

HISTOPATOLOGIA DA FORMA LOCALIZADA DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*

Mário A. P. MORAES & Fernando T. SILVEIRA

RESUMO

São descritas as alterações microscópicas presentes na forma localizada (ulcerada) da Leishmaniose cutânea produzida por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Nesse tipo de manifestação, menos conhecido do que a forma anérgica ou difusa devida ao mesmo agente, as lesões são clinicamente idênticas às de leishmaniose cutânea causada por espécies outras de *Leishmania*, pertencentes ao subgênero *Viannia*. Na infecção localizada por *L. (L.) amazonensis*, entretanto, há um aspecto peculiar, só recentemente conhecido, ou seja, cerca de 50% dos indivíduos atingidos não reagem ao teste de Montenegro. A principal característica histológica observada foi a acumulação na derme, quase sempre focal, de numerosos macrófagos contendo no citoplasma um grande vacúolo cheio de amastigotas. O quadro é semelhante ao da forma difusa, porém sem o aspecto histiocitomatóide, próprio da última. Afora esses grupos de macrófagos, vêem-se também, na forma localizada, muitas células mononucleares da inflamação, principalmente plasmócitos e macrófagos não parasitados. Os acúmulos de macrófagos com amastigotas, quando volumosos, podem sofrer necrose na parte central; os parasitos, contidos nas células, são destruídos com elas ou liberados, e sua eliminação através da úlcera deve contribuir para a cura do processo. Esse tipo de necrose nunca foi descrito em casos da forma difusa. Não houve grande diferença, no quadro histológico, entre pacientes Montenegro-negativos e positivos. Apenas em alguns casos, do grupo Montenegro-positivo, havia granulomas formados por histiócitos epitelióides sem parasitos. Quanto à persistência das células com parasitos nas lesões, observou-se que aos seis meses ou mais de evolução, em ambos os grupos, ainda estavam elas presentes. Tal achado não é comum na leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis*.

UNITERMOS: *Leishmania. Leishmania mexicana amazonensis; Leishmania (Leishmania) amazonensis*; Leishmaniose cutânea localizada; Histopatologia da leishmaniose.

INTRODUÇÃO

Das três espécies principais de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar humana no Brasil - *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* -, apenas *L. (L.) amazonensis* tem sido encontrada em associação com a chamada forma anérgica ou difusa

da doença, um tipo de manifestação pouco freqüente e de cura difícil. A partir das primeiras observações sobre essa forma clínica, ficou mesmo a impressão de que *L. (L.) amazonensis*, por sua natureza, sempre determinaria o tipo difuso de infecção nos indivíduos afetados. Posteriormente, no entanto, foi ela também isolada de casos

Instituto Evandro Chagas - FNS/MS - Belém, Pará, Brasil

Endereço para correspondência: Fernando T. Silveira. Instituto Evandro Chagas, Av. Almirante Barroso, 492. Caixa Postal 1128. 66090-000 Belém, Pará, Brasil

da forma cutânea localizada (ulcerada), por LAINSON et al. ² e SILVEIRA et al. ⁵, o que veio indicar não ser tão escasso, como a princípio admitido, seu parasitismo no homem. Ainda assim, não é comum a infecção por *L. (L.) amazonensis*, fato relacionado por SILVEIRA et al. ⁵ aos hábitos do vetor - *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata*: além de zoófilo, tem ele atividade estritamente noturna. Outros fatores limitantes seriam o habitat dessa espécie - florestas úmidas e alagadas - e uma variação sazonal na quantidade de fêmeas, a qual restringe a uma parte do ano - durante a estação seca - a possibilidade de transmissão do agente.

Curiosamente, nos casos da forma cutânea localizada por *L. (L.) amazonensis*, cerca de 50% dos pacientes apresentaram-se negativos à intradermoreação de Montenegro.

LAINSON et al. ², em uma série de 26 pacientes, encontraram 15 (57,6%) negativos, afora 6 (23,1%), cuja resposta foi tida como duvidosa. SILVEIRA et al. ⁵, em 62 casos, diagnosticados de 1986 a 1990, constataram 30 (48,3%) negativos; no mesmo período, dentre 116 pessoas com infecção por outras espécies de *Leishmania*, observaram eles apenas 15 (13%) negativas à reação de Montenegro.

O resultado da intradermoreação parece não ter influência sobre a evolução da doença; todos os pacientes de SILVEIRA et al. ⁵, à exceção de um que não aceitou a medicação proposta, foram tratados com Glucantime, intravenosamente, e, embora alguns casos tivessem exigido de duas a três séries, todas as lesões acabaram por cicatrizar, não ocorrendo evolução para a forma difusa. Por outro lado, nenhum deles apresentou recidiva dentro do prazo de um ano após a cura da

doença. O paciente que recusou o tratamento, e não permitiu a biópsia, ao ser reexaminado, tinha também as lesões já cicatrizadas - segundo afirmou - espontaneamente. Sua resposta ao teste de Montenegro era positiva.

Devido a essas peculiaridades, procurou-se, no presente trabalho, estudar a histopatologia dos casos de infecção localizada por *L. (L.) amazonensis*; além de definir as principais características do quadro microscópico, tentou-se estabelecer as prováveis diferenças existentes entre este, o da forma difusa e o da infecção causada por *L. (V.) braziliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo compreendeu material de 33 casos da forma cutânea ulcerada, por *L. (L.) amazonensis*, sendo que 28 faziam parte da série de SILVEIRA et al. ⁵. Dos 33 pacientes, 25 pertenciam ao sexo masculino e 8, ao feminino. O tempo de evolução variou de um a dez meses, e quanto à intradermoreação de Montenegro, havia 17 (51,5%) negativos e 16 (48,5%) positivos. Para cada sexo, o número de positivos e de negativos foi aproximadamente igual. A idade se estendeu de 8 a 65 anos; nos indivíduos com menos de 20 anos predominou a resposta negativa ao teste de Montenegro (8/11) e nos maiores de 20, a resposta positiva (13/22), diferença, entretanto, não significativa. A maioria dos pacientes tinha somente uma úlcera; apenas um jovem de 17 anos apresentou sete lesões - e uma resposta ao teste de Montenegro de 13 mm, a mais forte encontrada.

Tal como acontece na forma difusa da doença, a resposta humoral, na forma localizada, não sofre maior alteração. Os títulos de anticorpos da classe IgG, usando-se testes de imunofluorescência, variaram de 1/80 a 1/640, em 11 indivