação de granuloma e necrose, sem a presença do parasito, levando os autores a tratar esse indivíduo com antimonial pentavalente, havendo melhora satisfatória e cura completa após quatro meses de evolução.

1.10. Enfermidades que fazem diagnóstico diferencial com Leishmaniose Tegumentar (LT)

De um modo geral a literatura enfatiza que a LT afeta basicamente a pele e a mucosa. Na forma mucosa pode ocorrer lesão destrutiva óssea, talvez, por contigüidade, sendo considerada uma complicação da doença (Pessôa e Barreto 1948; Marsden 1986).

As principais doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LT são listadas na tabela 2. Algumas dessas doenças granulomatosas manifestam-se com alterações do tecido ósseo, sendo abordadas a seguir,

evitando-se discutir detalhadamente as suas características clínico-laboratoriais, mas enfatizando a infecção óssea, embora não existindo uma metodologia de patologia óssea que permita confrontar estas doenças (Hungria Filho 1992; Altamirando et al 2001).

O termo osteomielite denota um processo inflamatório que envolve a porção cortical e o tecido esponjoso do osso (Baltensperger et al. 2004) caracterizado pela destruição óssea (Lew et al. 1997). Uma variedade de microorganismos atinge o tecido ósseo por via sangüínea, por contigüidade dos tecidos moles adjacentes infectados e por inoculação direta (Septimus e Musher 1979; Lew et al. 1997; Ma e Chan 2002).

A infecção óssea requer uma abordagem multifacetada, podendo ser mais claramente definida através de estudos anatomopatológico e fisiopatológico (Buckholz 1987), existindo uma variedade de propostas de classificação baseadas em diversos aspectos, como: etiologia; patogenia; evolução clínica e aspectos radiográficos (Mader et al. 1996; Baltensperger et al. 2004). Os agentes infectantes mais freqüentes do tecido ósseo são bactérias e fungos (Rosenberg 2000), entretanto, na literatura encontram-se numerosos microorganismos responsáveis por esta doença, considerados raros e com características clínico-radiográfica diversas (Waldvogel e Papageorgiou 1980).

A forma crônica da osteomielite pode resultar de uma forma aguda em 15 a 30% dos casos (Kahn e Pritzker 1973), ou de uma infecção por contigüidade, que se inicia nos tecidos superficiais, podendo progredir até aos pequenos ossos das mãos e pés (Septimus e Musher 1979). Esta forma clínica reflete a presença de um tecido não viável caracterizado pela perda óssea, fístula cutânea e seqüestro ósseo, levando a um maior custo financeiro, um impacto substancial na qualidade de vida, sendo considerado um grave problema de saúde pública em diversos países, dado a dificuldade em estabelecer o diagnóstico, tratamento e reabilitação, levando esses pacientes a perda de produtividade e seqüelas na maioria dos casos (Lew et al. 1997; Gottlieb et al. 2002; Zuluaga et al. 2002).

Algumas doenças infecciosas granulomatosas com manifestação no tecido ósseo são causadas por micobactérias e fungos, e os achados histopatológicos não são específicos, sendo consideradas várias doenças como diagnóstico diferencial (Pritchard 1975; Ma e Chan 2002). Hungria Filho (1992) cita um número crescente de casos de osteomielite crônica que não apresentam fístula cutânea e sofrem reagudização periódica do processo.

De uma maneira geral para a investigação da osteomielite, utiliza-se exames de imagens (cintilografia óssea, radiografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) e para o diagnóstico definitivo, a identificação do microorganismo, através de biopsia por agulha ou a céu aberto da lesão óssea (Gottlieb et al. 2002).

Tabela 2– lista de doenças com manifestações na pele e mucosas que fazem diagnóstico diferencial com LT

LESÕES CUTÂNEAS	LESÕES MUCOSAS
1.úlcera traumática, de estase, tropical e por anemia falciforme 2. piodermite 3. paracoccidioidomicose 4. esporotricose 5. cromomicose 6. esporotricose 7. neoplasias cutâneas 8. sífilis 9. tuberculose cutânea 10. hanseníase virchowiana 11. coccidioidomicose	1. paracoccidioidomicose 2. esporotricose 3. hanseníase virchowiana 4. rinoscleroma 5. boubas 6. sífilis terciária 7. granuloma médio facial 8. neoplasias

FUNASA 2000

Serão abordadas as seguintes enfermidades: hanseníase; tuberculose; blastomicose; paracoccidioidomicose; coccidioidomicose e esporotricose.

Hanseníase:

É causa comum de lesões ósseas, e com maior freqüência, articulares. As lesões ósseas são complexas, consistindo de osteomielite, periostite, alterações vasculares, ulcerações cutâneas e alterações dos nervos. As lesões mutilantes das extremidades são a ostéolise distal e osteoartrite metatarsofalangianas (Lemos et al.2000).

As alterações específicas da hanseníase se devem à ação direta do *M. leprae*, sendo atribuídas em parte às lesões dos nervos sensoriais e motores, permitindo que traumatismos de repetição e infecções secundárias passem inadvertidos, levando a contraturas e atrofias das mãos, com deformidades em garra, mas comprometendo o esqueleto apendicular (Zimmerman e Kelly 1982).

As alterações ósseas foram descritas através das radiografias, ocorrendo entre 15-54% dos pacientes, encontradas na forma neural nas mãos e pés, iniciando-se pelas falanges distais com reabsorção óssea dos tufo, progredindo gradualmente até ao desaparecimento completo de todo o osso. As falanges proximais são as ultimas a desaparecerem. Nos pés, a absorção começa nos côndilos metatarsianos ou nas falanges proximais (Lew et al. 1997). Ocorre na maioria dos casos uma reabsorção do osso nasal, sugerindo um sinal único desta doença (Dalinka et al. 1975).

Tuberculose:

É considerada uma doença originária das Américas, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Moodie 1923). Outras espécies são conhecidas como causadora de infecção osteo-articular: *Mycobacterium kansasii*; *Mycobacterium marinum*; *mycobacterium avium* e *Mycobacterium fortuitum*, porém mais raras (Pritchard 1975).

Doença considerada um problema de saúde pública em várias partes do mundo, podendo atingir qualquer idade. A forma extrapulmonar (10% dos casos) afeta a coluna vertebral, destruindo os corpos das vértebras torácica e lombar, e alguns ossos atípicos como escápula, acrômio e ossos do pé. São lesões líticas que nos ossos curtos das mãos e pés, dão um aspecto

fusiforme na diáfise e obstrução do canal medular, denominado de “espinha ventosa”. O bacilo chega na região metafisária por via hematogênica dos ossos longos ou na porção anterior do corpo vertebral, podendo causar um quadro de paraplegia por espondilolistese (Pritchard 1975).

As infecções ósseas causadas por fungos, é também denominada osteomielite fúngica. É uma doença rara, de comportamento crônico e difícil diagnóstico. As manifestações clínicas são semelhantes a osteomielite de etiologia bacteriana, tendo como diferença a presença de fístulas múltiplas em cada foco. As lesões ósseas são mais freqüentemente encontradas na blastomicose, coccidioidomicose, actinomicose e esporotricose (Hungria Filho 1992).

Blastomicose:

O termo blastomicose norte-americana é uma denominação genérica das afecções produzidas por fungos blastomicetos, produzindo graves lesões granulomatosas, crônicas, na pele, mucosas, gânglios linfáticos, pulmões e osso, causadas pelo fungo *Blastomyces dermatitis*, sendo a forma mais comum (Hungria Filho 1992). Na região norte-americana é denominada de blastomicose, descrita como uma infecção cutânea crônica por Gilchrist em 1894. Em 1895, dois pesquisadores, Buschke e Busse, relataram o primeiro caso envolvendo o tecido ósseo. Casos foram descritos na África do Sul, Uganda, Congo, Venezuela e México (Pritchard 1975). Os ossos são envolvidos em 14 a 60% dos casos, tanto na forma disseminada quanto na forma sistêmica (doença pulmonar), pela via hematogênica (Dalinka et al. 1975; Blais et al. 1997). As localizações destas lesões são os ossos longos, costelas, vértebras e os ossos curtos das mãos e pés (Rogers 1996). No caso de lesões ósseas é comum observar úlcera cutânea. O aspecto radiográfico mostra dois padrões: cisto ou forma focal e uma forma difusa. Seqüestro ósseo é raro. O diagnóstico diferencial deve ser realizado com doença granulomatosa, tipo tuberculose (Muniz e Evans 2000).

Paracoccidioidomicose:

É causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, conhecida como blastomicose sul-americana. Doença crônica ou subaguda, granulomatosa, endêmica em áreas rurais, apresentando vários aspectos clínicos, tendo predileção pela pele, mucosas, pulmões, vasos linfáticos e sistema nervoso. Na forma clínica disseminada acomete osso e articulação por contigüidade ou disseminação hematogênica, atingindo preferencialmente a clavícula, costela e úmero, de maneira simétrica. Essas alterações são demonstradas pelas radiografias como lesões osteolíticas e sem reação perifocal, devendo-se fazer o diagnóstico diferencial com a osteomielite crônica bacteriana, hanseníase, tuberculose, leishmaniose tegumentar, osteossarcoma, linfoma e outras micoses profundas (Pritchard 1975; Nogueira et al. 2001).

Coccidioidomicose:

Descrita pela primeira vez na Argentina por Wernicke em 1892. Área endêmica, localizada no vale de San Joaquin na Califórnia (E.U.A.), América Central e América do Sul (Venezuela, Bolívia, Argentina e Paraguai). A disseminação é rara, tendo um comprometimento ósseo em 20% dos casos, podendo ter um único ou múltiplos focos de lesão óssea, de comportamento simétrico, com lesões múltiplas afetando a metáfise e diáfise dos pequenos ossos das mãos, pés e coluna vertebral (Pritchard 1975).

Esporotricose:

Considerada uma doença ocupacional, com distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais causada pelo *Sporotrichum schenckii*. Atinge o osso por disseminação hematogênica, acompanhada de lesões cutâneas. São acometidos mão, punho, joelho e pé (Dalinka et al. 1975). Inicia-se por uma pústula ou nódulo na pele, que sofreu traumatismo, evoluindo com ulceração local, podendo atingir o osso por via direta, principalmente nos membros superiores (Pritchard 1975). Semelhante a osteomielite causada por bactéria e fungo (Hungria Filho 1992).

1.11 Modelos experimentais em animais

1.11.1 Aspectos éticos da cirurgia experimental

Baseado em trabalhos experimentais elaborados no Brasil, que envolvem animais, deve-se cumprir com responsabilidade os preceitos éticos na experimentação animal, de acordo com a Lei Federal nº 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais em biotérios e centros de experiência, amparado pela declaração de Helsinki I, adotada na 18ª Assembléia Médica Mundial, Finlândia em 1964, que no item nº 1 dos Princípios Básicos enuncia: "A pesquisa clínica deve adaptar-se aos princípios morais e científicos que a justifique, devendo ser baseada em experiências de laboratório e com animais" (Goldenberg 2000).

O cumprimento destas exigências atesta o respeito que o pesquisador ético têm para com os animais recolhidos ao biotério para um sacrifício nobre (Pimenta e Silva 2001), seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

1.11.2 Aspectos técnico-científicos

Vários estudos utilizando modelos experimentais têm sido realizados em laboratório com a finalidade de tentar explicar mecanismos envolvidos na fisiopatologia de várias doenças, e os resultados têm contribuído bastante para a formulação de conceitos e patogênese desses processos (Maüel e Behin 1987). Alguns animais como o hamster (*Mesocricetus auratus*), a cobaia (*Cavia porcellus*), cães (*canis familiaris*), o coelho (*Oryctolagus cuniculum*) e o camundongo (*Mus musculus*) têm sido bastante utilizados em pesquisas experimentais, pelas suas características fisiológicas, genéticas e facilidade de manuseio, em enfermidades como a doença de Chagas, hanseníase e tuberculose (Gonçalves da Costa 1999; Druile et al. 2002).

No que se refere às leishmanioses, diferentes animais têm sido utilizados, como modelos padronizados, por apresentarem suscetibilidade diferente para algumas espécies de *Leishmania*, como exemplo, os camundongos BALB/c que parecem ser mais suscetíveis à infecção por *L.(L.) amazonensis* (Perez et al.1978; Barral et al. 1983).

Estudos mostraram o comprometimento do tecido ósseo na leishmaniose. Buracco et al. (1997) realizando estudos em cães infectados por *L.(L.) donovani* chamaram atenção para o desenvolvimento de um quadro de osteomielite associado a artrosinovite sugerindo que as leishmanioses devam ser incluídas no diagnóstico diferencial de doenças que apresentem sinais de sinovites e achados radiográficos de osteomielite em cães, em áreas endêmicas. Recentemente, Abreu (2003) demonstrou, através de estudo experimental em camundongos BALB/c e C57B/6, a presença de *L.(L.) amazonensis* parasitando vários tecidos, dentre os quais o tecido nervoso central e o ósseo.

Ao analisar os fatos ocorridos na história da LT, abordados anteriormente, houve uma necessidade de se caracterizar as alterações ósseas, por parte desses estudiosos, além de excluir outras doenças conhecidas por agredir o tecido ósseo.

E de um modo geral, através do estudo histopatológico, as infecções ósteo-articulares, quando apresentam lesões granulomatosas podem ser agrupadas como de etiologia bacteriana e micótica, sendo difícil estabelecer um diagnóstico ou escolher o tratamento adequado (Pritchard 1975; Marrero et al. 2001).

Portanto, a partir desses dados da literatura, principalmente sobre LCD, e das nossas observações sobre alguns casos desta forma clínica, surgiram alguns questionamentos e situações para serem refletidas, como se expõem a seguir:

1. evidências de limitação funcional articular grave, em pacientes portadores de LCD com deformidades, nas extremidades distais dos membros superiores e inferiores;

2. estudos sugerem uma predileção do parasito na LT pelo tecido cartilaginoso;
3. são poucos os estudos que tratam da etiologia e fisiopatogênia das alterações ósseas na LCD;
4. são vários os agentes etiológicos que causam infecção óssea com características definidas, como bactérias, micobactérias e fungos;
5. não foi descrito ainda o protozoário, particularmente a *Leishmania*, como agente etiológico de infecção óssea;
6. a pesquisa de *Leishmania* não é realizada quando se procura identificar os agentes etiológicos responsáveis pela infecção do tecido ósseo, mesmo em áreas endêmicas, onde apenas bactérias e fungos são pesquisados por serem citados na literatura.

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

Este estudo se justifica, em função dos poucos relatos existentes na literatura que abordam as alterações do tecido ósseo e cartilaginoso na LT, os quais, não explicam o comprometimento desses tecidos na forma cutânea difusa (LCD). Ao longo da história, os estudos que abordaram o tema concentraram-se nas observações clínicas, radiografias e na visão paleopatológica, numa tentativa de explicar as lesões ósseas que alguns indivíduos com LT apresentavam (Pupo 1946; Costa 1953; Rodriguez et al. 1988; Saldanha et al. 1995; Altamirano 2001; Ogawa et al. 2002).

A LCD é uma doença de ocorrência rara, pois, no Brasil até 1998 eram conhecidos 31 casos, tendo o Estado do Maranhão contribuído com 10(32%) da casuística nacional (Costa 1998). A doença apresenta um comportamento único, com aspectos que necessitam de esclarecimentos, tais como: mecanismos imunogenéticos; difícil resposta terapêutica; desconhecimento da etiologia e fisiopatogenia do comprometimento do tecido ósseo.

O presente estudo analisa a associação entre a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e as lesões ósseas encontradas em oito pacientes com LCD, procedentes do estado do Maranhão, através de exames de imagens (cintilografia óssea trifásica e radiografias) e anatomo-patológico, além de inferir através de um modelo experimental de infecção óssea crônica produzida pela referida *Leishmania*, contribuindo com outros autores que no passado, estudaram alguns aspectos sobre o comprometimento ósseo e cartilaginoso da doença, sem responder qual o papel do parasito na destruição destes tecidos.

HIPÓTESE

3. Hipótese:

A *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* é responsável pelas alterações do tecido ósseo em pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD).

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1 Geral:

Estudar as alterações ósseas observadas em pacientes com LCD, através de exames clínico, de imagens e anatomopatológico.

4.1.1 Específicos primários:

4.1.1.1-Characterizar os aspectos clínico, radiográfico, cintilográfico e histopatológico das alterações ósseas em pacientes com LCD;

4.1.1.2-Demonstrar a relação da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na patogenia da lesão óssea em indivíduos com LCD;

4.1.2 Específicos secundários:

4.1.2.1-Characterizar o padrão de resposta inflamatória no tecido ósseo, através de modelo experimental, utilizando cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos BALB/c.

4.1.2.2-Demonstrar as alterações ósseas em camundongos BALB/c utilizando cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isoladas de pacientes portadores de LCD.

MÉTODOS

5. Métodos

5.1 Aspectos éticos

Para o desenvolvimento do estudo, oito pacientes com LCD procedentes do estado do Maranhão, foram cadastrados no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão/NPTMS-UFMA, onde após realização de exames complementares foram transferidos para o Hospital dos Servidores do Estado do Maranhão - HSE, sendo internados em enfermaria especializada, para complementação diagnóstica e avaliação terapêutica.

Os pacientes foram informados previamente sobre o caráter da pesquisa, além de explicações sobre as vantagens, os possíveis riscos e lhes assegurando o direito de desistir da mesma no momento que desejassem. Preparou-se um termo de consentimento informado, para a participação no estudo, o qual foi assinado, ou colocado à impressão digital do paciente no documento (ANEXO A).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos comitês de ética do Departamento de Patologia do Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão - HPD/UFMA e do Departamento de

Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP (ANEXO B e C). As etapas de investigação foram realizadas na Clínica de Ortopedia e Traumatologia do HSE-MA, com apoio do NPTMS-UFMA, e no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Departamento de Patologia da FMUSP.

Um contato prévio foi realizado com a direção clínico-administrativa do HSE-MA, apresentando uma proposta de internação por um período estimado de dois meses para cada paciente, com o objetivo de realizar o estudo e oferecer aos mesmos uma opção terapêutica com Anfotericina-B-lipossomal, disponibilizada pela Gerência Nacional das Leishmanioses da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil/SVS-MS.

5.2 Equipe de apoio

A equipe que participou do estudo foi composta pelos seguintes profissionais:

- Um médico especializado em Ortopedia e Traumatologia, responsável pela coordenação e execução da pesquisa;
- Dois estudantes de graduação do curso de Medicina da UFMA, responsáveis pela realização da admissão e acompanhamento dos pacientes;
- Equipe paramédica pertencente à Clínica de Ortopedia e Traumatologia do HSE-MA, composta de enfermeiras, bioquímicos, auxiliares de enfermagem e técnicos de laboratório responsáveis pelo manuseio diário dos pacientes;

- Equipe médica do NPTMS-UFMA, responsável pelo acompanhamento clínico dos pacientes;
- Equipe de profissionais do LIM-50/FMUSP, composta de professores e técnicos especializados no manejo do material coletado dos pacientes;
- Dois técnicos da Fundação Nacional de Saúde/FUNASA-MA, cuja função era localizar e auxiliar no deslocamento dos pacientes até a unidade hospitalar.

5.3 Desenho do estudo

Iniciou-se em setembro de 2001, com a realização dos cadastros dos casos de LCD procedentes de diversas regiões do estado do Maranhão. O estudo foi delineado em dois modelos: observacional em humanos (Fase I) e experimental em animais (fase II). O modelo observacional em humanos foi desenvolvido no NPTMS-UFMA, na Clínica de Ortopedia e Traumatologia do HSE-MA, e pelo LIM-50/FMUSP; e o experimental, utilizando animais de laboratório (camundongos BALB/c), foi desenvolvido no LIM-50/FMUSP.

5.3.1 Estudo observacional em humanos (Fase I)

Os indivíduos incluídos apresentavam vários tipos de lesões cutâneas localizadas em membros superiores (MMSS) e inferiores (MMII) e face, associado a deformidades nos dedos das mãos e/ou pés. Foram cadastrados no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do NPTMS-UFMA, onde realizaram os exames complementares específicos:

imunológicos (intradermorreação de Montenegro-IDRM e imunofluorescência indireta-RIFI) e parasitológico (anatomopatológico das lesões cutâneas e isolamento de cepas em meio de cultura), após confirmação diagnóstica os mesmos foram internados na Clínica de Ortopedia e Traumatologia do HSE-MA, sendo submetidos à avaliação clínica (história e exame físico), exames complementares inespecíficos (cintilografia óssea trifásica; radiografia), procedimento cirúrgico (biópsia do tecido ósseo) e avaliação terapêutica, conforme o cronograma de execução para cada paciente (ANEXO D).

NPTMS-UFMA e HSE-MA

- Dia (0) – Cadastro e inclusão do paciente no ambulatório do NPTMS-UFMA, realização de exame clínico (história e exame físico), e exames complementares específicos para LCD: imunológico – IDRM e RIFI, parasitológico – histopatológico e isolamento em meio de cultura e hamster. Encaminhamento do material coletado (amostra de pele) para os laboratórios LIM-50/FMUSP-SP e Laboratório de Imunoparasitologia do CPQGM/FIOCRUZ-Bahia (LIPI);
- Dia (4) – Inclusão do paciente no estudo; internação na Clínica de Ortopedia e Traumatologia do HSE com reavaliação clínica e análise dos exames complementares específicos imunológicos;

- Dia (5) – Realização do exame complementar inespecífico de imagem (cintilografia óssea trifásica do sistema músculo-esquelético);
- Dia (7) – Realização do exame complementar inespecífico de imagem (radiografia do sistema músculo-esquelético);
- Dia (10) – Biópsia do tecido ósseo, conforme orientação dos exames de imagens e encaminhamento do material coletado (amostra de tecido ósseo) para o laboratório LIM-50/FMUSP-SP;
- Dia (11) – Início do esquema terapêutico com anfotericina-B-lipossomal;
- Dia (60) – Alta hospitalar e acompanhamento ambulatorial, após melhora clínica.

LIM-50/FMUSP

- Dia (0) – Recebimento dos materiais biopsiados (tecidos ósseo e cutâneo) pelos técnicos do LIM-50/FMUSP, cadastro e processamento dos mesmos;
- Dia (7) – Análise através de microscopia óptica do material de pele utilizando a coloração de hematoxilina eosina (HE);
- Dia (15) – Análise através de microscopia óptica do material ósseo utilizando as seguintes técnicas de coloração: HE; Ziehl-Neelsen; Gomori-Grocott e Imunohistoquímica;
- Dia (60) – Análise final e conclusão dos resultados.

5.3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo oito pacientes com LCD procedentes de diversas regiões do Estado do Maranhão, obedecendo aos critérios adotados (Convit et al. 1957, 1962 e 1989):

- Lesões nodulares, inicialmente localizadas e posteriormente acometendo grandes áreas do corpo;
- Riqueza de parasitos nas lesões;
- Número intenso de macrófagos parasitados, detectados pelo exame histopatológico;
- Ausência de comprometimento visceral;
- Intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativo;
- Evolução crônica da doença;
- Tratamento clínico utilizando o antimonial pentavalente (Sb^{+5}), produz apenas melhora temporária.

5.3.1.2 Critérios de exclusão:

- Indivíduo não aderir ao protocolo de estudo;
- Não ser portador de LCD;
- Apresentar infecção óssea de etiologia comprovada;
- Não ocorrer hipercaptação na fase tardia pela cintilografia óssea trifásica.

5.3.1.3 Definição das lesões cutâneas encontradas nos pacientes portadores de LCD/MA, segundo Sampaio (1988):

- Nódulo – definido como uma lesão elipsóide ou redonda, sólida e palpável, de um a três centímetros de diâmetro, podendo envolver a epiderme, derme ou hipoderme, podendo atingir a tecido celular subcutâneo;
- Placa infiltrada – elevação acima da superfície cutânea, que ocupa uma área relativamente grande em comparação a sua altura acima da pele. Aspecto espessado e consistência aumentada de limites imprecisos, resultante da presença de infiltrado celular na derme, às vezes, com edema e vasodilatação;
- Exulceração traumática – perda superficial somente da epiderme por traumatismo (figura 2);
- Cicatrizes atróficas – Lesão de aspecto variável, saliente ou deprimida, móvel, retrátil, fina e pregueada. Resultante da reparação de processo destrutivo da pele, associado à atrofia e fibrose.
- Crostas – concreção de cor amarelo—clara, esverdeada ou vermelho escura, que se forma em área de perda tecidual. Desenvolvem-se quando o soro, sangue ou exudato purulento seca na superfície da pele. Quando o exudato envolve toda a epiderme, as crostas podem ser espessas e aderentes.

Fig. 2 – A. Exulceração traumática no primeiro dedo do pé esquerdo, antes do tratamento. **B.** Cicatrização da exulceração sem retração da pele.

As lesões foram encontradas em sua maioria nos membros superiores e inferiores. Os critérios de leitura do comprometimento de cada lesão (grau de intensidade) foram verificados empregando-se uma escala arbitrária de positividade: uma cruz em três cruces (+/+++ = leve); duas a três cruces (++/+++ = moderado); três em três cruces (+++/+++ = intenso) na presença dos parasitos, e negatividade (0) quando não se observavam tais lesões.

5.3.1.4 Definição das alterações encontradas nos exame físico e radiográfico dos pacientes portadores de LCD/MA:

- Encurtamento ósseo - diminuição do comprimento do osso;
- Deformidade em flexão – alteração observada no exame clínico da mão ou pés;
- Braquidactilia de falange – deformidade em abdução observada, principalmente, nos dedos dos pés ;
- Reabsorção da falange distal - destruição parcial da porção distal, corresponde aos côndilos da falange.

As deformidades foram encontradas nos dedos das mãos e pés, não sendo detectado em outras regiões do corpo. Os critérios de leitura dos resultados foram verificados empregando-se uma escala de presença de deformidades (P) e ausência de deformidade (0).

5.3.1.5 Procedimentos diagnósticos da LCD - Exames complementares específicos

5.3.1.5.1 Estudo imunológico dos pacientes com LCD

Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

A IDRM foi realizada em todos os pacientes da amostra, para confirmação diagnóstica, dia (0) no ambulatório do NPTMS-UFMA. O antígeno utilizado foi fornecido pelo Ministério da Saúde através da FUNASA, Coordenação Regional do Maranhão, sendo o mesmo produzido a partir de formas promastigotas de *L.(L) amazonensis* mortas por ultra-sonicação e padronizado em 40µgN/ml por MELO et al. (1977). Após assepsia com álcool a 70%, inoculou-se com seringa do tipo tuberculínica 0,1ml da suspensão do antígeno por via intradérmica, na face anterior do antebraço direito. A leitura da reação foi efetuada após 48 a 72 horas após o inóculo, utilizando régua milimetrada; marcando-se a borda da induração com caneta esferográfica (Sokal et al. 1975). A interpretação foi baseada na área de induração apresentada, sendo adotado os seguintes valores de referência: <5 mm = negativo, ≥ 5mm = positivo (Marzochi et al. 1980).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Foram colhidos 8 a 10 ml de sangue em tubo “vacutainer” sem heparina, deixando-se coagular a temperatura ambiente. Realizou-se em seguida centrifugação da amostra e separação do soro com pipetas tipo “Pasteur” de forma asséptica, sendo colocados em tubos de ensaio, identificados e datados. Posteriormente estes foram mantidos a 4°C em refrigeração. Todos os pacientes realizaram o exame no dia (0) do cronograma de estudo.

O antígeno para a reação de imunofluorescência indireta foi preparado com formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* no Laboratório de Sorologia do NPTMS-UFMA, segundo técnica padronizada no referido laboratório.

As lâminas contendo os parasitos foram incubadas em estufa 37°C com os soros dos diferentes pacientes na diluição de 1:40 (cutt off da reação) por 30 minutos em câmara úmida. Após 3 lavagens de 5 minutos cada com tampão PBS 0,01M pH7.4 contendo 0,05% de Tween 20, as lâminas foram incubadas com anti-gamaglobulina humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína, na diluição de 1:100 em solução de Azul de Evans a 0,5% em tampão PBS, por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween, montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH9.5, e observadas em microscópio de fluorescência. A análise de positividade da reação foi feita comparativamente considerando-se os controles negativo e positivo.

5.3.1.5.2 Estudo parasitológico dos pacientes com LCD

Exame histopatológico da lesão cutânea:

Dois fragmentos eram obtidos por biopsia realizada com bisturi tipo “ punch” de 4mm, no dia (0) do cronograma de execução, utilizando anestesia local a base de xylocaina a 2% sem vasoconstrictor. Após realização o material era armazenado em frascos identificados contendo formol tamponado a 10% após a colocação do lacre eram enviados por via aérea, para exame histopatológico no LIM-50/FMUSP.

No LIM-50, os fragmentos de biópsias dos tecidos de pele foram processados em histotécnico e emblocados em parafina histológica, cortados com 5µm e montados em lâminas previamente tratadas com silano (3-Aminopropilttriethoxy-silane, SIGMA).

Realizou-se a desparafinização a quente deixando as lâminas em estufa a 58°C por 15 minutos e xilol quente por 15 minutos. A desparafinização a frio consistiu em banho de xilol por 15 minutos em temperatura ambiente.

A hidratação foi realizada em banhos de 3 a 5 minutos em álcool etílico em concentrações decrescentes de 100%, 95%, 80%, 70%, 50%, água corrente por 10 minutos e imersão em água destilada.

A recuperação antigênica dos cortes foi realizada em solução de ácido cítrico 10mM pH 6.0 em panela de pressão, cronometrando-se 3 minutos após a instalação da pressão. A pressão foi retirada e as lâminas

foram mantidas em temperatura ambiente com a finalidade de resfriar os cortes.

Neste laboratório, o material era incluído em parafina histológica e cortes de 5 micra de espessura foram realizados e corados pela H & E. Os cortes foram observados em microscopia de luz para caracterização das lesões histológicas de pele.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com três banhos de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 volumes, e em outros três banhos com solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 2,5%. Após lavagem em água corrente, seguiu-se incubação com solução de soro normal suíno 1,5% diluído em PBS, em câmara úmida a 37°C por 1 hora, com a finalidade de bloquear ligações imunes inespecíficas. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução de leite em pó desnatado MOLICO diluído em água destilada (60g/100ml) a temperatura ambiente por 30 minutos, para bloqueio de ligações iônicas. O excesso ao redor dos cortes foi absorvido com papel filtro, seguindo-se incubação com o anticorpo primário anti-Leishmania produzido em camundongo (Laboratório de Moléstias Infecciosas - LIM50 - do Depto Patologia da FMUSP) na diluição de 1/1000 em tampão PBS 1% BSA, em câmara úmida a 37°C por 1 hora e posteriormente a 4°C “overnight”.

Após este procedimento os cortes foram submetidos a três lavagens sucessivas por 10 minutos em tampão PBS.

Os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado (Kit LSAB Plus - DAKO) a 37°C por 30 minutos, seguindo-se três lavagens

sucessivas com tampão PBS, 10 minutos cada. A seguir, incubou-se com Streptavidina-Peroxidase (Kit LSAB plus - DAKO) a 37°C por 30 minutos, realizando após este tempo três lavagens em solução tampão PBS.

Para a revelação da reação foi utilizado como cromógeno a Diaminobenzidina – DAB (SIGMA) em solução de 0,06g/100ml de PBS, acrescido de 1ml de peróxido de hidrogênio 20 volumes, com incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas em soluções crescentes de álcoois, xilol e montadas em resina com lamínulas.

A lâminas foram observadas em microscopia de luz convencional e interpretadas analisando-se a positividade da reação em relação aos controles negativo e positivo.

5.3.1.5.3 Cultura em meios artificiais

Com seringas de 10ml e agulhas de 22g descartáveis, contendo 0,5ml de água destilada, foram realizados aspirados dos bordos da lesão anestesiada. Utilizou-se os seguintes meios:

- Meio agar sangue Difco-bifásico (Walton et al. 1977).
- Meio de Schneider, Gibco Labs. N.Y. USA (Hendricks e Wright 1979).

O procedimento era realizado de forma asséptica, utilizando-se uma fonte de calor próximo ao local de realização do exame. Logo após ser

colhido, o material era colocado à temperatura de 4⁰ C em caixas térmicas e transportado para o LIPI, onde o material foi processado.

Caracterização e identificação das cepas (ANTICORPOS MONOCLONAIS)

Desenvolvida no LIPI, através da técnica da imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando anticorpos monoclonais para identificação de promastigotas de *Leishmania*, de acordo com McMAHON-PRATT et al. (1985).

Os clones empregados e sua respectiva especificidade estão relacionados abaixo:

Código do clone	Especificidade
LXVIII 4 E 12DS	<i>L. L. mexicana</i>
LX2H7 E 10 B10	<i>L. L. amazonensis</i>
LX IF 9 D8	<i>L. L. amazonensis</i>
IX IF 9 D8	<i>L. L. amazonensis</i>
LX VII ID 7 B8	<i>L. (V.) mexicana</i>
VII 2C5 c5 (p2)	<i>L. (V.) braziliensis</i>

Cepas de *Leishmania* isoladas dos oitos pacientes foram cultivadas em meio Schneider com 20% de soro bovino fetal (Flow Lab.), em garrafa plástica de 25cm². Após oito dias de cultivo, foram lavadas a 1.500rpm por dez minutos e o sedimento de promastigotas ressuspenso em PBSSBF e NaN₃(pH 7.8), e iniciada a IFI pela citocentrifugação.

Comprovação da tipagem das cepas

Foi feita através da caracterização em cortes de parafina, utilizando anticorpo monoclonal anti-amastigota de *L. amazonensis*.

5.3.1.6 Procedimentos diagnósticos das alterações ósseas dos pacientes com LCD. Estudo através dos exames complementares inespecíficos de imagens

Os exames foram realizados seguindo o protocolo dos serviços onde foram adquiridas as imagens .

- **Cintilografia óssea trifásica**

Os exames cintilográficos foram realizados, após liberação do procedimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS), em clínica especializada, localizada na cidade de São Luís/MA, seguindo um protocolo único para o procedimento do exame. Para todas as fases da cintilografia óssea foi utilizada uma gama câmara digital da marca SIEMENS modelo DIACAM, de campo retangular. O software utilizado para processamento de imagens e documentação dos exames foi o ICON (Siemens 1998).

Técnica da cintilografia óssea trifásica

Os pacientes foram encaminhados ao setor de medicina nuclear, em uma clínica privada, sendo agendados individualmente os exames após

discussão com médico assistente. A consulta com o médico especialista em medicina nuclear visava coletar dados sobre a história da doença e exame físico, a fim de se definir as regiões que seriam estudadas. O radiofármaco utilizado foi o ^{99m}Tc -MDP, com dose padronizada entre 35 e 50 mCi. O ponto de injeção do traçador foi escolhido sempre à distância da região anatômica com predomínio das lesões. A administração do radiofármaco era realizada por via endovenosa.

Foram adquiridos estudos seqüenciais segundo as etapas descritas abaixo:

Fase de fluxo ou “angiográfica” - imagens obtidas com seqüência de aquisição de 30 quadros de 3 segundos cada, em matriz de imagem de 64 linhas por 64 colunas (64 X 64). A região a ser estudada era aquela onde havia predomínio de lesões cutâneas;

Fase de equilíbrio ou “pool sangüíneo” - as imagens foram realizadas na face plantar, palmar ou outra região anatômica com predomínio de lesões cutâneas. Cada imagem era obtida com tempo de aquisição de 60 segundos, iniciadas imediatamente após a fase de fluxo, com matriz de 128 X 128;

Fase tardia - Imagens realizadas entre 8 e 12 horas após injeção, obtidas das regiões plantar e palmar, imagens de corpo inteiro na projeção anterior e posterior, e imagens adicionais de áreas de interesse clínico.

O especialista em medicina nuclear analisava o exame individualmente, identificando visualmente três áreas, na mesma região anatômica estudada. Uma área definida de lesão óssea (LO), caracterizada por hipercaptação na fase tardia. Outra área definida como lesão de tecidos

moles (LTM), caracterizada por hipercaptação apenas na fase de equilíbrio; e uma área de aspecto normal (N) em ambas às fases.

Através do programa de processamento de imagens, foram aplicadas regiões de interesse e realizada uma mensuração da taxa de contagens (contagem/pixel) dessas áreas escolhidas.

As taxas de contagens das áreas definidas, LO e LTM, foram confrontadas com N. Com estes valores, foram obtidas as relações lesão óssea/normal (LO/N) e lesão de tecidos moles/normal (LTM/N), tanto na fase de equilíbrio quanto na fase tardia. Com as relações LO/N e LTM/N calculadas, pode-se obter os “índices de fixação” para lesão óssea (IFLO) e lesão de tecidos moles (IFLTM).

O índice de fixação foi calculado a partir da divisão das relações LO/N e LTM/N da fase tardia pela fase de equilíbrio. A partir dos índices de fixação estabelecidos, foi estabelecida uma relação direta de proporcionalidade para cada paciente (IFLO:ILTM).

As fases de equilíbrio e tardia foram suficientes para a obtenção dos índices e relações gerados, bem como caracterização das lesões, escolha do local para a realização da biópsia óssea em área de atividade metabólica, além de excluir a interferência das captações de tecidos moles na interpretação do estudo.

- **Radiografias das regiões anatômicas estudadas**

Os exames radiográficos foram realizados no setor de radiologia de um hospital privado, na cidade de São Luís-MA. As imagens foram obtidas através do sistema Kodak Direct View CR 800. Foi optado por esse sistema por melhor definição da imagem, dando detalhes em brilho, menor risco de exposição dos pacientes aos raios-x e armazenamento em disco compacto (Kodak 2000).

Técnica do exame radiográfico

Os pacientes foram submetidos aos exames radiográficos da região anatômica de interesse, de acordo com o resultado da cintilografia óssea trifásica e exame físico. Eram obtidas imagens das regiões selecionadas em dois planos, como se segue:

- Aquisição de imagens em aparelho de raios – x, convencional de 500 MA, marca EMIC. Para os membros inferiores foi utilizado foco de 100, tempo de 0,10ms e KV 55, e para os membros superiores foco de 100, tempo de 0,08ms e KV 55;
- Através de um programa de computação, da máquina digitalizadora, ocorre a conversão de uma imagem analógica em imagem digital;
- O processamento e a produção da imagem ocorre através de uma placa de captura, que armazena informações iniciais no programa da máquina digitalizadora;

- As imagens são documentadas em arquivos específicos e prontos para o processo de impressão, através do sistema DRYVIEW 81.000.

Todas as imagens foram descritas, caracterizando as alterações do tecido ósseo encontradas em cada paciente.

5.3.1.7 Estudo histopatológico das alterações ósseas:

A partir da identificação da lesão óssea através dos exames de imagens, realizou-se biopsia no dia (10) do cronograma de execução. Em todos os pacientes era explorada cirurgicamente uma única lesão, respeitando o aspecto ético da pesquisa, não realizando outros procedimentos em várias regiões anatómicas de um mesmo indivíduo. Exceto no caso (MAF), que foi submetida a duas biopsias em uma mesma região, seguindo orientação da hipercaptação no terceiro dedo e, pela lesão osteolítica do quarto dedo da mão direita. Todas as amostras de material foram acondicionadas em formol a 10 %, identificadas e enviadas para o LIM-50. Neste laboratório foram realizados estudos histopatológicos através dos seguintes métodos de coloração: Hematoxilina-Eosina (H&E) – indicado como coloração básica; coloração de Ziehl-Neelsen – utilizado para os bacilos álcool ácido resistentes, variante de Klingmuller. indicado nos casos suspeitos de hanseníase ou tuberculose; coloração de Gomori-Grocott – usado na pesquisa de fungos.

Descrição da técnica de biopsia: paciente em jejum no centro-cirúrgico, com o membro selecionado preparado, utilizando anestesia regional com

sedação; técnica de assepsia e anti-sepsia da região, seguido da colocação de campos operatórios; via de acesso a céu aberto em área adjacente às lesões cutâneas; fragmentos da lesão óssea foram obtidos utilizando instrumental cirúrgico adequado; após perfeita hemostasia, era feita a sutura da incisão por plano; as amostras do tecido era armazenadas em frascos identificados, contendo formol tamponado a 10%; que após colocação do lacre foram enviados para o LIM-50/FMUSP para preparo do material.

LIM- 50/FMUSP

Macroscópia: após a fixação de todo o material em formol a 10%, os fragmentos eram medidos, identificados e as características do tecido, como consistência e coloração eram anotadas. O material foi descalcificado em solução de ácido nítrico em 100ml de água destilada, por 60 a 90 minutos. O material foi colocado no histotécnico seguindo-se banhos de álcool a 70%; álcool a 90%; álcool absoluto; xilol e parafina. Em seguida o material foi emblocado e cortes foram submetidos as seguintes técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina (H&E); Ziehl-Neelsen; Gomori-Grocott.

A interpretação do material processado foi feita de maneira descritiva, destacando a pesquisa de microorganismo.

- Estudo histopatológico das alterações ósseas através da técnica de imunohistoquímica

Os fragmentos de biópsias dos tecido ósseo foram processados em histotécnico e emblocados em parafina histológica, cortados com 5µm e

montados em lâminas previamente tratadas com silano (3-Aminopropiltriethoxy-silane, SIGMA).

Realizou-se a desparafinização a quente deixando as lâminas em estufa a 58°C por 15 minutos e xilol quente por 15 minutos. A desparafinização a frio consistiu em banho de xilol por 15 minutos em temperatura ambiente.

A hidratação foi realizada em banhos de 3 a 5 minutos em álcool etílico em concentrações decrescentes de 100%, 95%, 80%, 70%, 50%, água corrente por 10 minutos e imersão em água destilada.

A recuperação antigênica dos cortes foi realizada em solução de ácido cítrico 10mM pH 6.0 em panela de pressão, cronometrando-se 3 minutos após a instalação da pressão. A pressão foi retirada e as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente com a finalidade de resfriar os cortes.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com três banhos de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 volumes, e em outros três banhos com solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 2,5%. Após lavagem em água corrente, seguiu-se incubação com solução de soro normal suíno 1,5% diluído em PBS, em câmara úmida a 37°C por 1 hora, com a finalidade de bloquear ligações imunes inespecíficas. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução de leite em pó desnatado MOLICO diluído em água destilada (60g/100ml) a temperatura ambiente por 30 minutos, para bloqueio de ligações iônicas. O excesso ao redor dos cortes foi absorvido com papel filtro, seguindo-se incubação com o anticorpo

primário anti-Leishmania, produzido em camundongo (LIM-50/FMUSP) na diluição de 1/1000 em tampão PBS 1% BSA, em câmara úmida a 37°C por 1 hora e posteriormente a 4°C “overnight”.

Após este procedimento os cortes foram submetidos a três lavagens sucessivas por 10 minutos em tampão PBS.

Os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado (Kit LSAB Plus - DAKO) a 37°C por 30 minutos, seguindo-se três lavagens sucessivas com tampão PBS, 10 minutos cada. A seguir, incubou-se com Streptavidina-Peroxidase (Kit LSAB plus - DAKO) a 37°C por 30 minutos, realizando após este tempo três lavagens em solução tampão PBS.

Para a revelação da reação foi utilizado como cromógeno a Diaminobenzidina – DAB (SIGMA) em solução de 0,06g/100ml de PBS, acrescido de 1ml de peróxido de hidrogênio 20 volumes, com incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas em soluções crescentes de álcoois, xilol e montadas em resina com lamínulas.

A lâminas foram observadas em microscopia de luz convencional e interpretadas analisando-se a positividade da reação em relação aos controles negativo e positivo.

5.3.1.8 Esquema terapêutico utilizado

Em função da resposta terapêutica obtida nos diversos ensaios clínicos realizados com a utilização da Anfotericina-B-lipossomal nas leishmanioses, a mesma foi utilizada como droga de escolha nesse estudo (Bryceson 1970a, Dietze et al. 1977).

A referida droga foi disponibilizada pela SVS/Ministério da Saúde do Brasil.

Esquema terapêutico: Anfotericina-B-lipossomal (Ambisome[®]) – dose de 1mg/kg/dia/30 dias, com dose máxima de 50 mg/dia. Utilizou-se intervalo de 30 dias para descanso do paciente e avaliação clínica. À 2ª série do medicamento foi realizada quando constatada melhora satisfatória do paciente – regressão equivalente a 50% das manifestações clínicas observadas antes do tratamento.

O esquema terapêutico foi iniciado no dia (11) do cronograma de execução, do estudo observacional em humanos após a realização dos exames laboratoriais, de imagens e histopatológico. O Ambisome[®] utilizado no estudo apresenta-se comercialmente em frasco-ampola liofilizada. Cada frasco-ampola contém 50mg de anfotericina BBP encapsulada em lipossomas, para administração parenteral. Optou-se pela via endovenosa, com o paciente internado, deitado em decúbito dorsal, durante um tempo de administração de 60 minutos.

Modo de Preparo – Adicionou-se 12ml de água estéril para injeção em cada frasco de Ambisome[®], resultando em uma preparação contendo 4mg/ml de anfotericina B. Posteriormente era agitado o frasco vigorosamente por 15 segundos a fim de dispersar completamente o Ambisome[®], em seguida calculava-se a quantidade da preparação reconstituída a ser administrada.

5.3.2 Estudo experimental em animais (Fase II)

Desenvolvido no LIM-50/FMUSP, no período de maio a outubro de 2002, utilizando-se oito camundongos da linhagem BALB/c, e cepas de *L. (L.) amazonensis* de quatro pacientes do estudo. O cronograma de execução segue abaixo.

- Dia (0)- Início do período de adaptação dos animais no LIM-50, solicitação das cepas de *L. (L.) amazonensis* junto ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- CPQGM/FIOCRUZ-BA;
- Dia (5)- Chegada das cepas de *L. (L.) amazonensis* de quatro pacientes com LCD no LIM-50 (MCMA,JSC,JMS,RFO);
- Dia (9)- Inoculação das cepas em todos os animais, ficando os animais em gaiolas individuais após esta etapa;
- Dia (10)- Início das observações clínicas;
- Dia (90)- Realização do sacrifício e coleta do tecido ósseo de quatro camundongos BALB/c. Envio do material coletado para o setor de anatomopatologia da FMUSP;
- Dia (100)- Análise dos materiais através de microscopia óptica, no LIM-50, pela técnica de coloração de HE;

- Dia (120)- Realização do sacrifício e coleta do tecido ósseo de quatro camundongos. Envio do material para o laboratório de anatomo-patologia da FMUSP;
- Dia (130)- Análise dos materiais através de microscopia óptica, no LIM-50, pela técnica de coloração de HE;
- Dia (150)- Resultado final dos materiais de tecidos ósseos analisados.

5.3.2.1 Protocolo experimental

Foram utilizados oito camundongos da linhagem BALB/c, adultos (oito semanas), machos, sadios, obtidos no biotério do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM 50), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno, mantidos em temperatura ambiente e ampla ventilação, recebendo água e alimentação ad libitum, respeitando o ciclo dia e noite dos mesmos. Esses animais passaram por um período de adaptação de 8 (oito) dias no LIM 50, antes da realização do experimento.

Quatro cepas de *Leishmania (L.) amazonensis*, isoladas e caracterizadas por anticorpo monoclonal, dos pacientes que participam do estudo. Foram inoculados, sob anestesia com éter, no coxim da pata traseira de cada animal, com 50ul de solução fisiológica contendo 10^7 amastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Os animais foram marcados com ácido

pícrico e mantidos isolados, aguardando o tempo de evolução clínica, para em seguida serem sacrificados (Quadro 3).

TABELA 3 – Distribuição da amostra dos camundongos BALB/c, destacando idade dos animais, cepa utilizada, cepa isolada do paciente, caracterização e tempo de evolução

Animal	Idade/ meses	Espécie Leishmania	de Paciente com LCD/ cepa isolada/ caracterização	Evolução
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MCMA MHOM/BR/90/BA 338	90 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MCMA MHOM/BR/90/BA 338	90 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	JSC MHOM/BR/90/BA 760	90 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	JSC MHOM/BR/90/BA 760	90 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	JMS MHOM/BR/90/BA 821	120 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	JMS MHOM/BR/90/BA 821	120 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	RFO MHOM/BR/90/BA 337	120 dias
BALB/c	2 meses	<i>L.(L.) amazonensis</i>	RFO MHOM/BR/90/BA 337	120 dias

Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador, previamente treinado, em estudo piloto como proposto por Lech et al. (1996). Os animais, inicialmente, foram submetidos à sedação por 3 a 4 minutos, em câmara de indução individual, contendo éter sulfúrico impregnado em algodão. Após o sacrifício, o animal era posicionado em decúbito ventral e seus membros fixados à bancada. Realizada a tricotomia, fez-se assepsia e anti-sepsia da pele com álcool iodado 4%, na região

posterior da pata traseira direita. Com material adequado para cirurgia, dentro de ambiente de fluxo laminar, foi realizada uma dissecação cuidadosa, desde o terço inferior do tríceps sural até a pata. Os fragmentos de tecido ósseo foram acondicionados em recipiente, individualizado com formol a 10%, identificado e enviado para o laboratório de histopatologia da FMUSP, para análise pela microscopia óptica, através da coloração de H&E.

Todo o material foi interpretado baseado nas características histológicas do processo infeccioso no tecido ósseo.

Esta fase foi realizada seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal- COBEA.

5.4. Limitações metodológicas do estudo

Algumas dificuldades foram evidenciadas durante a realização desse estudo, e entre essas limitações podemos citar:

- os pacientes envolvidos nessa pesquisa residiam no interior do Estado do Maranhão, em regiões de difícil acesso, sem infra-estrutura. O contato era possível quando uma equipe de saúde os visitavam, sem programação prévia, ou por contato telefônico quando os mesmos tentavam contato com o NPTMS/UFMA solicitando ajuda;
- o transporte até o local de internação era difícil, pois, existia dificuldade em conseguir um veículo para transportar o paciente e seu acompanhante até o NPTMS/UFMA e HSE/MA. Não havia recurso financeiro disponível para esta finalidade;

- a falta de leito nos hospitais da rede pública inviabilizava a internação do paciente no momento oportuno da programação estabelecida. Foi optado pelo tratamento domiciliar e seguimento ambulatorial em alguns casos. Assim, sem condições estruturais, o NPTMS/UFMA conseguiu uma parceria com um hospital da rede pública privatizado (HSE/MA), quase dois anos depois. Observou-se que no Estado do Maranhão, falta uma política efetiva do governo voltada para esses casos;
- havia uma enorme dificuldade em acomodar o paciente, por tratar-se de um quadro grave, com lesões cutâneas em atividades, deformidades grosseiras e algumas vezes, com infecção secundária. Era necessário bloquear uma enfermaria com dois leitos para ser desenvolvido o estudo, trazendo conforto, segurança e tranquilidade para cada paciente, evitando, assim, o contato com outros pacientes que recusavam permanecer internados na mesma enfermaria;
- o desconhecimento desta forma clínica de LT por parte dos profissionais da área da saúde, como enfermeiros, auxiliares de enfermagem dificultava os cuidados com o paciente e atrasava o andamento do trabalho. Assim, foram estabelecidas metas de treinamento, informações técnicas sobre a doença e rotinas quanto ao manuseio, em particular relacionada ao esquema terapêutico;
- a droga de escolha foi a Anfotericina B lipossomal (Ambisome), ofertada pelo Ministério da Saúde. Após a solicitação do medicamento via Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão, aguardava-se a

liberação para o uso. O NPTMS/UFMA queria tentar ofertar a esses pacientes uma droga que pudesse prolongar o período de melhora clínica;

- o tempo de internação tornou-se prolongado devido ao esquema de administração da droga e a presença de efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, calafrios, taquicardia, etc. Os pacientes ficavam deprimidos com o tempo prolongado de internação;
- o paciente quando submetido ao procedimento cirúrgico, era necessário solicitar sala cirúrgica, planejar o ato anestésico e operatório, para não ocorrer complicações;
- o envio dos materiais para os laboratórios dependia dos vãos comerciais. Foi necessário planejar a coleta dos tecidos e não perder o horário estabelecido pela empresa aérea. Todas as amostras eram armazenadas de maneira adequada, para que não ocorressem extravio ou perda das amostras coletadas.

Fez-se necessário relatar essas experiências, pois, essas limitações contribuíram para o engrandecimento de todos os profissionais que participaram dessas etapas.

5.5. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram tabulados e apresentados em forma de gráficos e tabelas. Foi feita uma análise descritiva dos dados obtidos a partir dos aspectos clínico, cintilográfico, radiográfico e histopatológico.

RESULTADOS

6 - Resultados

6.1 Estudo observacional em humanos (Fase I)

6.1.1 Dados gerais

A coleta dos dados foi baseada nos critérios de inclusão anteriormente descritos e no cronograma de execução (ANEXO D), utilizando-se como instrumentos: história da doença, exame clínico, testes imunológico e parasitológico. Um total de oito pacientes, foi internado no Hospital dos Servidores do Estado do Maranhão/HSE, no período de setembro de 2001 a junho de 2003. O tempo médio de internação, por paciente, foi de dois meses.

Informações referentes à identificação, início da doença, ano da internação, tempo de evolução e exames realizados para o diagnóstico encontram-se descritos na tabela 4. Todos os pacientes apresentavam lesões em atividade, e não estavam utilizando nenhum medicamento antes da internação. A média de idade foi 33,1 anos, com variação de 18 a 79 anos, e o tempo de evolução da doença foi variável de 3 a 26 anos, com uma média de 12 anos e uma distribuição eqüitativa entre os sexos.

Tabela 4 – Dados de identificação, início e tempo da doença, ano da internação e exames específicos realizados para diagnóstico dos oitos pacientes portadores de LCD/MA (dia 0)

Paciente	*Idade/ Sexo	Início da doença/ Ano	Tempo de doença	Internação/ Início do estudo (Mês e Ano)	Exames Laboratoriais		
					IDRM	RIFI	Parasitológico
RFO	32 a / M	1976	26 anos	Dezembro/ 2001	R/N	R/P	R
JMS	79 a / M	1980	22 anos	Abril/ 2002	R/N	R/P	R
MAF	22 a / F	1987	15 anos	Julho / 2002	R/N	R/P	R
MCMA	22 a / F	1990	12 anos	Fevereiro/ 2002	R/N	R/P	R
JSC	18 a / M	1991	8 anos	Setembro/ 2001	R/N	R/P	R
AMCF	22 a / F	1995	7 anos	Outubro/ 2002	R/N	R/P	R
MTR	31 a / F	1999	3 anos	Abril/ 2003	R/N	R/P	R
JM	41 a / M	1999	3 anos	Jan/ 2003	R/N	R/P	R

* = idade no início do estudo

IDRM = intradermorreação de Montenegro

RIFI= reação de imunofluorescência indireta

R = realizou o exame

NR = não realizou o exame

(-) = resultado do exame negativo

(+) = resultado do exame positivo

Quanto à presença de lesões cutâneas e sua distribuição no corpo, houve predomínio de nódulos, principalmente nos membros superiores (MMSS) e membros inferiores (MMII), seguido de placas infiltradas em todos os pacientes. Nódulos exulcerados secundários a microtraumatismos de repetição, situados nas extremidades distais dos membros, foram observados em seis (75%) casos (RFO, JMS, JSC, MAF, JM, AMCF). Dois (25%) pacientes (MCMA apresentava lesões no terço médio-distal das pernas; MTR com lesões na coxa e joelho esquerdo).

Foram observadas também lesões cutâneas em outras áreas do corpo dos pacientes (face, região dorsal e torácica), lesão vegetante (asa do nariz), placas infiltradas (região poplíteia e ântero-lateral da coxa) e cicatrizes retráteis (mãos, punhos, tornozelo e pés). A tabela 5, traz detalhes referentes às características das lesões e suas respectivas localizações.

Pesquisou-se ainda a presença ou não de deformidades nas extremidades dos MMSS e MMII, formando-se dois grupos de pacientes. A deformidade se caracterizava: quanto à localização; se acompanhadas ou não por lesões cutâneas; acometimento unilateral ou bilateral; aspectos semelhantes entre os pacientes, e sua limitação funcional permanente. O grupo I foi composto por cinco (62,5%) pacientes (RFO, AMCF, MAF, JSC, JMS), e o grupo II por três (37,5%) pacientes (MCMA, MTR, JM).

Tabela 5 – Dados das características e localização das lesões cutâneas e a presença de deformidades no corpo dos oito pacientes portadores de LCD/MA (dia 0)

Paciente	Locais das lesões	Tipos de lesões				Deformidades	
		N	PI	UT	C	MÃOS	PÉS
RFO	MMSS	+++	0	0	+++	P	P
	MMII	++	0	+	+++		
	OUTRAS	+	0	0	+++		
JMS	MMSS	+++	+	+++	0	A	P
	MMII	+++	+	+++	0		
	OUTRAS	++	+	+	0		
MAF	MMSS	+++	++	+++	+++	P	P
	MMII	+++	++	+++	+++		
	OUTRAS	++	+	0	++		
MCMA	MMSS	++	+	0	0	A	A
	MMII	+++	++	+++	+		
	OUTRAS	++	+	0	+		
JSC	MMSS	+++	+++	+++	++	P	P
	MMII	+++	+++	+++	++		
	OUTRAS	+++	++	+	++		
AMCF	MMSS	+++	++	++	+++	P	P
	MMII	+++	++	++	+++		
	OUTRAS	++	++	0	++		
MTR	MMSS	0	++	0	0	A	A
	MMII	+++	++	+++	0		
	OUTRAS	+	+	+	0		
JM	MMSS	++	++	+	+	A	A
	MMII	+++	++	++	++		
	OUTRAS	+	++	0	+		

MMSS = membros superiores

MMII = membros inferiores

N = nódulos

PI = placas infiltradas

UT = exulceração traumática

C = cicatrizes atroficas

P = presença de deformidade

A = ausência de deformidade

Graus de Intensidade da lesão cutânea→ + = leve; ++ = moderado; +++ = intenso

Outras regiões: face; dorso e abdomen

Os pacientes do grupo I apresentavam as seguintes deformidades: deformidade em flexão dos dedos das mãos e pés (RFO, JSC, MAF, AMCF); braquidactilia do 5º dedo dos pés (RFO, MAF, AMCF); encurtamento dos dedos das mãos e dos pés (RFO, JSC); e deformidades em flexão somente dos dedos dos pés (JMS).

MAF apresentou deformidades em flexão das articulações interfalangianas proximais do 3º e 4º dedo da mão direita e deformidade em flexão plantar do pé e tornozelo esquerdo causada por cicatrizes retráteis. Comprometimento em flexão das articulações interfalangianas do 3º, 4º e 5º dedos, de ambas as mãos (AMCF); RFO apresentava deformidades em flexão das articulações interfalangianas distais do 4º e 5º dedo de ambas as mãos e deformidade em flexão dos dedos dos pés; e JSC que apresentava deformidade em flexão da articulação interfalangiana do 2º dedo da mão direita.

No grupo II não se observou nenhuma deformidade nas extremidades dos MMSS e MMII. Também não havia lesões cutâneas nas extremidades distais dos MMSS e MMII (MCMA e MTR), somente JM que apresentava lesão exulcerada com crostas no 1º dedo do pé esquerdo, sem deformidade local.

As características do polimorfismo dessas alterações apresentadas pelos pacientes (lesões cutâneas e deformidades), são demonstradas nas figuras 3, 4, 5 e 6.

Figura 3. Tipos de lesões cutâneas na LCD. **A.** Nódulos e exulcerações (MCMA). **B.** lesões exulceradas com deformidade em flexão plantar do pé direito, secundário à retração de lesões cicatriciais em partes moles (MAF). **C.** Exulceração traumática (RFO). **D.** placas infiltradas (MTR). **E.** Lesão vegetante (JMS).

Figura 4. Lesões cutâneas causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Presença de nódulos, placas infiltradas e nódulo-exulceração, com comprometimento bilateral, nos dois pacientes. **A. e B.** Lesões múltiplas sem deformidade articular dos dedos. **C.** Deformidades em flexão e encurtamento dos dedos em ambas as mãos (JSC). **D.** Múltiplas lesões de pele, com infecção secundária, e deformidades em flexão dos dedos e incapacidade funcional (JSC).

Figura 5. Presença de lesões cutâneas e deformidades articulares dos dedos em pacientes com LCD. Aspectos semelhantes entre si. **E. e F.** Deformidades em flexão das articulações interfalangianas das mãos, de maneira similar (MAF e AMCF). **G. e H.** Aspecto clínico de encurtamento e deformidades de todos os dedos das mãos devido lesões cicatriciais levando a retração de partes moles (RFO). Face palmar sem comprometimento na LCD.

Figura 6. Lesões cutâneas causadas pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Presença de deformidades nos dedos dos pés. **A. e B.** Nódulos e placas infiltradas com crostas, encurtamento e braquidactilia do quinto dedo direito e esquerdo, devido as retrações de lesões cicatriciais (AMCF e JMS). **C. e D.** Presença de cicatrizes retráteis, encurtamento, deformidade em flexão e braquidactilia nos dois casos (MAF e RFO).

6.1.2 Estudo imunológico

- **Intradermorreação de Montenegro (IDRM)**

Todos os pacientes apresentaram resposta de hipersensibilidade celular retardada negativa em 100% dos casos.

- **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

A imunidade humoral foi avaliada nos pacientes mostrando sorologia positiva em 100% dos casos.

6.1.3 Estudo parasitológico

Caracterização das cepas

Todas as cepas isoladas dos pacientes com LCD foram caracterizadas como *L. (L.) amazonensis* por RIFI utilizando anticorpos monoclonais, exceto da paciente MTR, que foi utilizado somente o teste confirmatório (Imunohistoquímica) devido contaminação da cultura. Os resultados obtidos estão inseridos na tabela 6.

Tabela 6- Dados sobre a caracterização da cepa de cada paciente, a espécie de *Leishmania* e o código de identificação

Paciente	Espécie de <i>Leishmania</i>	Identificação
M.C.M.A.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/90/Ba-338
J.M.S.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/02/Ba-821
R.F.O.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/90/Ba-337
J.S.C.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/99/Ba -760
A.M.C.F.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/97/Ba-701
M.A.F.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/97/Ba-700
J.M.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/02/Ba-820
M.T.M.R.	<i>L.(L.) amazonensis</i>	Imunohistoquímica*

* Identificação realizada através da técnica de imunohistoquímica, utilizando-se anticorpo anti-*L.(L.) amazonensis*

Análise histopatológica de lesões cutâneas

Amostras de lesões cutâneas foram obtidas em todos os casos. Através da coloração por H&E, observou-se comprometimento da epiderme e derme. A epiderme era hipotrófica em cinco (62,5%) pacientes (MTR, JM, JSC, MAF, AMCF), em dois (25%) era atrofica (RFO, JMS) e em apenas um dos pacientes (12,5%), a epiderme apresentou-se sem alteração (MCMA). No estudo da derme 100% dos casos estudados apresentaram intenso infiltrado celular, com a presença de macrófagos vacuolizados ricos em formas amastigotas de *Leishmania* e pequena quantidade de linfócitos e plasmócitos (Figura 7 e 8) e Tabela 7.

Tabela 7 – Aspectos histopatológicos de lesões do tecido cutâneo, pela coloração de Hematoxilina-Eosina, em 8 pacientes com LCD

Histopatológico	RFO	JMS	MAF	MCMA	JSC	AMCF	MTR	JM
Infiltrado celular	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Necrose	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuloma	0	0	0	0	0	0	0	0
Presença de <i>Leishmania</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Macrófagos vacuolizados	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+	+	+
Linfócitos	+	+	+	+	+	+	+	+

0 = ausente

+ = leve

++ = moderado

+++ = intenso

Figura 7. **A.** Reação inflamatória constituída por macrófagos parasitados, infiltrando a derme (JMS) HE. AO. 400x. **B.** Intenso parasitismo de macrófagos na camada dérmica (JSC) HE. AO. 400x. **C.** Reação inflamatória constituída por macrófagos parasitados, plasmócitos e raros linfócitos infiltrando a derme (MAF) HE. AO. 200x e **D.** Imunohistoquímica de lesão cutânea demonstrado a presença do parasito (JM) AO. 100x.

Figura 8. Exame parasitológico por imunohistoquímica de lesão de pele demonstrado a presença do parasito. **E.** (AMCF) AO. 400x **F.** (MCMA) AO. 200x. **G.** (RFO) AO. 200x e **H.** (MTR) AO. 100x.

6.1.4 Estudo através de exames de imagens

Os achados do estudo cintilográfico, tais como: valores de contagens; índices e relações gerados para as lesões estudadas e os aspectos radiográficos estão inseridos nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Exame cintilográfico

Características gerais:

O exame cintilográfico trifásico foi realizado em todos os pacientes, demonstrando hiperfixação em várias áreas do corpo, nas fases de equilíbrio e tardia, principalmente nas extremidades distais dos membros superiores e inferiores.

Na fase de equilíbrio ocorreu um aumento da captação dos tecidos moles, correspondendo às lesões cutâneas nos membros superiores e inferiores, em todos os casos.

Na fase tardia ocorreu hipercaptação predominante em membros, sendo a fixação nas extremidades distais em 6(75%) dos casos (RFO, JMS, MAF, JSC, AMCF, JM), e em 2(25%) casos (MCMA e MTR) no terço proximal da tíbia esquerda e côndilo lateral do fêmur esquerdo, respectivamente. Em apenas um paciente (MTR) houve hipercaptação anormal em esqueleto axial.

Tabela 8 – Características da cintilografia óssea, demonstrando as áreas escolhidas, taxas de contagens, índices, e relação de proporcionalidade, em cada paciente com LCD/MA

Pacientes	Região de interesse do estudo cintilográfico	Contagem/Pixel	Equilíbrio	Tardia	Índice de Fixação	Relação (aproximadamente)
RFO	Pé esquerdo	N	75,2	90,5	IFLTM 0,25	3.16:1
	N - médio-pé	LTM	217,7	68,0	IFLO 0,79	
	LTM – retro-pé	LO	252,7	238,2		
	LO - calcâneo					
JMS	Mão esquerda	N	105,8	13,2	IFLTM 1,09	1.80:1
	N- Terço proximal 3 ^o dedo	LTM	202,6	27,6	IFLO 1,96	
	LTM- Região metacarpo-falangeana do 2 ^o dedo	LO	96,2	23,5		
	LO- Falange proximal 5 ^o dedo					
MAF	Mão D	N	16,7	14,2	IFLTM 0,32	4.40:1
	N- Terço proximal 3 ^o dedo	LTM	31,5	8,6	IFLO 1,41	
	LTM- 1 ^o dedo proximal	LO	38,5	46,2		
	LO- Falange proximal 4 ^o dedo					
MCMA	Perna esquerda	N	252,2	59,8	IFLTM 0,51	4.09:1
	N- terço médio perna	LTM	205,7	25,1	IFLO 2,09	
	LTM- Face lateral perna	LO	512,1	53,4		
	LO- Metáfise proximal da tibia					
JSC	Mão direita	N	105,2	13,3	IFLTM 0,62	3.19:1
	N- terço proximal 4 ^o dedo	LTM	35,0	18,3	IFLO 1,98	
	LTM- Região proximal 2 ^o dedo	LO	96,2	23,8		
	LO- Falange distal 4 ^o dedo					
AMCF	Mão esquerda	N	20,1	3,4	IFTM 0,75	1.52:1
	N- Terço proximal 3 ^o dedo	LTM	22,8	2,9	IFLO 1,14	
	LTM- terço distal 3 ^o dedo	LO	33,7	6,5		
	LO- Falange proximal 5 ^o dedo					
MTR	Joelho esquerdo	N	285,0	27,3	IFLTM 0,60	5.30:1
	N- Terço médio perna	LTM	216,0	12,5	IFLO 3,18	
	LTM- Face lateral	LO	302,7	92,2		
	LO- Côndilo lateral do fêmur					
JM	Pé esquerdo	N	17,5	15,2	IFLTM 0,49	3.22:1
	N- 2 ^o dedo	LTM	24,2	10,3	IFLO 1,58	
	LTM- 1 ^o dedo	LO	38,5	52,8		
	LO- Falange distal 1 ^o dedo					

N = Tecido normal

LTM= Lesão de partes moles

LO = Lesão óssea

IFLTM = Índice de hipercaptação em lesão de partes moles

IFLO = Índice de hipercaptação em lesão óssea

Características individuais:

RFO - Na fase de equilíbrio demonstrou hipercaptação de partes moles, na área do tendão calcâneo e do retro-pé esquerdo e na mão direita e esquerda. Na fase tardia, observou-se hipercaptação difusa no pé e tornozelo. Notou-se ainda maior intensidade de captação na região do calcâneo (figura 9);

JSC - Na fase tardia apresentou hipercaptação nas falanges distais do 4º e 5º dedo, articulações interfalangianas proximal e distal do 3º dedo e interfalângiana do 1º dedo da mão direita; a mão esquerda com hipercaptação nas falanges distais do 2º e 5º dedo (figura 10);

JMS - Apresentou hipercaptação focal no terço distal da falange proximal do 5º dedo, e nas articulações interfalangianas e metacarpofalangianas da mão esquerda na fase tardia (figura 10) ;

AMCF - Apresentou na fase de equilíbrio hiperfixação de maneira discreta na articulação interfalângiana proximal do 4º dedo e difusa no 5º dedo da mão esquerda. Na fase tardia, manteve-se a hipercaptação focal da articulação interfalângiana proximal do 4º dedo e hipercaptação difusa nas falanges média e distal do 5º dedo (figura 11);

MAF - Foi verificada a ocorrência de hipercaptação na fase tardia no terço distal das falanges proximais do 2º e 3º dedo, e nas articulações metacarpofalangianas da mão direita (figura 11);

JM - Foi observada na fase de equilíbrio hiperfixação em toda extensão do primeiro dedo do pé esquerdo e, fixação moderada do 4º e 5º dedo do pé direito.

Na fase tardia houve hipercaptação da falange distal do 1º dedo do pé esquerdo, assim como na tíbia proximal homo-lateral (figura 12);

MCMA - Hiperfixação na tíbia esquerda na fase de equilíbrio, e na fase tardia, observou-se hipercaptação na metáfise proximal da tíbia esquerda (figura 12);

TR - Mostrou na fase de equilíbrio fixação difusa envolvendo coxa distal e joelho esquerdo, com maior captação nos tecidos moles. Na fase tardia notou-se hipercaptação difusa do joelho esquerdo, sendo mais acentuada no côndilo lateral. Registrou-se também hipercaptação focal no corpo vertebral de L3 (figura 13);

Após ser escolhida a região de interesse do estudo cintilográfico, em cada paciente, os valores das contagens nas duas fases do exame e os índices de hipercaptação foram gerados para cada indivíduo. O índice de fixação da lesão óssea (IFLO) teve um comportamento sempre superior ao valor do índice de lesão de tecido mole (IFLTM), com a relação obtida variando de 1.52 a 5.30 vezes (figura 14).

Figura 9. A. Fase de equilíbrio das mãos mostrando hiperfixação difusa.
B. Fase tardia mostrando hipercaptação em várias regiões do punho e mãos.
C. Fase de hiperfixação no terço distal da perna e retro-pé esquerdo.
D. Hiperfixação no calcâneo esquerdo sugerindo processo inflamatório local (RFO) .

Figura 10. **A.** Fase tardia demonstrando várias áreas de hipercaptação, principalmente, nas falanges médias de ambas as mãos (**JSC**). **B.** Fase de equilíbrio mostrando o comprometimento de partes moles na mão direita e esquerda, respectivamente. **C.** Hipercaptação em várias áreas, com acentuação na falange proximal do quinto dedo da mão esquerda (**JMS**).

Figura 11. A e B. Fase de equilíbrio e tardia da mão direita, mostrando hipercaptação no segundo e terceiro dedo. Discreta captação no quarto dedo (**MAF**). **C e D.** Exame marcando a falange média do quinto e a articulação do quarto dedo, nas fases de equilíbrio e tardia da mão esquerda (**AMCF**).

Figura 12. A e B. Fase de equilíbrio e tardia respectivamente, caracterizando processo inflamatório no primeiro dedo do pé esquerdo (**JM**). **C.** Fase de equilíbrio caracterizada com hiperfixação no terço proximal da perna esquerda. **D.** Fase tardia com hiper captação no terço proximal da tibia esquerda (**MCMA**).

Figura 13. A e B. Fases de equilíbrio e tardia dos joelhos, mostrando comprometimento de partes moles e óssea. C e D. Aspecto de perfil, do joelho direito e esquerdo respectivamente, com ipercaptação tardia no côndilo femoral esquerdo (MTR).

Figura 14. Representação da hipercaptação em partes moles e no tecido ósseo na mão esquerda. **A.** Determinação das áreas na fase de equilíbrio. **B.** Fase tardia com áreas determinadas. **C.** Cálculo para a geração dos índices em ambas as fases (**JMS**).

A análise dos índices de fixação demonstrou que o IFTLM encontrava-se abaixo de 0,75 em todos os pacientes, exceto para o paciente J.M.S. (IFTLM = 1,09). O IFLO permaneceu acima de 1,14 em todos os pacientes, exceto em R.F.O. (IFLO = 0,79). Entretanto, o IFLO foi sempre superior ao IFTLM em cada paciente, variando a relação de proporcionalidade de 0,79:0,25 a 3,18:1,09 nos pacientes estudados (figura 15).

Figura 15 – Gráfico ilustrando os índices (IFLO e IFTLM) de cada paciente.

Exame radiográfico

Características gerais:

Todos os pacientes foram submetidos ao exame radiográfico, sendo observado em 62,5% dos casos (RFO, JMS, MAF, JSC, JM e AMCF) as seguintes alterações ósseas, como: osteopenia; reabsorção óssea dos tofus das falanges distais; lesão lítica; afilamento do diâmetro das diáfises; encurtamento ósseo e deformidade articular dos dedos. Somente em dois pacientes (MCMA e MTR) não foram evidenciadas alterações através das radiografias. Os dados referentes às alterações da estrutura óssea e deformidades, principalmente, das extremidades distais dos membros superiores e inferiores estão inseridos na tabela 9.

Características individuais:

RFO - O exame foi realizado nas mãos, pés, e calcâneo esquerdo. Apresentou alterações ósseas, como: osteopenia; encurtamento e afilamento do diâmetro das falanges dos dedos das mãos e pés; reabsorções parciais das falanges distais dos dedos em ambos os pés. Discreta diminuição da quantidade de trabéculas ósseas no calcâneo esquerdo. Deformidades em flexão do 4º e 5º dedos de ambas mãos (figura 16);

Tabela 9 – Achados radiográficos em oito pacientes com LCD/MA, destacando as regiões selecionadas e suas características clínicas

Paciente	Região(es)	Aspectos clínicos		Alterações radiográficas				
		Dfd	Braq.	Osteo- penia	Lesão lítica	Reab- sorção	Deformidade	Afilamento/ diáfise
R.F.O	Mãos	P	A	P	A	P	P	P
	Pés	P	P	P	A	P	P	P
	Calcâneo (E)	A	A	P	A	A	A	A
J.M.S	Mãos	A	A	P	P	P	A	P
	Pés	A	A	P	A	P	A	P
M.A.F	Mãos	P	A	P	P	P	P	P
	Pés	P	P	P	A	P	P	P
M.C.M.A	Tíbia proximal (E)	A	A	A	A	A	A	A
	Maléolo medial(E)	A	A	A	A	A	A	A
J.S.C	Mãos	P	A	P	A	P	P	P
	Pés	P	P	P	A	P	P	P
A.M.C.F	Mãos	P	A	P	A	P	P	P
	Pés	P	P	P	A	P	P	P
M.T.R	Fêmur distal(E)	A	A	A	A	A	A	A
	Coluna Lombar	A	A	A	A	A	A	A
J.M	tíbia proximal (E)	A	A	P	A	A	A	A
	Pé (E)	A	A	P	P	A	A	A

A = ausência de lesão osteolítica, de reabsorção ou deformidade articular

P = presença de lesão osteolítica, de reabsorção ou deformidade articular

E = lado esquerdo

D = lado direito

Dfd= deformidade de flexão dos dedos

Braq.= braquidactilia (deformidade em abdução do dedo)

Figura 16. Radiografias das mãos e ante-pés (AP), e calcâneo esquerdo (Perfil e Axial). **A. e B.** Aspecto semelhante entre as falanges das mãos e dos pés, caracterizada por afilamento, encurtamento e reabsorção parcial das falanges distais (RFO).

JMS - Apresentava osteopenia difusa das regiões das mãos e pés, com afilamento do calibre da diáfise das falanges proximais e distais. A mão esquerda com lesão lítica e erosão cortical posterior na extremidade distal da falange proximal do 5º dedo; Presença de reabsorção parcial das falanges distais do 2º ao 5º dedos do pé esquerdo. Aumento da espessura dos tecidos moles adjacentes às falanges, aumentando os espaços digitais (figura 17);

JSC - Radiografia das regiões das mãos e pés. Osteopenia difusa, afilamento de falanges, reabsorção parcial das falanges distais dos dedos das mãos e pés, de maneira simétrica. Presença de deformidade em flexão da articulação interfalangiana proximal do 2º dedo da mão direita. Não ocorreu comprometimento articular nas demais articulações (figura 18);

MAF - Submetido ao exame das mãos e pés. Presença de osteopenia nas falanges proximais do 2º, 3º, 4º e 5º dedos da mão esquerda. Lesão lítica com irregularidade da cortical da falange proximal do 4º dedo e deformidades presentes em flexão das articulações interfalangianas do 4º e 5º dedos da mão direita. Falanges dos dedos dos pés apresentando afilamentos das diáfises, osteopenia, reabsorções parciais das falanges distais e presença de braquidactilia do 3º, 4º, e 5º dedo de maneira simétrica. Aumento da espessura dos tecidos moles, predominantemente, nos espaços interdigitais dos dedos dos pés (figura 19);.

Figura 17. A. Radiografia da mão esquerda mostrando osteopenia difusa, lesões líticas na falanges proximal do quinto e média do terceiro dedo, sem comprometimento articular. **B.** Aumento radiográfico da falange proximal, com lesão lítica com bordas bem definidas. **C e D.** Visualização de osteopenia difusa, com reabsorção parcial de todos os dedos (**JMS**).

Figura 18. A. Aspecto radiográfico das mãos mostrando osteopenia difusa, deformidade em flexão do segundo dedo da mão direita, reabsorção parcial das falanges distais dos dedos. e comprometimento de partes moles em ambas as mãos. **B.** Osteopenia dos ossos dos pés, reabsorção parcial das falanges distais e presença de braquidactilia dos dedos (**JSC**).

Figura 19. **A.** Radiografia da mão esquerda mostrando osteopenia e afilamento das falanges, sem comprometimento articular. **B.** Mão direita com afilamento e reabsorção parcial das falanges distais. Lesão osteolítica na falange proximal do quarto dedo da mão direita. Deformidade em flexão do quinto dedo. **C e D.** Afilamento e reabsorção parcial das falanges distais dos dedos do pé esquerdo e direito, respectivamente. Marcante deformidade (Braquidactilia) em ambos os pés (**MAF**).

AMCF - Exames das mãos e pés. Estrutura óssea com afilamento das diáfises das falanges e deformidades em flexão do 3º, 4º e 5º dedos da mão direita e 4º e 5º dedos da mão esquerda. Os pés apresentam osteopenia difusa, com afilamentos das falanges e reabsorções das falanges distais, de maneira simétrica. Braquidactilia presente do 5º dedo de ambos os pés (figura 20);

JM – Exame radiográfico do pé esquerdo e perna homo-lateral. Alterações estruturais caracterizadas por osteopenia, osteólises e finos halos de esclerose localizadas nas falanges proximal e distal. Presença de irregularidade na cortical inferior da falange distal do 1º dedo, e reabsorção parcial da falange distal dos demais dedos do pé esquerdo. Discreta reabsorção dos tofus das falanges distais dos últimos dedos do pé esquerdo. Na diáfise da tíbia ocorreu uma reação periosteal na posterior da diáfise da tíbia esquerda (figura 21).

MCMA – Exame radiográfico da perna esquerda sem alterações da estrutura óssea da tíbia e fíbula. Radiografia das extremidades sem alterações estruturais, com espaços articulares preservados (figura 22).

MTR - Realizado o exame nas regiões do joelho esquerdo, mãos, pés e coluna lombar. Não foram evidenciadas alterações estruturais através das radiografias (figura 22) .

Figura 20. Aspecto radiográfico das mãos e pés (AMCF). **A e B.** Mão direita e esquerda com osteopenia, afilamento e deformidade articular em flexão dos dedos. **C.** Osteopenia difusa dos ossos dos pés e reabsorção parcial das falanges distais dos dedos e braquidactilia do quinto dedo esquerdo.

Figura 21. A e B. Aspecto radiográfico da perna esquerda sem alteração na posição AP e reação periosteal na posição de Perfil. **C e D.** Projeção em AP e Oblíqua mostrando lesão lítica e destruição da cortical inferior da falange distal do primeiro dedo do pé esquerdo (JM).

Figura 22. Exame radiográfico sem alterações ósseas. **A e B.** Perna esquerda (AP e Perfil) (MCMA). **C e D.** Joelho esquerdo (AP e Perfil) (MTR). **E e F.** Coluna lombar (AP e Perfil) (MTR).

6.1.5 Análise histológica do tecido ósseo dos oito pacientes com LCD

Estudo histológico do tecido ósseo de oito pacientes com LCD

As amostras de tecido ósseo dos pacientes foram estudadas através do exame histopatológico utilizando as seguintes colorações: Hematoxilina-Eosina (H&E), Imunohistoquímica, Ziehl-Neelsen-Faraco e Gomori-Grocott. Após análise do material através da microscopia óptica, os dados foram inseridos na tabela 10. As figuras 23 e 24 mostram o aspecto microscópico do tecido ósseo.

Coloração pela H&E

Em três (37,5%) pacientes (JMS, JSC e MAF) observou-se, no material ósseo corado pela técnica H&E, intenso parasitismo, macrófagos repletos de leishmanias, necrose óssea e presença de seqüestro ósseo caracterizando um processo infeccioso crônico. Quatro (50%) casos (RFO, JM, AMCF) o exame não revelou um quadro de osteomielite, e em um (12,5%) paciente (MTR) o material foi extraviado durante o envio.

Imunohistoquímica

Seguindo o protocolo da pesquisa, foi realizada a técnica de imunohistoquímica, utilizando a imunoperoxidase (IPX), pelo método indireto 37,5% dos casos (RFO, AMCF, MCMA) tiveram resposta negativa, entretanto o

material dos pacientes (JSC, JMS, MAF, JM) restantes revelaram-se positivo para *Leishmania*.

Colorações especiais (Ziehl-Neelsen e Gomori-Grocott)-

Para a pesquisa de microorganismos como, Micobactérias e Fungos, foram utilizadas estas técnicas tendo sido negativo o resultado em todos os pacientes.

Tabela 10 - Aspectos histopatológicos do tecido ósseo, através das colorações hematoxilina-eosina, imunohistoquímica, Ziehl-Neelsen e Gomori-Grocott

Histopatológico	R.F.O	J.M.S	M.A.F	M.C.M.A	J.S.C	A.M.C.F	M.T.R	J.M
Infiltrado celular	0	+++	+++	0	+++	0	0	++
Polimorfonucleares	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuloma	0	0	0	0	0	0	0	0
Leishmania	0	+++	0	0	+++	0	0	0
Macróf.	0	+++	+++	0	+++	0	0	++
vacuolizados								
Plasmócitos	0	+	0	0	+	0	0	0
Linfócitos	0	+	0	0	+	0	0	0
Necrose óssea	0	++	+	0	++	0	0	0
Seqüestro ósseo	0	P	0	0	P	0	0	0
Imunohistoquímica	N	P	P	N	P	N	N	P
Ziehl-Neelsen	N	N	N	N	N.	N	N	N
Gomori-Grocott	N	N	N	N	N	N	N	N

0 = ausente

+ = pouco

++ = moderado

+++ = intenso

P = positivo

N = negativo

Figura 23. **A.** Lesão óssea com parasitismo de macrófagos, lise e fragmentação óssea (JMS) HE. AO. 400x. **B.** Osteomielite crônica e a reação imunohistoquímica mostrando a presença de *Leishmanias* (JMS) AO. 400x. **C.** Lesão óssea com parasitismo de macrófagos (JSC) HE. AO. 400x. **D.** Reação imunohistoquímica da lesão óssea mostrando a presença do parasitos (JSC) AO. 400x.

Figura 24. E. Reação inflamatória crônica de tecido ósseo com presença macrófagos, osteoclastos, lise e fragmentação óssea e fibrose (MAF) HE. AO. 400x. F. Osteomielite crônica com detecção de parasitos pela imunohistoquímica (JM) AO. 200x. G. Reação inflamatório crônica com macrófagos, lise e fragmentação óssea e fibrose (AMCF) HE. AO. 400x. H. Reação inflamatória crônica e fragmentação óssea. HE. AO. 400x.

Em síntese , com a determinação da região anatômica a ser estudada do ponto de vista clínico e dos exames de imagens foi definida uma área que seria realizada a biopsia óssea para análise histopatológica de cada paciente. Os MMSS e MMII foram os locais responsáveis por este estudo em todos os pacientes, permanecendo as extremidades distais como local selecionado para a pesquisa em seis casos (RFO, JMS, JSC, JM, AMCF, MAF) e no restante dos pacientes (MCMA, MTR) as áreas determinadas foram o terço proximal da tíbia esquerda e o côndilo femoral lateral esquerdo.

A cintilografia óssea revelou-se positiva em várias áreas de uma mesma região do esqueleto em todos os casos. O exame radiográfico demonstrou alterações ósseas em seis pacientes (RFO, JM, JSC, JMS, MAF, AMCF) com características semelhantes entre si e entre regiões simétricas de um mesmo indivíduo, como nos dedos das mãos e pés: encurtamento de falange, afilamento do diâmetro diafisário da falange distal, lesão lítica e deformidade em flexão das articulações interfalangianas proximal e distal das mãos.

Na área definida para a biopsia do tecido ósseo havia lesões cutâneas adjacentes em 50% dos pacientes (JSC, JM, MAF, MTR) e nos outros 50% (RFO, JMS, MCMA, AMCF) o procedimento foi realizado em área livre de lesões cutâneas. Dados sobre a região anatômica e área, predomínio das lesões cutâneas, exames de imagens e local da biopsia foram inseridos na tabela 11.

Tabela 11 – Características da região estudada, lesões clínicas, exames de imagens e local de realização da biopsia óssea dos oito pacientes com LCD/MA

Casos	Região óssea estudada	Lesão cutânea/ Região estudada	Cint Rad		Biopsia ossea/ Local
R.F.O	Calcâneo do pé E	UT na região posterior da perna E	+	+	Amostra de tecido no calcâneo E
J.M.S	Falange proximal do 5 ^o dedo da mão E	N no terço médio e distal do 5 ^o dedo da mão E	+	+	Amostra de tecido na falange proximal do 5 ^o dedo da mão E
M.A.F	Falange proximal do 4 ^o dedo da mão D	N no terço médio e distal do 4 ^o dedo da mão E	+	+	Amostra de tecido da falange proximal do 4 ^o dedo da mão D
M.C.MA	Terço proximal da tíbia E	UT e PI no terço médio-distal perna E	+	-	Amostra de tecido da tíbia proximal mão E
J.S.C	Falange proximal do 1 ^o dedo da mão D	UT no terço proximal do 4 ^o dedo da mão D	+	-	Amostra de tecido da falange proximal do 1 ^o dedo da mão D
A.M.C.F	Falange proximal do 5 ^o dedo da mão E	N e C no 5 ^o dedo da mão E	+	-	Amostra de tecido da falange proximal do 5 ^o dedo da mão E
M.T.R	Côndilo femoral lateral E	UT e PI na face posterior e lateral do Joelho E	+	-	Amostra de tecido do côndilo femoral lateral E
J.M	Falange proximal do 1 ^o dedo do pé E	UT no terço distal do 1 ^o dedo do pé E	+	+	Amostra de tecido da falange proximal do 1 ^o dedo do pé E

+ = positivo

- = negativo

N = nódulos

UT= nódulo exulcerado

PI = placa infiltrada

CINT = hipercaptação óssea

RAD = aspecto radiográfico

D = lado direito

E = lado esquerdo

Cabe salientar a evolução rara e grave do caso (RFO), que não apresentou melhora de uma única lesão cutânea em atividade nos últimos oito meses. A lesão evoluiu rapidamente para aspecto vegetante, infiltrativo e com áreas de necrose. O paciente faleceu após cinco meses com lesões metastáticas de carcinoma epidermóide. A figura 25 mostra o caso.

6.2 Estudo experimental em animais (Fase II)

Com o objetivo de melhor compreender as alterações patológicas da doença, realizou-se um estudo em BALB/c, como modelo experimental da LT. As características histopatológicas encontradas no tecido ósteo-cartilaginoso foram inseridas na tabela 12 e visualizadas na figura 26.

6.2.1 Estudo histopatológico do tecido ósseo por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c

Aspecto macroscópico:

Observou-se um aumento do tamanho da pata dos animais, que variava de 10 a 15 mm, após o período de evolução da infecção (90 a 120 dias). As cepas isoladas dos pacientes (MCMA, JMS, RFO, JSC) foram inoculadas em cada dois animais. Ocorreu um tempo maior de evolução nos animais inoculados com as cepas de JMS e RFO. A figura 26 ilustra o aspecto macroscópico e histopatológico da lesão no camundongo.

Fig. 25. A e B. Aspecto macroscópico com intervalo de cinco meses, entre a lesão ulcerada na região do tendão calcâneo esquerdo e lesão vegetante com áreas de necrose tecidual na LCD **C.** Aspecto microscópico do carcinoma epidermóide desenvolvido na úlcera leishmaniótica. HE. AO 100x. **D.** Processo infiltrativo do carcinoma epidermóide. HE. AO. 200x. **E e F.** Aspecto radiográfico inicial e a lesão lítica no calcâneo esquerdo causado pelo carcinoma epidermóide (**RFO**).

Aspecto microscópico:

Todos os animais apresentaram destruição dos tecidos moles, necrose de ossos longos, mostrando osteócitos, picnóticos e lacunas vazias. Presença de osteoblastos com núcleos achatados e discretos osteoclastos. Presença de intenso parasitismo no interior dos macrófagos e infiltrado de células mononucleares rico em plasmócitos, adjacentes a cortical e no canal medular.

Em alguns ossos, na extremidade distal, houve presença de tecido fibroso e na extremidade proximal há projeções de trabéculas ósseas. Na região periosteal observou-se formação de osso primário. Em dois animais observou-se comprometimento da cartilagem articular em alguns ossos.

Tabela 12– Características histopatológicas de infecção óssea em camundongos BALB/c por *Leishmania (L.) amazonensis*

Histopatológico	*MCMA BALB/c	*MCMA BALB/c	*JMS BALB/c	*JMS BALB/c	*RFO BALB/c	*RFO BALB/c	*JSC BALB/c	*JSC BALB/c
Infiltrado celular	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
Polimorfonucleares	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuloma	0	P	0	0	0	0	0	0
<i>Leishmania</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Macróf.vacuolizados	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Plasmócitos	+	++	+	+	+	+	0	+++
Linfócitos	0	+	+	0	0	0	0	+
Necrose óssea	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++
Seqüestro ósseo	P	P	P	P	N	N	P	P
Lesão de cartilagem	P	P	N	N	N	N	P	P

* = cepa de *Leishmania*

0 = ausente

+ = leve |

++ = moderado

+++ = intenso

P = positivo

N = negativo

Figura 26. **A.** Aspecto macroscópico da lesão na pata do camundongo BALB/c inoculado com *L(L.) amazonensis*. **B.** Aspectos microscópicos da lesão envolvendo tecido ósseo. HE. AO. 400x **C.** Lesão óssea com envolvimento da medula óssea e tecido adjacente ao osso, presença de macrófagos parasitados e seqüestro ósseo. HE. AO. 200x **D.** Lesão óssea com destruição a partir da medula óssea e do tecido adjacente ao osso, presença de macrófagos parasitados. HE.AO. 400x **E.** Destruição do tecido ósseo por infiltrado inflamatório crônico com fibrose HE. AO 400x **F.** Destruição óssea por osteomielite crônica, com presença de parasitos e preservação da cartilagem articular. HE. AO. 400x.

DISCUSSÃO

7. Discussão

O Brasil é um país em desenvolvimento, com implantação de grandes projetos agropecuários, construções de parques industriais, ferrovias, rodovias e conjuntos habitacionais, provocando um desequilíbrio ecológico em várias regiões do território nacional, adaptando vetores e reservatórios no ambiente peri-domiciliar, e o homem passando a ser um hospedeiro acidental de várias doenças, restritas ao ambiente silvestre como as leishmanioses, que ocorrem em zonas já desmatadas e na periferia dos centros urbanos (Rêbello et al. 1996; Mendes et al. 2002).

A partir da descrição de Silva (1945), no Estado da Bahia-Brasil, sobre uma nova forma clínica de leishmaniose tegumentar, denominada de “leishmaniose dérmica não ulcerada, em nódulos e placas infiltradas e hiperpigmentadas”, outros pesquisadores, tiveram o interesse despertado em observar a existência desta forma da doença em seus respectivos países, como na Venezuela (Convit et al. 1946), Bolívia (Barrientos 1948), México (Márquez 1966), Honduras (Corrales e Laines 1968), e Etiópia (Bryceson 1969, 1970a e 1970b). Atualmente a LCD, ainda permanece como uma entidade clínica a desafiar a ciência, principalmente nas questões relacionadas aos aspectos da apresentação clínica, achados patológicos e imunidade celular, provavelmente a chave para que se possa controlar a

doença, que traz consigo o estigma aos pacientes que a desenvolvem (Costa 1998).

Uma área de interesse e pouco estudada na LT, é o comprometimento ósseo da LCD relacionado à patogenia causada pela *L.(L.) amazonensis*. Nesse sentido, alguns aspectos de ordem prática e de importância para os profissionais da área da saúde deveriam ser lembrados em relação às lesões ósseas dessa doença, tais como: a) necessidade de identificação do agente etiológico responsável pelas lesões ósseas; b) diagnóstico clínico e laboratorial eficaz, principalmente nas regiões endêmicas de LT, onde outros agentes infecciosos do tecido ósteo-cartilaginoso são incriminados, e rotineiramente pesquisados e c) elaboração de um programa de tratamento adequado para essas alterações ósseas, evitando assim, o desconhecimento por parte dos profissionais médicos e prejuízo para o paciente que tem lesões graves e possíveis seqüelas do aparelho locomotor, levando-os a limitações nas atividades habituais da vida diária.

Tendo em vista as questões mencionadas acima, uma das razões do presente trabalho foi demonstrar essas alterações e estudá-las através do seu comportamento clínico, exames de imagens e histopatológico, objetivando, não somente, contribuir com as áreas de conhecimento da doença, mas colaborar com o diagnóstico e tratamento adequado das infecções ósseas, bem como, propor a modificação da classificação etiológica de osteomielite, incluindo o protozoário, *Leishmania (L.) amazonensis*, como agente causador.

A Leishmaniose cutânea difusa (LCD) comporta-se como uma doença de ocorrência rara, estimando-se um total de 300 casos, aproximadamente, no Mundo, sendo que até 1998 foram registrados 31 casos no território brasileiro, o que representava 10% da casuística (Cunha et al. 1997; Costa 1998). Naquela ocasião, o Maranhão representava 34% da casuística nacional, constituindo-se o Estado com o maior número de casos da doença, seguido pelos Pará e Bahia, concordando com as referências que apontam as regiões Amazônica (Amazonas, Pará, Maranhão) e Nordeste (Bahia e Pernambuco) como as grandes áreas responsáveis pela totalidade dos casos do Brasil (Costa et al. 1991).

Na amostra estudada, alguns fatos foram observados, como se segue: todos os pacientes eram provenientes do interior do Estado; não havia susceptibilidade quanto à raça e sexo; 62.5% dos casos (RFO, AMCF, MAF, JSC, MCMA) foram acometidos na primeira década de vida; e uma evolução da doença de 12 anos, em média. Fatos estes, que reforçam a possibilidade de transmissão peridomicilar e curso crônico desta enfermidade (Silveira 1993a,b; Costa et al. 1992).

Recentemente, o NPTMS/UFMA atualizou os dados de todos os casos de LCD no Estado do Maranhão e, com a criação do programa de Vigilância e Monitoramento da LT (MS/FUNASA/FIOCRUZ), o Maranhão conta com oito pólos de produção de doença, sendo detectado que dois municípios maranhenses não integram nenhum pólo deste circuito. Entretanto, as referidas cidades são identificadas como localidades de dois pacientes

portadores de LCD, fazendo parte da casuística maranhense, tendo seus relatos registrados no NPTMS/UFMA. São dados relevantes, podendo ser explicado pelo grande número de casos, de LT isolados, identificados no Estado do Maranhão, em particular (Ministério da Saúde 2002: www.funasa.gov.br.)

A LT no Maranhão é uma doença associada a áreas de ocupação e o homem do campo representa o elemento mais importante, sendo o primeiro a entrar em contato com o ciclo silvestre da doença rompendo o equilíbrio ecológico das florestas primárias, onde existem os mamíferos reservatórios, o vetor e o agente etiológico da doença (Rêbello et al. 1996; Cunha et al. 1997).

Com o estabelecimento dos critérios de definição de uma nova forma de leishmaniose tegumentar (LCD), entidade clínico-patológica distinta sendo caracterizada por iniciar seu quadro clínico, geralmente, com lesão nodular única e posterior disseminação para outras partes do corpo (Convit e Kerdel-Vegas 1965; Convit et al. 1972), além de responder fracamente a terapias medicamentosas convencionais (Costa 1992).

As lesões cutâneas de todos os pacientes foram analisadas, tendo distribuição mais freqüente nos membros superiores e inferiores, e face (nariz e pavilhão auricular), preservando outras regiões (couro cabeludo, abdômen e tórax) de acordo com algumas citações da literatura (Convit et al. 1957; Bryceson 1970; Costa 1992).

Com relação aos aspectos clínicos, é importante frisar os seguintes pontos abaixo:

- Em oito pacientes estudados tinham mais de dois anos de evolução, com lesões cutâneas difusas, predominantemente nodulares em MMSS e MMII.
- Presença de deformidades (diminuição do comprimento dos dedos das mãos e pés; deformidade em flexão e em extensão dos dedos; e braquidactilia nos dedos dos pés) nas extremidades distais na maioria dos pacientes.

Como objeto do estudo foram analisadas as deformidades e lesões cutâneas localizadas nas extremidades distais dos MMSS e MMII, em cinco (62,5%) pacientes (RFO, MAF, AMCF, JSC, JSM) foram observados alguns aspectos clínicos semelhantes entre si, como: acometimento bilateral; deformidades graves dos dedos das mãos e pés; e cicatrizes retráteis, levando-os a terem dificuldades em suas atividades habituais. Nos três (37,5%) casos (JM, MTR, MCMA) não tinham deformidades, nem lesões cutâneas nas extremidades distais, exceto JM que apresentava uma exulceração traumática com crosta localizada no primeiro dedo do pé esquerdo.

Bittencourt e Freitas (1983), justificam a presença de deformidades em pacientes com LCD através da ocorrência de uma intensa proliferação fibroblástica nas extremidades distais levando a um encarceramento local. Recentemente, Saldanha et al. (1995) descreveram dois casos de LCD que sofreram mutilações dos dedos dos pés e mãos, afirmando que os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram totalmente esclarecidos.

Em seis (75%) pacientes (RFO, JMS, JSC, JM, AMCF, MAF) foram encontradas lesões cutâneas nos MMSS e MMII que sofreram traumatismos de repetição, evoluindo com ferimentos superficiais e infecção secundária em alguns casos. Pêssoa e Barretto (1948) e Kochs (1969) sugerem ser a lesão conseqüente a traumatismo prévio em protuberâncias ósseas das extremidades distais que justificaria até lesões ósseas em casos de LT e, Bittencourt e Freitas (1983) definem que a ação de traumatismo sobre um tecido com pouca elasticidade leva a migração de microorganismos existentes da pele para a lesão formando uma ulceração local.

Talvez, o ferimento secundário aos traumatismos de repetição sobre as lesões cutâneas leve a perda somente da camada epidérmica, concordando com Costa (1998) que acredita na formação de lesões exulceradas, diferenciando-as das úlceras propriamente definidas por Sampaio e Rivitti (1998).

Quando foram estudados os aspectos clínicos das lesões cutâneas associadas às deformidades, nas extremidades distais dos pacientes com LCD, principalmente dos membros superiores, notou-se a existência, basicamente, de nódulos, nódulo exulcerados, placas infiltrativas e cicatrizes retráteis, similar às descrições de Bryceson (1969) e Costa (1998). No entanto, havia casos com poucos anos de evolução com lesões cutâneas, como JM que apresentava uma exulceração traumática sem deformidade local, levando a crer na possibilidade de recorrência e cronicidade como um dos fatores responsáveis por estes achados (Bittencourt e Guimarães 1968; Bryceson 1969; Costa et al. 1995).

Segundo Fonseca et al. (1981), a disseminação ocorre por via hematogênica e correlaciona-se com uma deficiência imune celular específica, apontada como responsável pela perpetuação do quadro clínico. Entretanto, alguns autores acreditam que a manifestação clínica da LT dependa de fatores extremamente complexos que envolvem a virulência da cepa do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro (Convit et al. 1972; Akuffo et al. 1997).

O conceito de enfermidade espectral, defendido nos trabalhos de Turk e Bryceson (1971) e, Convit e Pinardi (1974) e Silveira et al. (2004) , baseia-se na hipótese de que a forma de resposta imunológica desencadeada pelo parasito no hospedeiro deve ser a condição mais importante na determinação da forma clínica, tendo sido postulado para justificar a demonstração clínica e histológica de dois pólos, o anérgico e o hiperérgico. Os pacientes com LCD não divergiram do que é descrito na literatura, visto que, todos tiveram o resultado do teste da IDRM negativo, atestando a deficiência da imunidade celular específica dos casos, propiciando um acúmulo de Leishmanias nas lesões cutâneas, e a manutenção de altos níveis de antígenos, provavelmente responsáveis pela perpetuação da ausência de resposta específica (Petersen et al. 1984, Convit et al. 1993).

Os dados referentes aos resultados da análise histopatológica da pele, de todos os pacientes, demonstraram inúmeros macrófagos vacuolizados repletos de formas amastigostas e discreto infiltrado linfoplasmocitário, concordando com outros autores, como Bryceson (1970a) e Convit et al. (1993).

No Estado do Maranhão, todas as cepas causadoras dos casos de LCD foram caracterizadas como *L. (L.) amazonensis*.

A osteomielite é considerada uma doença freqüente, com crescente aumento do número de casos clínicos e de agentes patogênicos que têm predileção pelo tecido ósseo (Waldvogel e Papageorgiou 1980; Norden 1988; Ma e Chan 2002; Mariott et al. 2004), sendo seu estudo baseado nos critérios clínicos, radiográficos, cintilográficos e histopatológico (Lew et al. 1997; Kothari 2001).

As características clínico-radiológicas não distinguem os microorganismos responsáveis pela infecção, sendo necessário se fazer uso de outras ferramentas como a cintilografia óssea que define a extensão do processo inflamatório ósseo e o comprometimento de partes moles (Mader et al. 1996; Gottlieb et al. 2002), e o estudo histopatológico que mostra achados não específicos, incluindo uma variável mistura de infiltrado inflamatório, necrose e formação óssea (Mader et al. 1996; Ma e Chan 2002).

No presente estudo foi utilizado o mapeamento ósseo através da cintilografia óssea trifásica, observando-se hipercaptação em diversas áreas das regiões anatômicas dos pacientes, onde o índice de fixação do tecido ósseo foi superior ao de partes moles, demonstrando que havia lesões ósseas em atividade, sugerindo um quadro de infecção óssea multifocal, semelhante a osteomielite crônica recidivante multifocal (Kothari 2001).

Em relação à LT, Pessoa e Barretto (1948) escreveram um dos melhores tratados sobre LTA e afirmaram que as leishmanioses eram conhecidas antes do século XX como um grupo de enfermidades

dermatológicas muito semelhantes entre si e, com um diagnóstico clínico associado a lesões cutâneas, geralmente, ulcerosa e, às vezes, comprometendo também as mucosas oral e nasal. Estudos enfatizam que o acometimento é maior da cartilagem, atingindo o tecido ósseo secundariamente na forma cutâneo-mucosa, fato comprovado por Barros (1952), Costa (1953) e Guimarães (1957), mas recentemente, através dos estudos paleopatológicos com Altamirando et al. (2001) que identificaram lesões líticas na região naso-palatina em antigas populações humanas do Peru, compatível com a forma mucosa da LT, ressaltando a dificuldade e o cuidado na interpretação desses achados como sendo relacionada às leishmanioses cutânea e cutânea difusa (LCD), que não comprometem o osso. Esses autores deram maior importância às lesões ósseas no diagnóstico diferencial com hanseníase, tuberculose, sífilis, esporotricose, paracoccidioidomicose e mieloma múltiplo.

Em nossa amostra, um paciente (RFO) veio a falecer por carcinoma epidermóide. Não existem relatos na literatura sobre lesões na LT que evoluam para tumores (observação pessoal). Entretanto, esta observação pode ser considerada no acompanhamento dos doentes com LT. Eventualmente, as úlceras crônicas podem evoluir para tumores malignos (Gulmann et al. 2003).

A osteomielite crônica causada por fungos é rara, manifestando-se com múltiplos focos e fístulas cutâneas (Hungria Filho 1992, Ma e Chan 2002), devendo fazer diagnóstico diferencial com a tuberculose, hanseníase, leishmanioses e com a osteomielite hematogênica no adulto, doença rara,

estendendo-se por todo osso afetado e articulações adjacentes, não comprometendo o suprimento sanguíneo, com ausência de seqüestro ósseo e destruição da cortical (Trueta 1959; Borgia et al. 2000; Ispoglou et al. 2003).

Na literatura específica, a cintilografia têm sido pouco utilizada nas doenças tropicais, incluindo as leishmanioses (Braga 2002), portanto, pode-se afirmar que este seja o primeiro relato do uso da cintilografia óssea em pacientes com LCD, tendo sua importância na identificação e seguimento do curso clínico das alterações ósseas.

A radiografia é uma modalidade de exame menos dispendiosa e também confiável para demonstrar a localização da lesão, sua extensão, presença ou não de reação e o tipo de destruição óssea, muitas das vezes é preferida pelos profissionais que lidam com o problema (Garcia 1987). A abordagem do comprometimento ósseo na LT, através do exame radiográfico, ocorreu primeiramente nos relatos de Arias Aranda (1930) e Arias Aranda e Rosa (1931), que mencionaram um quadro de osteomielite crônica, em dois pacientes com aspecto de uma espinha ventosa óssea, ulceração e crostas nos ossos da mão, caracterizando osteíte crônica, justificando a necessidade da exclusão de outras doenças granulomatosas no diagnóstico diferencial.

Em nosso estudo, três pacientes (JMS, JM, JSC) apresentaram alterações ósseas observadas através do exame radiográfico que correspondiam às localizações de lesões cutâneas nos membros superiores e inferiores, confirmando os achados da literatura (Pupo 1946; Bryceson

1969; Costa 1998). O estudo radiográfico descreveu lesões com aspectos semelhantes e comprometimento bilateral, principalmente nas mãos de acordo com Pupo (1946), Costa (1953) e Saldanha et al. (1995). MAF apresentava dificuldade para deambular, devido a presença de cicatriz retrátil na região do tendão calcâneo direito, semelhante aos achados de Silva (1958), que descreveu uma grave lesão localizada na superfície anterior da perna estendendo-se até o pé, limitando o movimento do tornozelo de um paciente.

Pupo (1946), em seu estudo clínico sobre leishmaniose tegumentar, relatou 11 casos de leishmaniose cutânea ulcerosa com lesões contíguas aos ossos e articulações das extremidades distais dos membros, verificando deformidades clínicas, sendo os aspectos radiográficos descritos por Barros, no qual descreveu as imagens em seu próprio relatório da seguinte maneira: "acentuado espessamento das corticais, constituindo tumefações ósseas nas diáfises dos ossos longos e geralmente de localizações múltiplas; focos discretos de destruição óssea sob a forma de estrias longitudinais de osteólises; hipertrofia periostal, às vezes muito desenvolvida, constituindo uma periostite difusa, de limites imprecisos, dando o aspecto de uma nébula que invade as partes moles; profundas alterações nos contornos das diáfises dos ossos longos que apresentam bosselados e com freqüentes encurvações; reação enostal e produções osteofíticas pequenas e discretas; não se observam formações cavitárias, nem processos destrutivos importantes".

Portanto, acreditava-se que as localizações das lesões ósseas na sífilis, tuberculose e outras infecções como a osteomielite bacteriana caracterizada por cavidades destrutivas e seqüestros ósseos, eram diferentes das encontradas na LTA (Pupo 1946).

O processo de reabsorção parcial foi observado, através de radiografias, em seis pacientes deste estudo, com semelhanças entre eles. Observou-se também, a reabsorção no osso próprio do nariz de dois pacientes (MAF e JMS), sendo, talvez, uma característica própria do comportamento desta forma clínica de LT, concordando com os achados de Pupo (1946) e Costa (1958), muito embora esses aspectos tenham sido também descritos como próprios da hanseníase (Dalinka et al. 1975). A presença de osteopenia, lesão lítica e afilamento do diâmetro diafisário das falanges ocorreu em 75% dos casos que apresentavam deformidades articulares permanentes, secundárias ao comprometimento dos tecidos moles local como defendido anteriormente por Bittencourt e Freitas 1983.

Guimarães e Silva (1957) descreveram lesões do tecido ósseo relacionadas, em sua maioria, sem lesões cutâneas contíguas e múltiplas na LT. Os aspectos radiográficos desses casos foram descritos por Fernando Almeida, como lesões expandidas, fusiformes e áreas osteolíticas na falange proximal do terceiro dedo da mão direita e, com três meses de evolução, o controle radiográfico mostrou franca regressão e após um ano houve recuperação da forma e estrutura normais do osso acometido, concluindo, que independente do mecanismo a *Leishmania* imprime tais alterações no tecido ósseo, com características próprias, que possibilitam distinguí-las de

outras enfermidades como sífilis, osteomielite bacteriana e tuberculose óssea.

As descrições radiográficas e os aspectos clínicos das alterações em pacientes com LCD descritos neste trabalho, auxiliam a compreensão do comprometimento das extremidades na LT, pois, existem várias doenças de comportamento semelhante (Costa 1953; Guimarães e Silva 1957, Costa 1998).

Rodriguez et al. (1988) relataram um caso de leishmaniose cutânea recidivante, com úlcera de bordas irregulares, infiltrada e de fundo granulomatoso, localizada no dorso da região metatarso-falangiana do pé esquerdo. As radiografias mostravam ausência das falanges média e distal, afilamento do diâmetro das falanges proximais do terceiro e quinto dedos, presença de cistos ósseos e comprometimento cartilaginoso, sugerindo tratar-se de uma lesão óssea provocada por leishmaniose.

Ogawa et al. (2002) descrevem um caso clínico de leishmaniose cutânea com localização rara, em que havia destruição da falange distal do primeiro dedo do pé esquerdo, chamando a atenção para o diagnóstico diferencial de melanoma.

Nas últimas duas décadas, estudos foram realizados com a finalidade de se compreender o processo de destruição óssea, principalmente, na osteomielite bacteriana, onde foram levantadas algumas hipóteses, tais como: a bactéria destruiria diretamente o tecido ósseo através da liberação de enzimas e proteases; promoveria um processo celular que estimularia a degradação tecidual; ou pela inibição da síntese da matrix óssea (Nair et al.

1998). No entanto, o processo infeccioso ósseo iniciaria, geralmente, na metáfise óssea, talvez por não haver células fagocitárias nos vasos ou pelo fluxo sanguíneo mais lento, permitindo que microorganismos extracelulares situassem fora dos capilares (Trueta 1959; Septimus 1979).

Esses fatores seriam divididos naqueles que parecem promover a reabsorção inibindo a formação óssea, como endotoxinas, lipopolisacarídeos (LPS) e os componentes de superfície denominados de fatores bacterianos osteolíticos (Nair et al. 1998).

O exame histopatológico do tecido ósseo através da coloração por H&E, revelou um quadro de infecção óssea crônica, com macrófagos repletos de formas amastigostas de *Leishmania*, infiltrado linfoplasmocitário, necrose tecidual e presença de seqüestro ósseo em três pacientes (JMS, JSC, MAF). O parasitismo foi semelhante quando comparado às lesões cutâneas examinadas pela microscopia óptica.

Através da imunohistoquímica, o tecido ósseo mostrou-se positivo em 50% dos casos no que se refere à presença da *Leishmania*. O aspecto histológico, pela técnica H&E, correspondeu a osteomielite crônica em quatro casos (JMS, JSC, MAF, JM). Apoiados na literatura pesquisada, todos os pacientes foram submetidos à pesquisa de outros microorganismos descritos como possíveis causadores de osteomielite (Hungria Filho 1992; Ma e Chan 2002), não sendo observada nenhuma positividade. Lujan (2000) identificou em pacientes com LT, a presença de *Staphylococcus aureus* como a bactéria mais freqüente nas infecções secundárias de úlceras cutâneas.

Alguns trabalhos têm relatado o aparecimento de lesões ósseas em animais. Turrel et al. (1982) e Buracco et al. (1997) realizando estudos em cães infectados por *L.(L.) donovani* chamam atenção para o desenvolvimento natural de um quadro de osteomielite associado a artrosinovite sugerindo, inclusive, que as leishmanioses devam ser incluídas no diagnóstico diferencial de patologias que apresentam sinais de sinovites e achados radiográficos de osteomielite em cães, em áreas endêmicas, e Abreu (2003) demonstrou, através de estudo experimental em camundongos BALB/c e C57B/6, a presença de *L.(L.) amazonensis* parasitando vários tecidos, dentre os quais o tecido cerebral e o osso. O envolvimento ósseo no sítio de inoculação foi detectado em camundongos BALB/c e C57BL/6, quarenta dias após a infecção. A análise histológica mostrou que à medida que a lesão evoluía, os osteócitos da pata infectada, apresentavam-se picnóticos com lacunas vazias. Em alguns animais, observou-se intensa reabsorção óssea com conseqüente formação de tecido conjuntivo e, raramente, havia a presença de osteoclastos nas áreas de osteonecrose.

Foi reproduzido no modelo experimental o processo patológico no tecido ósseo. A análise histopatológica da infecção óssea observada nos camundongos BALB/c, demonstrou quadro característico de osteomielite crônica, com destruição óssea, seqüestro e intenso parasitismo intra e extramedular em todos os animais, com discreto comprometimento do tecido cartilaginoso em seis camundongos.

A destruição maciça do tecido ósseo e a preservação da superfície articular sugere processo inflamatório induzido pela *Leishmania (L.)*

amazonensis na medula óssea e no tecido extramedular, demonstrado pelo grande número de células parasitadas encontradas. Estudos recentes mostram cultura de osteoblastos expostos ao *S. aureus* recrutando macrófagos e linfócitos para o sítio da infecção. Através de citocinas e fatores estimuladores de crescimento níveis elevados de IL-6 são produzidos no início da infecção, resultando na destruição do tecido ósseo (Mariott et al. 2004).

Diante dos dados apresentados, parece não haver dúvidas quanto à importância de se caracterizar o comprometimento ósseo na forma clínica LCD, acreditando que este trabalho possa contribuir ao mostrar a relação entre a *Leishmania* e as lesões do tecido ósteo-cartilaginoso, através dos aspectos clínico, cintilográfico, radiográfico e histopatológico. Muito embora, vários agentes etiológicos da osteomielite sejam conhecidos, a forma subaguda e a crônica necessitam de melhor compreensão da sua fisiopatologia, devido à complexidade de vários fatores que agem no tecido ósseo, como microorganismos incomuns ou associações desses agentes (Kahn e Pritzker 1973; Waldvogel e Papageorgiu 1980).

O modelo experimental mostrou a lesão óssea aparentemente induzida pelo processo inflamatório da infecção pela *Leishmania*. A inflamação possui característica crônica descartando infecções secundárias como fator causal. Os mecanismos patogênicos das lesões ósseas deveriam ser estudados através da identificação de fatores liberados na ativação de células inflamatórias durante a infecção.

O experimento mostrou destruição óssea, com estreita relação entre macrófagos parasitados na medula óssea e no tecido adjacente, reforçando o papel de fatores produzidos pelo processo inflamatório, atuando na destruição deste tecido (Nair et al. 1998, Mariott et al. 2004).

Existem divergências quanto ao mecanismo de produção das alterações ósseas. Alguns autores acreditam na ação direta do parasito, como acontece na forma cutâneo-mucosa (Pupo 1946, Pessoa e Barreto 1948); outros defendem a hipótese de origem hematogênica (Guimarães e Silva 1957), no entanto, outros autores defendem que o comprometimento ósseo secundário à fibrose da pele e das partes moles adjacentes (Bittencourt 1968; Bittencourt e Freitas 1983; Saldanha et al. 1995).

Os nossos achados sugerem dois mecanismos de lesão óssea na LCD: disseminação hematogênica do parasito a partir de macrófagos parasitados na medula óssea; e por contigüidade da lesão cutânea, quando macrófagos parasitados são encontrados nos tecidos moles adjacentes ao osso, faltando investigar os fatores responsáveis por tais vias (Ishimi et al 1990; Marriott et al. 2004).

Para finalizar, as classificações etiológicas das infecções ósseas na literatura, não citam a *Leishmania* como causadora de osteomielite no homem (Ma e Chan 2002; Baltensperger et al. 2004), e pouco são os relatos sobre as alterações do tecido ósseo nos indivíduos portadores de LT, principalmente a LCD. Talvez, por não se realizar pesquisa de *Leishmania* quando se procura identificar os possíveis agentes responsáveis, mesmo em área endêmica, onde apenas bactérias e fungos são pesquisados.

Nesse sentido, parece evidente a relação direta entre a *L.(L.) amazonensis* e a infecção óssea caracterizando um quadro de osteomielite crônica por esse parasito, particularmente na LCD. Portanto, propõe-se incluir esse protozoário na classificação etiológica de osteomielite, ficando a expectativa de se definir o mecanismo de destruição óssea, identificando primeiramente os fatores produzidos durante o processo inflamatório que tenham ação lítica no tecido ósseo na LT.

CONCLUSÕES

8. Conclusões

- Os pacientes tiveram diagnóstico de leishmaniose cutânea difusa (LCD), confirmados pelos aspectos clínico, imunológico e parasitológico. A espécie, *Leishmania (L.) amazonensis*, pertencente ao sub-gênero *Leishmania*, foi isolada em sete pacientes desse estudo.
- O exame clínico das extremidades distais dos MMSS e MMII na LCD é importante na investigação do comprometimento ósseo.
- Cinco pacientes tiveram deformidades articulares nos dedos das mãos e pés, com características semelhantes e envolvimento bilateral, como se segue: deformidade em flexão das articulações interfalangianas e braquidactilia secundária a retrações dos tecidos moles, afilamento e encurtamento do comprimento dos dedos comprometidos.
- As deformidades estavam relacionadas às lesões cutâneas, com ou sem atividade inflamatória clínica.
- O estudo cintilográfico demonstrou ser importante na localização e extensão do processo inflamatório em todos os pacientes com lesões ósseas em atividades.
- A cintilografia óssea mostrou índices de hipercaptação maior no tecido ósseo em relação aos tecidos de partes moles adjacentes nos pacientes estudados.

- O exame radiográfico foi útil na identificação das lesões ósseas, como lesões líticas e reabsorção das falanges distais dos dedos das mãos e pés.
- No tecido ósseo foi identificado processo inflamatório crônico em sete pacientes, sendo isolada a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* caracterizando o quadro como osteomielite crônica em quatro casos, e como processo inflamatório inespecífico em três casos.
- A amostra de tecido ósseo examinada não mostrou alterações histológicas de processo inflamatório provocado por outros agentes causadores de osteomielite.
- Em relação ao estudo experimental, o exame histopatológico mostrou processo inflamatório crônico semelhante à resposta inflamatória da lesão cutânea da LCD, caracterizado por infiltrado celular, com predominância de macrófagos com intenso parasitismo por *Leishmania*.
- O processo inflamatório observado no modelo experimental identificou a *Leishmania* no canal medular e adjacente ao osso, confirmando o parasito como agente de osteomielite crônica.
- O tecido cartilaginoso foi comprometido de maneira secundária, mostrando que na LCD ocorre uma maior destruição no tecido ósseo.

ANEXO A – Termo de consentimento assinado por cada paciente/ LCD**CONSETIMENTO INFORMADO****Protocolo nº _____ Pesquisador:** Af Ali U.M.L.da Costa**Local da Pesquisa:** Hospital Dr Carlos Macieira**Equipe de apoio:****Nome do paciente:****Data de Nascimento** ____/____/____ **Idade** ____ **Sexo** ____**Grau de instrução:****Profissão:****Endereço:****Cidade:****Estado** ____

Eu, _____

após ser esclarecido e entender as explicações que me foram informadas pelo Dr Af Ali Uthant Moreira Lima da Costa e sua equipe, acerca do que devo receber em benefício clínico, inclusive alertado para os riscos que possam ocorrer por estar participando desta pesquisa, aceito submeter-me a exames por imagens, exames laboratoriais específicos e inespecíficos, assim como biópsia das lesões do tecido ósseo, sob anestesia em centro-cirúrgico e usar medicamento sob prescrição médica (Anfotericina B lipossomal- AMBISOME).

Estou ciente de que terei o direito de sair do estudo, em qualquer momento, sem que isso prejudique o meu tratamento.

Paciente ou Responsável : _____**Testemunhas:** _____**Local:** _____ **Data:** _____

**ANEXO B – Aprovação junto a Comissão de Ética do Hospital Universitário
da Universidade Federal do Maranhão**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO(USP)
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DAS MOLÉSTIAS INFECCIOSAS

PROJETO DE PESQUISA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS NA LEISHMANIOSE
CUTÂNEA DIFUSA (LCD)**

Af Ali Uthant Moreira Lima da Costa
Af Ali Uthant Moreira Lima da Costa

*Aprovado na Reunião
de Assessoria Departamental
realizada em 10.08.2000*

Prof. Luiz Filipe Faria
Matrícula 1187-8
Chefe do Departamento de Patologia

ANO 2000

ANEXO C - Termo de aprovação pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL 3671
SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.02.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 841/00 intitulado: "**Estudo das alterações ósseas na Leishmaniose cutânea difusa (LDL)**", apresentado pelo(a) pesquisador(a) **Dr. Af Ali Uthant Moreira Lima da Costa**, do Departamento de Patologia, bem como assinatura e carimbo no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 15 de fevereiro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão de Ética Para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

ANEXO - D –**CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO**

Data do preenchimento:

Nome:

Idade: Raça: Sexo: () 1.M 2.F Profissão:

Endereço residencial:

Estado:

Tempo de moradia: Local provável de contágio:

Tempo de evolução da doença:

Existência na localidade de algum caso de LTA?

Antecedentes mórbidos pessoais:

Tratamento anterior: () 1. sim 2. não

Droga:

Tratamento atual () 1. sim 2. não Peso do paciente: kg

Droga: Anfotericina *B lipossomal*

Dose/dia:

início: / / término : / /

Local da internação hospitalar: Hospital Dr Carlos Macieira- HCM

Data da Internação: / / Data da Alta Hospitalar: / /

Termo de consentimento : () 1. assinou 2. não assinou

EXAME FÍSICOLesão de pele: () 1. sim 2. não

Nº de lesões: MMSS

MMII

Tipos:

Localização:

Deformidades das extremidades: () 1.sim 2.não localização:

Lesão de Mucosa: () 1.sim 2.não Localização:

0º ao 9º DIA DE INTERNAÇÃO: *História clínica; exame físico com descrição das lesões cutâneas e deformidades; documentação fotográfica do paciente; exames complementares específicos: IDRM e RIFI e histopatológico das lesões de pele; discussão do caso e definição da conduta clínico-cirúrgica. Realização de cintilografia óssea e radiografias.*

10º DIA DE INTERNAÇÃO: *Verificar os exames imunológicos e de imagens e discutir o caso com toda a equipe. Realização da biopsia do tecido ósseo adjacente às lesões. Encaminhamento do material coletado (amostra de tecido ósseo) para o LIM-50/FMUSP.*

11º ao 60º DIA DE INTERNAÇÃO: *Início do esquema terapêutico com Anfotericina B lipossomal (AMBISOME) via parenteral. Discussão da evolução do caso. Alta hospitalar e acompanhamento ambulatorial, após melhora clínica.*

RESULTADOS DOS EXAMES

RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES ESPECÍFICOS PARA LCD

1. IMUNOLÓGICOS

IDRM: () 1. sim 2. não Leitura: () Positivo () Negativo

RIFI: () 1. sim 2. não Leitura () Positivo () Negativo

2. PARASITOLÓGICO DE LESÕES DE PELE

2.1 Hematoxilina- Eosina (H&E)

2.2 Imunohistoquímica

2.3 Cultura e identificação da cepa

3. RESULTADOS DOS EXAMES DE IMAGENS DO TECIDO ÓSSEO

3.1 Cintilografia Óssea:

3.2 Radiografias:

4 HISTOPATOLÓGICO DO TECIDO ÓSSEO

4.1 Hematoxilina-Eosina

4.2 Ziehl-Neelsen

4.3 Gomori- Grocott

4.4 Imunohistoquímica

REFERÊNCIAS

Abreu AL. *Estudo da visceralização da Leishmania (L.) amazonensis no modelo murino* [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2003.

Altamirano AJE, Moreira JS, Marzochi MCA. *Lesión lítica craneana por Leishmaniasis en Makat-Tampu durante el imperio inca: siglos XV – XVI, valle del Bajo Rímac, Perú*. Rev Museu de Arqueología e Etmología. 2001; 11: 227-42.

Akuffo HO, Maasho K, Blostedt M, Höjeberg B, Britton S, Bakhet M. *Leishmania aethiopica derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for IL-10 while those from localized leishmaniasis patients induce IFN- γ* . J Infect Dis. 1997; 175: 737-41.

Arias AC. *Foco familiar de leishmaniasis tegumentar americana*. In: 5ª Reunion de la Sociedad Argent de la Patol Reg del Norte, Buenos Aires. 1930; p. 590-94.

Arias AC, Rosa A. *Existen localizaciones óseas en la leishmaniasis americana ?*. In: 6ª Reunión de la Sociedad Argent de la Patol Reg del Norte, Buenos Aires. 1931; p. 460.

Ashford RW, Desjeux P, Derradt P. *Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis*. Parasitol Today., 1992; 8: 103- 4.

Baltensperger M, Klaus Gratz, Bruder EB, Lebeda R, Makek M, Eyrich G. *Is primary chronic osteomyelitis a uniform disease? Proposal of a classification basead on a retrospective analysis of patients treated in the 30 years.* J Cranio-Maxillofacial Surg. 2004; 32: 43-50.

Barral A, Pertesen AA, Sacks DL, Nívea FA. *Late mestastatic leishmaniasis in the mouse.* Am J Trop Med Hyg. 1983; 35: 732-4.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momem H, Mc Mahon-Pratt D, Jesus A, Almeida, R, Badaró R, Barral-Netto M, Carvalho E.M, Johson Jr W.D. *Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease.* Am J Trop Med Hyg. 1991; 44: 536-46.

Barral A; Costa JML, Bittencourt AL; Barral-Netto M; Carvalho EM. *Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects.* Int J Dermatology 1995; 34: 474-9.

Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Carvalho EM. *Imunologia da Leishmaniose tegumentar: revisão.* Rev Soc Bras Med Trop. 1986; 19: 173-91.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YAW, Ellingsworth LT, Twardzick DR, Reed SG. *Transforming growth factor beta in leishmanial infection: parasite scape mechanism*. Science. 1992; 257: 545-8.

Barral-Netto M, Silva JS, Barral A, Reed SG. *Up regulation of Th2 and down regulation of Th1 cytokines during murine retrovirus induced immunodeficiency syndrome (MAIDS) enhances susceptibility of resistant mouse strain to Leishmania amazonensis*. Am J Pathol. 1995; 146: 635-41.

Barrientos PL. *Um caso típico de leishmaniose cutâneo-mucosa*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1948; 46: 415-8.

Barros RF, Lima MLT, Correa AA. *Alterações sinusais na leishmaniose nasal com estudo radiográfico e histopatológico*. Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo. 1952; 7: 145-50.

Bittencourt AL, Guimarães N A. *Imunopatologia da leishmaniose tegumentar difusa*. Med Cutan Ibero Lat Am. 1968; 2: 395-402.

Bittencourt AL, Freitas LAR. *Imunopatologia de leishmaniose tegumentar difusa. Aspectos anátomo patológicos*. Med Cutan Ibero Lat Am. 1983; 11: 265- 70.

Bittencourt AL. *Leishmaniose cutânea difusa*. In: Talhari S, Neves RG (editores). *Dermatologia tropical*. Manaus: Imprensa Universitária; 1985.

Blais RE, Cesani F, Ali S, Calhoun J, Mader J. 1997. *Blastomycotic osteomyelitis of the plvis: a case report*. *Am surg*.1997; 63: 414-6.

Borgia G, Reynauld L, Cerini R, Ciampir R, Schioppa O, Dello-Russo M, Gentile I, Piazza M. *A case of Paracoccidioidomycosis: experience of Naples Frederico II, Italy*. *Infection*. 2000; 28: 119-20.

Braga FJHN. *Nuclear medicine in tropical diseases*. *Braz Arch Biol Technol*. 2002; 45: 1-7.

Brito T, Franco MF. *Granulomatous inflammation*. *Rev Inst Med Trop So Paulo*. 1994; 36: 185-192.

Bryceson ADM. *Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I: the clinical and histological features of disease*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969; 63: 708-37.

Bryceson ADM. *Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia II: treatment*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1970a; 64: 369- 79.

Bryceson ADM. *Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia III: immunological studies*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1970b; 64: 380-7.

Bryceson ADM. *Leishmaniasis*. In: Cook GC, editor. *Manson's tropical diseases*,. WB Saunders. London; 1996: p. 1213-45.

Buckholz JM. The *surgical management of osteomyelitis: with special reference to a surgical classification*. J Foot Surg. 1987; 26 (1 Suppl): S17-24.

Burraco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E. *Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with Leishmania donovani: Infection in a dog*. J Small Anim Pract. 1997; 38: 29-30.

Chang KP, Chauduri D, Fong D. *Molecular determinants of Leishmania virulence*. Ann Rev Microbiol 1990; 44: 499-459.

Chunge CN, Owate J, Pampa HO, Donno L. *Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate*. Trans R Soc trop Med Hyg. 1990; 84: 221-5.

Coelho HE. *Patologia veterinária*. Manole. São Paulo; 2002: 234p.

Convit J, Lapenta P. *Sobre un caso de leishmaniasis disseminada*. Rev Patol Clin. 1946; 17:153-8.

Convit J. *Leishmaniasis tegumentária difusa: Nueva entidad clinico patológica y parasitária*. Rev Sanid Assist Soc. 1957; 23: 1-2.

Convit J, Kerdel-Vegas F. *Disseminated cutaneous leishmaniasis*. Arch Dermatol. 1965; 91: 439-447.

Convit, J., Pinardi, M.E., Rondon, A.J. *Diffuse cutaneous leishmaniasis a disease due an immunological defect of the host*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1972; 66: 609-10.

Convit J. *Leprosy and leishmaniasis similar clinical- immunological pathological models*. Ethiop Med J. 1974, 12: 187-95.

Convit J, Pinardi ME. *Cutaneous leishmaniasis. The clinical and imunopathological spectrum in South America*. In: Ciba Found. Symp. Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas diseases. New York: Elsevier; 1974. p. 159-69.

Convit J, Castellanos PL, Rondon A, Pinardi ME, Ulrich M, Castes M, Bloom B, Garcia L. *Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis*. Lancet. 1987; I: 401-4.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Ceres-Dittmar G, Castes M, Rondan AJ. *The clinical and immunological spectrum of american cutaneous leishmaniasis*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993; 87: 444-8.

Corradin SB, Mauel J. *Phagocytosis os Leishmania enhances macrophage activation by IFN gamma and lypopolysaccharide*. J Immunol. 1991;146: 279-85.

Corrales PH, Laines HN. *Leishmaniasis cutânea disseminada: revision del tema e informe del primer case em Honduras*. Med Cut. 1968; 3: 119-24.

Costa, O G. *Dactylitis Leishmaniotica*. Arch Argent Dermatol. 1953; 3: 149-53.

Costa JML, Marsden PD, Llanos-Cuenta Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. *Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinc in Bahia, Brasil: a report of eight cases*. J Trop med Hyg. 1986; 89: 319-21.

Costa JML, Saldanha ACR, Silva CMP, Serra-Neto A, Galvão CES, Godinho AMR, Silva AR. Mendes WS, Silva, ACM. *Estágio atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. I. Relato preliminar*. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24: 59-60.

Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACM, Serra-Neto A, Galvão CES, Silva CMP. *Estado atual da leishmaniose cutânea difusa no estado do Maranhão: aspectos epidemiológicos, clínicos-evolutivos*. Rev Soc Bras Med Trop. 1992; 25: 115-23.

Costa JML, Saldanha ACR, Pedroso e Siilva CM, Branco MRFC, Barral A, Carvalho EM, Bittencourt AL. *Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL)*. Rev Soc Bras Med Trop. 1995; 28:45-7.

Costa JML, Cunha AK, Gama MEA, Saldanha ACR. *Leishmaniose cutânea difusa: revisão*. An Bras Dermatol. 1998; 73: 565-76.

Costa JML. *Estudo da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no estado do Maranhão-Brasil: avaliação terapêutica e correlação do perfil imunológico entre pacientes e seus familiares* [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1998.

Cunha AKB, Freitas-Junior A, Gama MEA, Costa JML. *Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil*. In: Anais do XXXIII Cong Soc Bras Med Trop, Belo Horizonte-MG. 1997. TL-030, 43.

Dalinka M K, Lally J F, Koniver G, Coren G. *The radiology of osseous and articular infection*. Crit Rev Clin Radiol Nucl Med. 1975; 7:1-64.

Develoux M, Diallo S, Dieng Y, Mane J, Huerre M, Pratlong F, Dedet JP, Ndiaye B. *Diffuse cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major in Senegal*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996; 90: 396-7.

Diaz HB, Martinez D, Quinones M, Estevez FN. *Leishmaniose anérgica na Republica Dominicana: estudo de 20 casos*. An Bras Derm. 1985;60:228-36.

Druille P, Hagan P, Rook GAW. *The importance of models of infection in the study of disease resistance*. Trends Microbiol. 2002; 100: S38-S46.

Falqueto A, Sessa PA. *Leishmaniose tegumentar americana*. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu.1996. p. 750-61.

Franco, AMR. *Frist Word Congress on Leishmaniasis- World Leish 1*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1997; 92 : 867-70.

FUNASA/OMS. *Manual de controle de leishmaniose tegumentar americana*. Brasília, 2000: 62p.

Goldenberg S. *Aspectos éticos da pesquisa com animais*. Acta Cir Bras. 2000; 15: 193-4.

Gottlieb T, Atkins BL, Shaw DR. *Soft tissue, bone and joint infections*. J Infectious diseases Med Aust. 2002; 17: 609-15.

Gonçalves da Costa S. *Mouse model for Chagas disease. Does mouse represent a good model for Chagas disease?* Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 269-72.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA L. *Major amastigotes initiate the L- arginine- dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor.* Am J Imm. 1990; 145: 4290-7.

Grevelink SA, Lerner EA. *Leishmaniasis.* J Am Acad Dermatol. 1996; 34:257-72.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, MacMahon-Pratt D. *A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world.* Am J Trop Med Hyg. 1989; 41: 687-25.

Grimaldi G Jr, MacMahon-Pratt D. *Leishmaniasis and its etiologic agents in the new world: an overview.* In: T. SUN. Progress in clinical parasitology. Philadelphia: Field & Wood; 1991. p. 73-118.

Guenoun FZ, Doukan S, Bouree P, Vielleffrona A. *Une eruption cutané diffuse et persistente chez une immunodéprimée.* Ann. Pathol. 1990; 10: 365-6.

Guimarães N, Silva YP. *Lesões ósseas da Leishmaniose*. An Bras Derm Sif. 1957; 32: 5-7.

Gulmann C, Young O, Tolan M, O'riordan D, Learder M. *Chronic osteomyelitis mimicking sarcoma*. J Clin Pathol. 2003; 56: 237-9.

Hungria Filho JS. *Infecções osteoarticulares: tratamento racional baseado na patologia*. São Paulo: Sarvier; 1992. Cap. 8: Aplicações práticas.

Ispoglou SS, Zormpala A, Androulaki A, Sipsas NV. *Madura foot due to actinomadura madurae. Imaging appearance*. J Clin Imag. 2003; 27: 233-5.

Ishimi Y, Myaura C, Hejin C, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Hishimoto T and Suda T. *IL-6 produced by osteoblasts and induced bone resorption*. J Immunol. 1990; 145: 3297-303.

Jesus-Garcia, R. *Biópsia percutânea nas lesões neoplásicas do esqueleto*. Rev Bras Câncer, 1987; 32: 185 p.

Kahn DS, Pritzker K P H. *The pathophysiology of bone infection*. Clin Orthop. 1973; 96: 12-9.

Killick- Kendric R. *Biology of Leishmania in phlebotominae sandflies*. In: Peters W, Killick-Kendrick, editors. The leishmaniasis and biology and medicine. Academic Press, London; 1987: p. 395-460

Kochs AG. *Sulla partecipazione ossea nella leishmaniosi cutanea*. Minerva Dermatol. 1969; 99: 445-58.

Kodak Eastman Company. *User's guide*. Direct view CR 800, system n° 5E2243. 2000.

Kothari NA, Pelchovitz DJ, Meyer JS. *Imaging of musculoskeletal infections*. Pediatric musculoskeletal radiology. Radiol Clin North Am. 2001; 39: 653-71.

Lainson R, Shaw JJ. *Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems*. Brit Med Bull. 1972; 28: 44-8.

Lainson R, Shaw JJ. *Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America*. Nature, 1978; 273: 596-600.

Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, classification and geographical distribution*. In. W. Peters, R. Killick-Kendric, editors. The leishmaniasis in biology and medicine. Academic Press Inc., London. 1987; 1: 1-120.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. *The dermal leishmaniasis of Brazil, with especial reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 435-43.

Lainson R. *Leishmania e Leishmaniose, com particular referência à região amazônica do Brasil*. Rev Paraense de Medicina. 1997; 11: 29-40.

Lech O, Severo AL, Silva LHP, Marcolon AM, Eyer EL, Jung HOKM. Efeito do uso de corticóide em tendões previamente traumatizados: estudo experimental. 1996;31: 187-92.

Lemos C, Andrade JSF, Aymoré, Barbosa CSP. *Sistema ósteo-articular*. In: Bogliolo patologia. Brasileiro G F. Editor. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2000; cap. 26: 873 – 927.

Lew DP, Waldvogel L, Francis A. *Current concepts: osteomyelitis*. N. Engl J Med. 1997; 336: 999- 1007.

Locksley RM, Scott P. *Helper T- cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function*. Parasitol. Today 1991; 7: 58-61.

Luján LAV. *Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea causada por Leishmania (Viannia) brazileinsis em Corte de Pedra, Bahia, Brasil*. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33: 101-2.

Ma J, Chan JKC. *Granulomatous osteomyelitis caused by bactéria other than mycobactéria: a report of two cases*. Pathol. 2002;34.

Mader JT, Ortiz M, Calhoun JH. *Update on the diagnosis and management of osteomyelitis*. Clin Pediatr Med Surg. 1996; 13: 701-24.

Mariano M. *The experimental granuloma: a hypothesis to explain the persistence of the lesion*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995; 37: 161-76.

Márquez F. *Leishmaniasis cutanea disseminada anergica. Presentacion Del primer caso observado em México*. Med Cut. 1966; 1: 287-92.

Marrero CM, Merino AJ, Rodrigo PJ, Bartolomé AM, Camino FA, Grande SC. *Chronic recurrent multifocal osteomyelitis*. An Esp Pediatr 2001; 54: 181-4.

Marsden PD, Llanos- Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JML, Jones TC. *Human mucocutaneous in três Braços, Bahia-Brazil. An area of Leishmania braziliensis braziliensis transmission III: Mucosal disease presentation and initial evolution*. Rev Soc Bras Med Trop 1984; 17: 179-86.

Marsden PD. *Pentavalent antimonials. Old drugs for new diseases*. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18: 187-98.

Marsden PD. *Mucosal leishmaniasis (Espundia/Escomel,1911)*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986; 80: 859-76.

Maüel J, Behin R. *Immunity: clinical and experimental*. In: Peters W, Killick-Kendric K, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987, p. 731-791.

Mayer M, Convit J, Pifano F. *Estudios experimentales con una cepa de leishmaniasis tegumentar diseminada aspecto lepromatoso*. Arch Venez Med Trop. 1948; 1: 183-92.

Marzochi MCA. *Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares*. J Bras Med. 1992; 63: 82-102.

Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. São Paulo.(Editores). Atheneu. Benjamin Cimerman & Sergio Cimerman; 1999.

Medina R, Romero J. *Estudio sobre la leishmaniasis tegumentaria en Venezuela*. Dermatol Venez. 1957; 1: 33-6.

Medina R, Romero J. *Estudio clínico e parasitológico de uma nova cepa de leishmania*. Arch Venez Pat Trop. 1962; 1: 319-53.

Melo NM, Mayrink K, Costa CA, Magalhães PA, Dias M, Willians P, Araújo FG, Coelho NV, Batista SM. *Padronização do antígeno de Montenegro*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1977; 13: 161-4.

Mendes W S, Silva AA, Trovão JR, Silva AR, Costa JML. *Space expansion of American visceral leishmaniasis in São Luís, Maranhão, Brazil*. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 227-31.

Ministério da Saúde. *Relatório da Oficina de Trabalho de leishmaniose*. FNS, Centro Nacional de epidemiologia. Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. Brasília (DF); 1997.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância Epidemiológica. *Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana*. 5ª ed. Brasília; 2000. p. 7-62.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*. Brasília; 2002; 2 (5). Disponível em: www.funasa.gov.br.

Muniz AE, Evans T. *Chronic paronychia, osteomyelitis and paravertebral abscess in a child with blastomycosis*. J Emerg Med. 2000; 19: 245 -8.

Murray HW, Cartelli DM. Killing of intracellular *L. donovani* by human mononuclear phagocytes. *Evidence for oxygen-dependent and independent leishmanicidal activity*. J Clin Invest. 1983; 72: 1506-10.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. *Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity.* J Exp Med. 1983; 158: 670-89.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi KV, White P, Henderson B. *Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. Minireview.* Infect Immunol. 1996; 64:2371-80.

Nery-Guimarães F. *Leishmaniose experimental IV: Reprodução em hamster (Cricetus auratus) de uma leishmaniose cutânea nódulo-tumoral oriunda da Amazônia (Histiocitoma leishmaniótico).* O Hospital. 1951; 40: 11-24.

Nogueira SA, Guedes AL, Whake B, Campella S, Rodrigues K, Abreu TF, Morais JC, Lambert JS. *Osteomyelitis caused by Paracoccidioides braziliensis in child from the metropolitan area of Rio de Janeiro. Case report.* J Trop Pediatr, 2001; 47: 311-4.

Norden CW. *Lessons Learn from Animal models of Osteomyelitis.* Rev Infect dis. 1988; 10: 103-110.

Novarini A, Montanari A, Bruschi G, Rossi E, Borbhatti A, Migone L. *The kinetics of aminosidine in renal patients with different degress of renal failure.* Clin Nephrol. 1975; 4: 23-4.

Ogawa MM, Macedo FS, Achorne MM, Tomimori-Yamashita J. *Unusual location of cutaneous leishmaniasis on the hallux in Brazilian patient*. Int J Dermatol. 2002; 41: 439-40.

Olliaro P, Bryceson, ADM. *Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis*. Parasitol Today 1993; 9: 323-38.

OPAS. *Las condiciones de la salud en las Américas*. Washington (DC). 1994; 2: p.370-81 (Publ Cient no 149).

Orsini O. *Leishmaniose em Minas Gerais*. Rev Bras Med. 1940; 131:8-14.

Pearson RD. *Pathology of leishmaniasis*. In: Warren KSS, editor. Immunology and molecular biology of parasitic infection. Boston: Blackwell Scientific Publication. 1993: p. 71-86.

Pearson RD, Sousa AQ. *Clinical spectrum of leishmaniasis*. Clin Infect Dis. 1996; 22: 1-13.

Perez H, Arredondo B, Gonzalez M. *Comparative study of american cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice*. Infect Immun. 1978; 22: 301-7.

Pessoa SB, Barreto MP. *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1948.

Pessoa SB, Vianna A. *Parasitologia médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan; 1978.

Petersen EA, Neva FA, Barral A, Correa-Coronas R, Boggart-Diaz H, Martinez D, Ward FE. *Monocyte suppression of antigen specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patient from Dominican Republic*. J Immunol. 1984; 132: 2603-6.

Pimenta LG, Silva AL. *Ética e experimentação animal*. Acta Cir Bras. 2001; 16: 255-60.

Pritchard DJ. *Granulomatous Infections of bones and joints*. Orthop Clin North Am. 1975; 6: 1029-47.

Pupo JA. *Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana (Leishmania Brasiliensis- Vianna 1911)*. Rev Hos Clin Fac Med São Paulo. 1946; 1: 113-63.

Rabelo, FE. *A leishmaniose tegumentar no ciclo morfológico das leishmanioses*. In: IV Congresso de Dermatologia Ibero-Latino Americano e Luso-Espanhol. Portugal; 1959.

Rabello, E. *Formes cliniques de la Leishmaniose Tégumentaire*. In: XII Congrès des Dermatologistes et Syphiligraphes de Langue Française, Strasbourg, Juillet, 1923.

Ready PD, Ribeiro AL, Lainson R, Alencar JE, Shaw JJ. *Presence of Psychodopygus wellcomi in Ceará state*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1983;78: 235-36.

Rebêlo JMM, Mendes WA, Costa JML, Cavaleiro N. *Lista preliminar das espécies do gênero Lutzomya, França. 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do Estado do Maranhão, Brasil*. Cad Saúde Pública. 1996; 12: 37-45.

Ridley DS. *A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1980; 74:515-21.

Ridley DS. *Pathology*. In: Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: Peters W, Killick-Kendric, editors. The leishmaniasis. London: Academic Press; 1987: p. 670-80.

Rodriguez G, Corredor A, Caceres E, Cassiano G, Arroyo C, Palau MT, Boshel J. *Leishmaniasis difusa*. Biomédica. 1985; 5:95-111.

Rodriguez LV, Uzquiano FC, Desjeux P, Valle SWC. *Leishmaniose cutânea recidivante com alterações ósseas: relato de caso*. An Bras Dermatol. 1988; 63: 31 -4.

Rogers LF. *Infecções e Inflamações dos ossos*. In: Juhl JH, Crummy AB. Interpretação radiológica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996: p. 161-182. 5º capítulo.

Rosenbeg A. *Ossos, articulações e tumores de partes moles*. In: Robbins. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000: p.1087 -134.

Saldanha AC, Malheiros TS, Rodrigues CCR, Balby ITA, Costa JML. *Alterações ósseas observadas na leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão*. Rev Soc Bras Med Trop. 1995; 28:55-6.

Sampaio RNR. *Tratamento hospitalar da leishmaniose cutâneo-mucosa* [tese]. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais; 1984.

Sampaio RN, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Cuba CC, Grimaldi Jr G. *Leishmania mexicana amazonensis isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis*. Rev Soc Bras Med Trop. 1985; 18: 273-4.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas; 1998. Cap. 5, p.71-83: Glossários dermatológicos.

Sandor M, Weinstock JV, Wynn TA. *Granuloma in schistosomose and mycobacterial infections: a model of local immune response*. Trends Immunol. 2003; 24:44-52.

Septimus EJ, Musher DM. *Osteomyelitis: recent clinical and laboratory aspects*. Symposium on the role of laboratory in Orthopedics practice. Orthop Clin North Am. 1979; 10:347-59.

Shaw JJ, Lainson R. *Ecology and epidemiology: new world*. In: the leishmaniasis in biology and medicine. Peters W; Killick- Kendrick R. Editors. London: academic press. 1987;1: 291-363.

Shaw JJ. *Taxonomy of the genus Leishmania. Present and future trends and their implications*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89:471-8.

Siemens Diacam. *Operating instructions*. Reference Guide. Publication nº 5244202; 1998.

Silva D. *Leishmaniose tegumentar queloidiana com lesões ósseas*. An Bras Derm Sif. 1958; 33:3-7.

Silva F. *Forma raríssima de leishmaniose tegumentar: Leishmaniose dérmica não ulcerada em nódulos e extensa placas infiltradas e hiperpigmentadas*. In: Reunião Anual de Dermato-sifilografos Brasileiros. Rio de Janeiro; 1945; p.97-103. [Separata].

Silva D, Maroja R, Salgado U, Loureiro A. *Leishmaniose anérgica hansenóide*. Derm Iber Lat Am. 1972; 14:493-506.

Silva D. *Leishmaniose anérgica hansenóide*. An Bras Derm. 1978;53: 161-8

Silva AR, Martins G, Melo JE, Araújo JP, Mendes JR, Mendes MG. *Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (Estado do Maranhão), Brasil*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1979; 21:43-50.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Sousa, AA, Ishikawa BA, Braga RR. *Cutaneous leishmaniasis due to leishmania (leishmania) amazonensis in Amazonian Brazil*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991; 85:735-8.

Silveira FT. *Resultados preliminares do tratamento de dois casos de leishmaniose cutânea difusa, diagnosticados em diferentes fases evolutivas da doença*. In: XXIX Cong Soc Bras Med Trop. Fortaleza. 1993a; 68:106.

Silveira FT, Mayrink W. *Leishmaniose cutânea difusa no Estado do Pará, Brasil. Registro do 1º caso de cura da doença, após associação de quimioterapia com imunoterapia.* In. XXIX Cong Soc Bras Med Trop. Fortaleza; 1993b: p. 229.

Silveira FT, Mayrink W. *Leishmaniose cutânea difusa no Estado do Pará, Brasil. Relato da cura de 1 caso depois de 24 anos de doença, após tratamento combinado de quimioterapia com imunoterapia.* In: XXXIII Cong Soc Bras Med Trop. Belo horizonte. 1997: p.129.

Silveira FT, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MC, Roberto ACBS, Ramos M, Sobrinho AN, Ishikawa EA, Shaw JJ. *Observação sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil.* Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32: 413-23.

Silveira FT, Laison R, Corbett CEP. *Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 239-51.

Terra F. *Leishmaniose tegumentar no Brasil.* Rev Soc Bras Derm. 1913; 3:58-66.

Trueta J. *The three types os acute haematogenous osteomyelitis. A clinical and vascular study.* J Bone Joint Surg 1959; 41B: 671-80.

Turrel JM, Pool RR. *Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis*. Vet Radiol. 1982; 23:243-9.

Turk JL, Bryceson ADM. *Immunologic phenomena in leprosy and related diseases*. Adv Immunol. 1971; 13:209-66.

Vlassof C. *Estado actual de la investigación social y económica sobre las enfermedades tropicales*. In: Briceño-León R, Pinto Dias J. Las enfermedades tropicales en sociedad contemporánea. Caracas: Fondo Editorial Acta Científica de Venezuela y Consorcio de Ediciones Capriles; 1993. p.15-28.

Waldvogel FA, Papageorgiou PS. *Osteomyelitis: the past decade*. N Engl J Med. 1980; 303:360-70.

Walton BC, Intermill RW, Hadjuk ME. *Differences in biological characteristics of three Leishmania from patients with espundia*. Am J Trop Med Hyg. 1977; 26:850-5.

Weiser WY, Van Neil A, Clark SC, David Jr, Romold HG. *Recombinant human granulocyte/macrophage colony-derived macrophages*. J Exp Med. 1987;166:1436-38.

Who. Control of the leishmaniasis. Technical report series 793, Geneva. World Health Organization; 1990 : 158p.

Williams GT, Williams WJ. *Granulomatous inflammation: a review*. J Clin Pathol. 1983; 36:723-33.

Zimmerman MR, Kelley MA. *Atlas of human paleopathology*. New York: Praeger Publishers CBS Educational and Professional Publishing a Division of CBS Inc. New York. 1982.

Zuluaga AF, Galvis W, Jaimes F, Vesga O. *Lack of microbiological concordance between bone and non-bone specimens in chronic osteomyelitis: an observational study*. BMC Infectious Diseases. 2002; 2:8.

APÊNDICES

Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL)

Af Ali Uthant M.L. Costa ^a, Jackson M L Costa ^{a,c,*}, Ana Cristina R. Saldanha ^a, Bruno M. C. Leite^b, Bruno Ramos^b, Ibraim Assub Junior^b, A. Barral^c, Almério L L Noronha^c, André Báfica^c, Carlos E.P. Corbett ^d

^a Nucleus of Tropical Pathology and Social Medicine, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luis, MA, Brazil

^b Nuclear Medicine Service (Nuclear Maranhão Clinic), São Luis, MA, Brazil

^c Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ/BA, Salvador, BA, Brazil

^d Laboratory of Immunopathology (LIM-50), Department of Pathology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. *:Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM 50), Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Avenida Dr Arnaldo, nº 455, CEP 01246.903, São Paulo- Brasil .
e-mail : aliuthant@terra.com.br (A.U.M.L. Costa)

ccorbett@usp.br (C.E.P.C);

jcosta@cpqgm.fiocruz.br (J.M.L.Costa)

Abstract

We studied bone lesion alterations in three patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) by imaging exams (radiography and scintigraphy) and histopathology. Two patients had bone lesions of distal extremities of hands and feet, and one infiltrating plaques in the skin. The study was conducted at three specialized centers (Presidente Dutra Hospital/Nucleus of Tropical Pathology, UFMA-MA; Gonçalo Moniz Research Center-FIOCRUZ-BA; Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM-50), University of São Paulo-SP). Three-phase bone scintigraphy demonstrated high sensitivity and specificity for bone lesions, showing increased uptake of the radiopharmaceutical at sites of active lesions. In contrast, radiography demonstrated lytic lesions, cortical destruction and local osteopenia of the bone extremities in two patients. Histopathological analysis showed sequestration with presence of amastigote forms of *Leishmania* (osteomyelitis), mononuclear cells and macrophages containing amastigote forms of *Leishmania* in one patient. These preliminary data indicate that imaging exams (radiography and scintigraphy) are important in the evaluation of bone lesions in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and should be included in the routine histopathological diagnosis of the disease and follow-up of bone lesions.

Keywords: Diffuse cutaneous leishmaniasis; Bone alterations; Imaging exams; Scintigraphy.

1. Introduction

Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) is a rare variant of cutaneous leishmaniasis (CL) and differs from the other forms of the disease by the presence of lesion polymorphism characterized by nodules, infiltrated plaques, tubercles and exulcerations that affect different segments of the body. The intradermal skin test (Montenegro reaction) is negative and the therapeutic response is weak, a fact leading to constant recurrences during the course of the disease (Silva, 1945; Barrientos, 1948; Rabello, 1978; Costa et al., 1992). In Brazil, DCL is concentrated in the North and Northeast regions, with the highest number of cases being reported from the State of Maranhão (Porto and Portugal, 1960; Costa et al., 1991, 1992; Saldanha et al., 1992; Costa, 1998).

According to Guimarães (1957), CL only affects cartilage, while other authors reported the involvement of bone, although the latter can be considered a rare event (Costa, 1953). Silva (1945), reported the case of a patient with CL who presented keloid, sometimes ulcerated, lesions in the upper and lower limbs accompanied by bone deformities, a finding that led the author to propose a new clinical form of the disease (keloid form). The clinical and radiological aspects of individuals with mutilations of the fingers and toes were described in detail only years later, with the signs and symptoms of the disease being compatible with chronic osteomyelitis (Arias, 1930; Arias and Rosa, 1931; Costa, 1953; Saldanha et al., 1995).

Some theories have tried to explain this involvement: according to Barros et al, (1952), bone destruction is the result of inflammatory processes or of specific mucosal lesions that occur adjacent to bone tissue. Guimarães and Silva (1957), defended a hematogenic cause and other investigators believe that bone alterations occur due to contiguity with the cutaneous lesions (Medina and Lizardo, 1960; Saldanha et al., 1995).

In bone tissue, metabolic alterations frequently precede anatomical changes and the use of imaging methods with a high sensitivity and specificity for bone infections might permit the early diagnosis of these alterations (Schauwecker, 1998). We describe here the use of these exams in three patients with DCL caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. The aim of the present preliminary investigation was to help in the diagnosis of bone lesions that sometimes accompany the disease.

2. Material and methods

The study was carried out during a period of 12 months (December 1999 to January 2000) at three specialized services (Presidente Dutra University Hospital-HUPD/Nucleus of Tropical Pathology of the Federal University of Maranhão-UFMA, Gonçalo Moniz Research Center/CPQGM-FIOCRUZ-Bahia, and Laboratory of Immunopathology (LIM-50), University of São Paulo-USP).

Three patients previously diagnosed with DCL caused by *L. L. amazonensis* (Costa et al., 1998) were selected, two with disseminated nodule-vegetating and infiltrating lesions associated with secondary infection and one with infiltrating plaques. The patients were hospitalized at HUPD for laboratory examination, including imaging exams, biopsies of the cutaneous and bone lesions and specialized clinical treatment. Informed consent was obtained from the patients and the study was approved by the Ethics Committee of HUPD-UFMA.

Blood flow, balance (5 min) and bone (3h) scans were obtained by three-phase bone scintigraphy after injection of ^{99m}Tc-MDP (diphosphonate labeled with ^{99m}-technetium) using a GE gamma camera (model STARCAM 3200i), and analyzed by a specialized team from the area of nuclear medicine who were unaware of the clinical and radiographic findings.

In the sequence, patients were then submitted to radiographic examination of the extremities in two planes (anteroposterior and profile), mainly hands and feet, with the results always being correlated with the deformities observed upon clinical examination.

In addition, biopsies were taken from cutaneous lesions, fixed in 10% formalin and stained with hematoxylin-eosin for histopathological examination. In a next step, bone biopsies were obtained from the area adjacent to the skin lesions with bone biopsy needles based on the previously analyzed radiographies and scintigraphy, thus preventing contamination of the samples as proposed by Jesus-Garcia (1987 a, b) and Ghelman (1998). When reaching the bone, fragments were collected from the affected area, and the material was stored in sterilized flasks containing 10% formalin and sent to the pathology service of HUPD and CPQGM for histopathological analysis by light microscopy.

3. Results

In one patient (J.S.C.), radiographic examination revealed the presence of lytic and degenerative lesions in the distal phalanges of the fingers and toes. Scintigraphy showed increased uptake of the radiopharmaceutical in the distal phalanges of the 1st, 3rd, 4th and 5th finger of the left hand.

The other two patients (R.F.O and M.C.M.A) presented diffuse osteopenia in the hands and feet upon radiography, with the absence of a periosteal reaction. Patient R.F.O. showed tapering of the proximal third of the distal phalanges and partial resorption of the phalanges. Scintigraphy revealed increased uptake of the radiopharmaceutical in bone tissue in both patients. Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 show the clinical, radiological and scintigraphic aspects of two patients.

Bone tissue consisted of bone fragments containing histopathologically normal compact cortical bone and fragments of fibrous connective tissue. The presence of mononuclear inflammatory cells and macrophage containing amastigote forms of *Leishmania* and bone sequestration with amastigote of *Leishmania* (osteomyelitis) were noted in one patient. The clinical, radiological, scintigraphic and histopathological data are summarized in Table 1.

4. Discussion

The bone alterations observed in DCL are characterized by shortening of the phalanges, especially the distal phalanges of the hands due to bone destruction and to a reduction in articular space, leading to deformities of skeletal extremities, limiting articular movement and impairing habitual daily life activities (Silva, 1958; Saldanha et al., 1995).

Usually, no return to the normal bone aspect is observed. Almeida (apud, Guimarães and Silva, 1957), carrying out control radiographic exams, demonstrated complete regression of all lesions, with the affected bone recovering its normal shape and structure. The author concluded that irrespective of the mechanism the parasite causes characteristic lesions in the bone tissue, which permit their distinction from other diseases such as bacterial osteomyelitis, syphilis or bone tuberculosis that are characterized by signs and symptoms of condensing chronic osteitis (Arias, 1930; Costa, 1953).

In the present study, such lesions were not detected by this imaging method in only one patient, although the patient was in the active phase of the disease. These deformities are irreversible and evolutive, impairing the execution of basic daily life tasks.

Radiography represents a low cost method, being important for the localization, determination of the extent and presence or absence of a periosteal reaction and the type of lesion

destruction (Jesus-Garcia, 1996; Schajowicz, 2000). In the present study, this method permitted the determination of the symmetric character of the lesions on hands and feet, which were similar in the two patients.

Kochs (1969), described a case of leishmaniasis ulcers affecting the medial malleolus of the ankle detected by radiography in a patient with mucocutaneous leishmaniasis. Barros (1952), characterized the bone alterations found in diseases such as cutaneous leishmaniasis, establishing a radiological picture that could help with the definitive or probable diagnosis; however, various bone lesions show the classic appearance of some specific type of pathology, while many others are nonspecific (Leanne et al., 1998).

Braga et al. (1992, 2002), reported the importance of the study of tropical diseases by scintigraphic methods. No studies on bone involvement in DCL determined by bone scintigraphy are available in the literature. However, this method seems to be important for the localization and definition of the extent of the lesion and for the monitoring of disease activity. Bone scans were found to be efficient in the present study since they showed increased uptake in bone tissue, thus representing a method of choice for the determination of infection of the musculoskeletal system or in patients with osteogenic activity (Schauwecker, 1992; Brown et al., 1993; Palestro and Torres, 1997). Although not presenting concordant bone involvement, one of the patients showed increased uptake of the drug probably due to some osteogenic activity or increased regional blood flow. In clinical practice, the use of imaging exams and the clinical understanding of the disease represent a dynamic approach to the analysis of bone lesions, since accumulation of a radiopharmaceutical is associated with specific histological alterations (McCarthy, 1997).

The histopathological results of the cutaneous lesions of the present patients showed scarcity of lymphocytes and plasma cells, and a dense infiltrate of macrophages which mainly contained the amastigote forms of *Leishmania* within parasitophorous vacuoles. In addition, an atrophic epidermis

and extensive degradation of the connective collagen matrix were observed, findings similar to those reported by others (Barros et al., 1952; Guimarães and Silva, 1957; Bryceson, 1969).

In conclusion, radiographic and scintigraphic exams of bone lesions seem to play an important role in the identification, localization, follow-up and biopsy management of these lesions. The histopathological study of the lesions is essential for the elucidation of the pathogenesis of bone involvement in DCL.

We intend to continue this study with a larger number of cases and to establish an assessment protocol using imaging and histopathological methods.

References

- Arias, A.C., 1930. Foco familiar de leishmaniasis tegumentar americana. 5 Reunion de La Sociedad Argentina de Patologia Regional del Norte 1, 590-594.
- Arias, A.C., Rosa, A., 1931. Existen localizaciones óseas en leishmaniasis americana? 6ª Reunion de la Sociedad Argentina de Patologia Regional del Norte 2, 460.
- Barrientos, P.L., 1948. Um caso típico de leishmaniose cutâneo-mucosa. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 46, 415-418.
- Barros R F, Lima M L T, Correa A A.,1952. Alterações sinusais na leishmaniose nasal com estudo radiográfico e histopatológico. Revista das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 7,145-150.
- Braga, F.J.H.N., Abreu, C.M., Abreu, P.R., Camargo, E.E., Rivitti, M.C.M., Tedesco-Marchesi, L.C.M., Gambini, D.J., Barritaul, L.,1992. Contribution au début de l'étude de deux maladies infectieuses granulomateuses (La lèpre et la leishmaniose cutanée et muqueuse) par des méthodes scintigraphiques).Bull. Soc. Path. Ex., 85, 53-57.
- Braga, F.J.H.N., 2002. Nuclear Medicine in Tropical Diseases. Brazil Arch. Biol. Technol., 45, 1-7.
- Brown, M. L., Collier Jr, B.D., Fogelman, I. 1993. Bone Scintigraphy: Part 1. Onc. Inf. Journ. Nuc. Med., 34, 2236-2240.
- Bryceson, A.D. M. 1969. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Hyg. 63,708-737.
- Costa, J.M.L, Saldanha, A.C.R, Silva, C.M.P, Serra-Neto A, Galvão, C.E.S, Godinho, A.M.R, Silva, A.C, Mendes, W.S, Silva, A.C.M. 1991. Estágio atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão I. Relato Preliminar. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 24,59-60.

- Costa, J.M.L, Saldanha, A.C.R, Melo e Silva, A.C, Serra-Neto A, Galvão, C.E.S, Pedroso e Silva, C.M, Silva A.R. 1992. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão II. Aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 25,115-123.
- Costa, J.M.L, Cunha, A.K, Gama, M.E.Ã, Saldanha, A.C.R. 1998. Leishmaniose cutânea difusa: revisão. An. Bras. Derm. 73, 565-576.
- Costa, O. G. 1953. Dactylitis Leishmaniótica. Arch. Arg. Derm. 3,149-153.
- Convit, J & Lapenta, P. 1946. Sobre un caso de leishmaniasis disseminada. Rev. Pat. Clin. 17,153.
- Ghelman, B. 1998. Biopsies of the Musculoskeletal System: Interventional Procedures in Musculoskeletal Radiology I. Rad. Clin. North. Am. 36,567-580.
- Guimarães, N, Silva, Y. P. 1957. Lesões ósseas da leishmaniose. An. Bras. Derm. Sifilog. 32,5-7.
- Jesus-Garcia, R. Biópsia percutânea nas lesões neoplásicas do esqueleto. 1987. Rev. Bras. Cancer. 32,185.
- Jesus-Garcia, R. 1996. Tumores Ósseos: Uma abordagem ortopédica ao estudo dos tumores ósseos. Universidade Federal de São Paulo.
- Jesus- Garcia, R. 1987. Estudo das técnicas de biópsia percutânea do esqueleto. Folha Méd. 95,243.
- Leanne, L, Seeger, M.D, Lawrence Yao, M.D, Jeffrey, J, Eckardt, M.D. 1998. Surface lesions of bone. Radiology. 206,17-33.
- Kochs, A. G. 1969. Sulla partecipazione ossea nella leishmaniosi cutanea. Min. Derm. 99,455-458.
- McCarthy, E.F. 1997. Histopathologic correlates of a positive bone scan. Seminars in Nuclear Medicine. XXVII: 309-320.
- Medina, R, Lizardo, C. 1960. Leishmaniasis de la oreja. Derm. Venez. 2,54-57.
- Palestro, C.J, Torres, M.A. 1997. Radionuclide Imaging in orthopedic infections. Seminars in Nuclear Medicine. XXVII:334-345.

- Porto, M.A, Portugal, H. 1960. Leishmaniose tegumentar difusa. O Hospital 57,11-23.
- Rabello, F.E. 1978. Leishmaniose cutis difusa. An. Bras. Derm. 53,157.
- Saldanha, A.C.R, Mello e Silva, A.C, Galvão, C.E.S, Pedroso e Silva, C.M, Costa, J.M.L. 1992. Procedência de pacientes portadores de leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão-Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 25,271-273.
- Saldanha, A.C, Malheiros, T.S, Rodrigues, C.C.R, Balby, I.T.A, Costa, J.M.L. 1995. Alterações ósseas observadas na leishmaniose cutânea difusa (LCD) no estado do Maranhão. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 28,55-56.
- Schajowicz, F. 2000. Neoplasias ósseas e lesões pseudotumorais: patologia, radiologia e tratamento. 2ª Edição. Editora Revinter. RJ.
- Schauwecker, D. S. 1992. The scintigraphic diagnosis of osteomyelitis. AJR.158,9-18.
- Silva, D. 1958. Leishmaniose tegumentar queloidiana, com lesões ósseas. An. Bras. Derm. Sifil. 33,3-7.
- Silva, F. 1945. Forma raríssima de leishmaniose tegumentar. leishmaniose dérmica não ulcerada em nódulos e extensa placas infiltradas e hiperpigmentadas. Janeiro. Separata do volume de Reunião Anual de Dermato-sifilografos brasileiros, Rio de janeiro. 97-103.

Table 1- Clinical, radiological, scintigraphic and histopathological aspects of the three patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) studied at HUPD-UFMA

Patient	Exam			Histopathological aspects
	Clinical characteristics	Radiological aspects	Scintigraphic aspects	
J.S.C.	18-year-old male from Eugênio de Barros-MA. Affected by DCL for 8 years. Clinical data: Nodule-vegetating, ulcerating lesions with secondary infection of the nose, ears, hands and feet. Shortening and deformation of the fingers and toes – limited articular function.	Symmetric, lytic and degenerative lesions in the distal phalanges of the fingers and toes. Absence of a periosteal reaction and marked osteopenia, with tapering of the cortical bone and reduced interdigital spaces. Shortening of these rays.	Increased uptake of the radiopharmaceutical in the distal phalanges of the 1st, 3rd, 4th and 5th finger of the right hand, and 2nd and 5th finger of the left hand. Increased uptake in the middle phalanx of the 3rd, 4th and 5th metacarpal and left phalangeal joints and bones of the left foot.	Cutaneous lesions: atrophic epidermis. Dense macrophage infiltrate containing amastigote forms of <i>Leishmania</i> within parasitophorous vacuoles. Evidence of extensive degradation of the connective collagen matrix. Bone lesions: compact cortical bone without histological alterations, bone sequestration with amastigotes of <i>Leishmania</i> (osteomyelitis caused by <i>Leishmania</i>) and fragments of normal fibrous connective tissue (normal periosteum), with the presence of mononuclear inflammatory cells and macrophages containing <i>Leishmania</i> . Immunohistochemistry – heavy positive for <i>Leishmania</i>
R.F.O.	A 26-year-old male from Coelho Neto-MA. Affected by DCL for 20 years. Clinical data: Nodule-infiltrating lesions in the nose, ears, fingers and toes. Ulcerations with secondary infection of the left leg. Deformities of the fingers with shortening and limited articular function.	Diffuse osteopenia of the hands and feet. Absence of a periosteal reaction. Tapering of the proximal third of the distal phalanges of the fingers and toes. Partial resorption of the distal phalanges of the fingers and toes and reduced interdigital articular space, leading to shortening of these rays.	Increased uptake of the radiopharmaceutical in bone tissue.	Cutaneous lesions: atrophic epidermis. Macrophage infiltrate containing amastigote forms of <i>Leishmania</i> . Scarcity of lymphocytes and plasma cells. Evidence of connective matrix degradation and discrete pericellular and perivascular fibrogenesis at inflammatory foci. Bone lesions: compact cortical bone without histological alterations and fragments of normal fibrous connective tissue.
M.C.M.A	A 19-year-old female from Urbano Santos-MA. Clinical data: Affected by DCL for 12 years. Nodule-vegetating lesions in the nose and ears. Legs with ulcerations and secondary infection. Absence of deformities of the hands and feet.	Diffuse osteopenia of the hands and feet. Absence of a periosteal reaction, lytic lesions and/or cortical destruction. Bone segments without deformities.	Increased uptake of the radiopharmaceutical in the proximal third of the left tibia.	Cutaneous lesions: dermis showing an intense macrophage infiltrate, with large parasitophorous vacuoles containing amastigote forms of <i>Leishmania</i> . Small number of lymphocytes and plasma cells, some areas with various eosinophils. Inflammatory foci showing discrete pericellular and perivascular fibrogenesis and extensive degradation of the collagen matrix. Bone lesions: compact cortical bone without histological alterations, fragments of normal fibrous connective tissue.

Fig 1

Fig. 2

Fig. 3

Figs. 1 – Patient J.S.C – Lesions in infiltrated plaques, with some areas showing hyperchromia on the fingers of right and left hands.

1st and 2nd fingers of right hand showing an extensive exulcerated lesion with tumoral aspect and apparent shortening of the fingers

Fig. 2 – Radiological aspects – Symmetric, lytic and degenerative lesions in the distal phalanges of the fingers. Absence of periosteal reaction and marked osteopenia, with tapering of the cortical bone and reduced interdigital spaces, shortening of these rays.

Fig. 3 – Bone scintigraphy – Note the abnormal increased uptake hyperfixation in the metacarpal-phalangeal joint of the fifth ray and the distal phalanges of the 1st, 3rd, 4th and 5th finger of the right hand and increased uptake in the distal phalanges of the 2nd and 5th finger of the left hand.

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 4 e 5 – Patient M.C.M.A – Lower limbs (right and left legs) – Anterior view: extensive exulcerated lesions, some with a vegetant aspect affecting the middle third and lower legs. Left side: extensive infiltrating nodulous plaque associated with hyperchromia. Posterior view: extensive infiltrating plaques with exulcerated lesions, some showing an ulcer-vegetating aspect and surrounding hyperchromia, while few lesions presented a tubercle-like aspect.

Fig. 6 – Left knee – Radiological aspects – Absence of a periosteal reaction, lytic lesion and cortical destruction

Fig. 7 – Scintigraphy. A: Late increased uptake of the radiopharmaceutical in the proximal third on both sides. Presence of scintigraphic signs of an infectious inflammatory process in the soft parts of the distal third of the right leg.

B: Abnormal increased uptake in the proximal third of the left tibia, in addition to scintigraphic signs of an infectious inflammatory process in the soft parts of the distal third of the right leg.

Experimental model of chronic osteomyelitis caused by
Leishmania (L) amazonensis

Af Ali Uthant Moreira Lima da Costa ^{a,d}, Ana Lúcia Abreu ^b, Claudia
Maria de Castro Gomes ^d, Jackson Maurício Lopes Costa ^{a,c}, Carlos
Eduardo Pereira Corbett ^{d,*}

^a Nucleus of Tropical Pathology and Social Medicine, Federal University of
Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

^b Laboratory of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, State University of
Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

^c Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ/BA, Salvador, Bahia, Brazil

^d Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM 50), Department of
Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. *:Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM 50),
Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo,
SP, Brazil. Avenida Dr Arnaldo, nº 455, CEP 01246.903, São Paulo- Brasil .

e-mail : aliuthant@terra.com.br (A.U.M.L. Costa)

ccorbett@usp.br (C.E.P.C);

jcosta@cpqgm.fiocruz.br (J.M.L.Costa)

Abstract

Experimental animal models have been used for the study of the physiopathogenesis of leishmaniasis, on some occasions with success, while in other situations such as bone alterations that accompany tegumentary leishmaniasis, especially in diffuse cutaneous form (DCL), the mechanisms are still unknown. In the present study, we determined these alterations in an animal model susceptible to *Leishmania (L) amazonensis*. Amastigotes of *L (L) amazonensis* isolated from patients with DCL were inoculated into the hind paws of eight BALB/c mice, macroscopic and histopathological aspects were analyzed. After 90 and 120 days of evolution, histopathological analysis demonstrated a mononuclear cell infiltrate rich in plasma cells and intense parasitism of intra and extramedullary macrophages, with areas of bone necrosis and discrete involvement of cartilaginous tissue. The results show that the inflammatory process developed during *L(L) amazonensis* infection might cause bone tissue destruction and secondarily affect the joints.

Keywords: Osteomyelitis; Pathology; Diffuse cutaneous leishmaniasis; Experimental model

1. Introduction

Although osteomyelitis is an old disease, little is known regarding its physiopathogenesis, diagnosis and treatment, and no ideal experimental animal model exists for its complete study (Norden, 1988).

Waldvogel et al. (1970), reported that the high success rates obtained for antibiotic treatment of infectious diseases contrast to those obtained for bone or joint disorders. As shown in histopathological studies, bone and joint diseases generally manifest as a granulomatous chronic inflammatory reaction and can be grouped together as being of bacterial and/or mycotic etiology, with the establishment of a diagnosis or choice of adequate treatment being difficult (Pritchard, 1975; Marrero et al., 2001). In American tegumentary leishmaniasis (ATL), some investigators have described cases of involvement of bone structures but without explaining the mechanisms responsible for these alterations (Pessoa & Barreto, 1948; Costa, 1953; Guimarães et al. 1957; Domingos Silva; 1958; Bittencourt et al. 1968, 1983; Saldanha, 1995).

Mice have been widely employed as an experimental model mainly because of their physiological and genetic characteristics and easy handling (Druille et al., 2002). Illnesses such as Chagas' disease, leprosy and tuberculosis are studied using mice of the *Mus musculus* lineage (Gonçalves da Costa, 1999; Druille et al., 2002). In leishmaniasis, BALB/c mice are used due to their different susceptibility to given *Leishmania* species, with this line apparently being more susceptible to infection with *Leishmania (L) amazonensis* (Perez et al., 1978; Barral et al., 1983).

Tegumentary leishmaniasis (TL) presents a rare clinical form called diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), described first from a clinical, histopathological and

parasitological aspects in Brazil (Silva, 1945) and Venezuela (Convit, 1946). Later, this denomination was generally used also for cases with localized lesions, which disseminated within a variable period of months to years (Convit et al, 1957; Bittencourt, 1968; Bryceson, 1969). In DCL, the parasite is disseminated through the hematogenic and/or lymphatic route, and the disease evolves with the occurrence of other similar lesions in various segments of the body (Convit et al., 1972; Costa et al., 1992).

In bone diseases, studies on the etiological agents and their physiopathogenic mechanisms in the human organism facilitate treatment. However, there are countless unknown microorganisms causing osteomyelitis (Kahn & Pritzzner, 1973; Waldvogel et al., 1980; Mader et al., 1996).

Few reports are available in regarding the involvement of bone tissue in TL, and the pathogenesis of these lesions in DCL is unknown. Therefore, the aim of the present study was to reproduce infection in an animal model (BALB/c mice) using *L.(L) amazonensis* strains isolated from individuals with DCL in order to better understand the histological alterations and the role of this parasite in bone lesions.

2. Material and methods

2.1 Animals

Eight adult (8 weeks) male BALB/c mice obtained from the animal house of the Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM 50), Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo (FMUSP), were used. The animals were housed in appropriate polyethylene cages at ambient temperature and with ample ventilation under a natural light/dark cycle, with water and food being available *ad libitum*. The animals passed through an 8-day adaptation period at LIM 50 before the experiment. The ethical guidelines for the practice of vivisection of animals in Brazil established by law No. 6.638 of May 8, 1979 were followed (Goldenberg, 2000; Pimenta, 2001).

2.2 Parasites

Four *L.(L) amazonensis* strains were isolated from patients with DCL by the monoclonal antibody technique and used for the study (Costa, 1998).

2.3 Experimental design

The study was carried out at LIM 50, Department of Pathology, FMUSP. Amastigotes 10^7 of *L.(L) amazonensis* were inoculated into the hind foot pad

(subcutaneous) of each animal. The animals were labeled with picric acid, kept isolated during the clinical evolution of the disease, and then sacrificed (Table 1).

2.4 Surgical procedure

The surgical procedures were always performed by the same examiner previously trained in a pilot study as proposed by Mueller (2003). At the beginning of the experiment, the animals were sedated for 3 to 4 min in an individual induction chamber containing cotton soaked with sulfur ether. After sacrifice, the animal was positioned in ventral decubitus and its limbs were fixed to the bench. A trichotomy was performed and the skin in the posterior region of the right hind paw was disinfected with 70% alcohol. A careful dissection was then performed from the lower third of the triceps surae to the paw in a laminar flow environment using adequate surgical material. The bone tissue fragments were placed in individual containers containing 10% formalin and sent to the Laboratory of Histopathology, FMUSP, for subsequent analysis.

3. Results

3.1 Macroscopic aspect

Lymphatic involvement (hypertrophy) was observed in the limbs inoculated with the parasite. In addition, intensive necrosis with progressive edema was noted in the hind paws of the animals. Figs. 1 and 2 shows the clinical following at 90 and 120 days of evolution, respectively.

3.2 Histopathological aspect

All animals presented destruction of soft tissues and long bone necrosis characterized by pyknotic osteocytes and empty lacunae. The presence of intense parasitism inside macrophages was observed and a mononuclear cell infiltrate rich in plasma cells with predominance of eosinophils was noted adjacent to cortical bone and in the medullary canal. In addition, there was a discrete number of osteoclasts and osteoblasts containing flattened nucleus. These aspects are illustrated in Figs, 3, 4 and 5.

No limit of the invasive process was observed, i.e., whether bone tissue destruction started in the bone marrow propagating until cortical bone, or in the inverse direction. Fig. 6 characterizes this process. In some bone, fibrous tissue was detected at the distal end and in projections of trabecular bone at the proximal end. Formation of primary bone was noted in the periosteal region. Discrete cartilage involvement was observed in some animals, and secondary bacterial infection was present in adjacent soft tissues. This aspect is illustrated in Figs. 7 and 8.

4. Discussion

Analysis of the history of TL shows the need for understanding the alterations that occur in bone tissue and to exclude other diseases that attack bone. However, some theories have tried to explain the pathogenesis of TL, even though few studies on this subject using laboratory assays are available (Domingos Silva, 1958; Bittencourt et al., 1968, 1983; Saldanha et al., 1995).

Some investigations have reported the occurrence of bone lesions in dogs infected with *L (L) donovani* and have called attention to the natural development of manifestations of osteomyelitis associated with arthrosynovitis, suggesting that leishmaniasis should be included in the differential diagnosis of diseases that show signs of synovitis and radiographic findings of osteomyelitis in dogs from endemic areas (Turrel et al., 1982; Buracco et al., 1997).

In the present study, the characteristic manifestation of bone necrosis was observed in most animals, accompanied by the presence of sequestra and intense parasitism; in addition, cartilaginous tissue involvement was noted in some joints. Recently, in an experimental study Abreu et al. (2001), demonstrated the presence of *L (L) amazonensis* isolated from patients with the cutaneous form of TL, in various tissues such as central nervous system and bone of BALB/c and C57B/6 mice. Bone tissue involvement was detected 40 days after inoculation of the parasite into the paw, with histopathological aspects including pyknotic osteocytes, empty lacunae, and intense bone resorption in some animals, with the consequent formation of loose connective tissue. These findings were similar to those of the present study that showed massive bone tissue destruction and preservation of the articular surfaces, suggesting an inflammatory process induced by *L(L)*

amazonensis in the bone marrow and extramedullary tissue and demonstrated by the large number of parasitized cells, with secondary involvement of cartilaginous tissue.

Although various etiological agents of osteomyelitis are known, a better understanding of the physiopathology of its subacute and chronic forms is required because of the different factors that act on bone tissue such as uncommon microorganisms, associations between these agents, and changes in vascular supply (Kahn and Pritzer, 1973; Waldvogel & Vasey, 1980).

The etiological classifications of bone infection do not cite the parasite of TL as a causative agent of osteomyelitis. In addition, few studies regarding bone involvement in TL, especially in the DCL, are available in the literature, probably because a search for *Leishmania* is not carried out when identifying possible responsible agents even in endemic areas, where research is only directed at bacteria, fungi and viruses. In the present study, a direct relationship between *L(L) amazonensis* and bone infection was evident, characterizing a picture of chronic osteomyelitis caused by this parasite, particularly in DCL.

Acknowledgements

We thank the Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM 50), Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, for technical support. This study was supported by CNPq-Brazil.

References

- Abreu, A.L., 2003. Estudo da visceralização da *Leishmania (L.) amazonensis* no modelo murino (thesis). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- Barral, A., Petersen, A.A., Sacks, D.L., Neva, F.A., 1983. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 732-734.
- Bittencourt, A.L., Guimarães, N., 1968. Imunopatologia da leishmaniose tegumentar difusa. *Med Cut Ibero Lat Am* 2, 395-402.
- Bittencourt A, Guimarães N., 1983. Imunopatologia de leishmaniose tegumentar difusa. Aspectos anátomo patológicos. *Med Cut Ibero Lat Am* 11, 265- 270.
- Bryceson A.D.M., 1969. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 63, 708-737.
- Burraco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E., 1997. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani*. Infection in a dog. *J Small Animal Practice* 38: 29-30.
- Convit J, Lapenta P., 1946. Sobre un caso de leishmaniasis disseminada. *Rev Pat Clin* 17,153 – 158.
- Convit J., 1957. Leishmaniasis tegumentária difusa. Nueva entidad clinico patológica y parasitária. *Rev San Assist Soc* 23,1-2.
- Convit J, Pinardi M.E, Rondon A.J., 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 66, 609-610.
- Costa O.G., 1953. Dactylitis Leishmaniotica. *Arch Argentinos de derma* 3, 149-153.

Costa J.M.L, Saldanha A.C.R, Silva A.C.M, Serra-Neto A, Galvão C.E.S, Silva C.M.P., 1992.

Estado atual da leishmaniose cutânea difusa no estado do Maranhão: aspectos epidemiológicos, clínicos-evolutivos. Rev Soc Bras Med Trop 25, 115–123.

Druille P, Hagan P, Rook, G.A.W., 2002. The importance of models of infection in the study of disease resistance. Trends Microbiol. 10: S38-S46.

Goldenberg S., 2000. Aspectos éticos da pesquisa com animais. Acta Cir Bras 15(4), out./nov/dez.

Gonçalves da Costa S.C., 1999. Mouse model for Chagas disease. Does mouse represent a good model for Chagas disease? Mem Inst Oswaldo Cruz 94, 269-272.

Guimarães N, Silva Y.P., 1957. Lesões ósseas da Leishmaniose. Anais Bras Derm Sif 32, 5–7.

Kahn D.S, Pritzker K.P.H., 1973. The Pathophysiology of bone infection. Clin Orthop Related Research 96, 12-19.

Mader J.T, Ortiz M, Calhoun J.H., 1996. Update on the diagnosis and management of osteomyelitis. Clinic Pediatr Med Surg 13, 701-24.

Marrero C.M, Merino A.J, Rodrigo P.J, Bartolomé A.M, Camino F.A, Grande S.C 2001. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis. An Esp Pediatr 54, 181-184.

Müller S.S., 2003. Avaliação biomecânica de sutura tendinosa com três tipos de fios cirúrgicos: estudo experimental em cães. Rev Bras Ortop 38, 117-126.

Norden C.W., 1988. Lessons Learn from Animal models of Osteomyelitis. Review of infectious diseases 10, 103-110.

- Perez H, Arredondo B, Gonzalez M., 1978. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and Diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. *Infect Immun* 22, 301-307.
- Pessoa S.B, Barreto M.P., 1948. Leishmaniose tegumentar americana. Imprensa Nacional. RJ.
- Pimenta LG, Silva AL 2001. Ética e experimentação animal. *Acta Cir Bras* 16(4), out./ nov/ dez.
- Pritchard D.J., 1975. Granulomatous Infections of bones and joints. *Orthop Clin North Am* 6, 1029-1047.
- Pupo J.A., 1946. Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana.- (*Leishmania brasiliensis*- Vianna 1911). *Revista do Hospital das Clínicas*. 1, 113–163.
- Saldanha A.C, Malheiros T.S, Rodrigues C.C.R, Balby I.T.A, Costa J.M.L., 1995. Alterações ósseas observadas na leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 28, 55-56.
- Silva F., 1945. Forma raríssima de leishmaniose tegumentar. Leishmaniose dérmica não ulcerada em nódulos e extensa placas infiltradas e hiperpigmentadas. Separata do volume de Reunião Anual de Dermato-sifilografos brasileiros, Rio de janeiro, 97- 103.
- Turrel J.M, Pool R.R., 1982. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Radiol* 23: 243-249.
- Waldvogel F.A, Medoff G, Swartz M.N., 1970. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med* 282: 198-206, 260-266, 316-322.
- Waldvogel F.A, Vasey H., 1980. Osteomyelitis: The Past Decade. *N Engl J Med* 303,360-370.

Table 1

Sample distribution, mouse line used, animal's age, parasite strain and origin, and time of evolution

Animal	Age (months)	<i>Leishmania</i> species	Origin of the parasite (DCL patients) Clones/Monoclonal antibodies	Evolution after inoculation (Days)
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	IX2H7 E 10 B10	90
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	IX2H7 E 10 B10.	90
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	IX IF9D8	90
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	IX IF9D8	90
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	LX VII ID7B8	120
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	LX VII ID7B8	120
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	LX VIII 4 E 12 D8	120
BALB/c	2	<i>L. (L) amazonensis</i>	LX VIII 4 E 12 D8	120

Figure legends

Fig. 1. Clinical aspect of a lesion in a BALB/c mouse inoculated with *L.(L) amazonensis* showing histiocytomas in both paws 90 days after inoculation of the parasite.

Fig. 2. Aspect of a lesion in a BALB/c mouse inoculated with *L.(L) amazonensis* showing an increased histiocytoma 120 days after inoculation.

Fig. 3. Aspect of a bone lesion showing bone marrow alterations, destruction of trabeculae and an inflammatory infiltrate 120 days after inoculation of the parasite.

Fig. 4. Aspect of a bone lesion showing cortical bone destruction accompanied by invasion of an inflammatory infiltrate 90 days after inoculation.

Fig. 5. Sequestrum bone and parasitized macrophages 120 days after inoculation of the parasite.

Fig. 6. Bone lesion showing cortical destruction and invasion of an inflammatory process 120 days after inoculation.

b

Fig. 7. Aspect of bone marrow containing parasitized macrophages with a diffuse infiltrate and destruction of trabecular bone 90 days after inoculation of the parasite.

Fig. 8. Preserved joint, parasitized macrophages in bone marrow and an intra - and extramedullary inflammatory infiltrate 120 days after inoculation of the parasite.

Trabalho apresentado no WORLD-LEISH 2, 2001, Creta-
Grécia

P188 **DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS
(DCL):BONE CHANGES**

Costa A.A.U.M.L., Costa J.M.L., Ramos B., Corbett C.E.P.
Dep. Patologia Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, BRASIL. E-mail:
ccorbet@usp.br; ccorbett@usp.br

Bone changes have been rarely reported in leishmaniasis. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in Brazilian Amazon region may manifest as Anergic Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (ADCL). This form often shows injury of bone mainly in extremities. Three patients with ADCL and bone destructions were studied. X-Rays, bone scintigraphy and biopsy were performed. The lesions were characterized by multiple ulcerations, mainly in the distal part of feet and hands, where lytic focus of bone destruction surrounded by zone of sclerosis was detected. The X-Rays and particularly the bone scintigraphy showed signs of destruction in bone and periosteum. They were more severe in chirodactylus and pododactylus but were also present in bones of the legs and arms. Parasites isolated from these lesions were identified as *Leishmania (Leishmania) amazonensis* using specific monoclonal antibodies. The isolated parasite induced bone destruction in mice when inoculated in hind footpad. Severe infiltration by highly parasitized macrophages was seen invading bone and surrounded tissues. The bone marrow was also invaded by parasitized macrophages. Anergic Diffuse Cutaneous Leishmaniasis may cause severe destructive bone lesions.

Support LIM-50 HC-FMUSP, HU-UFMA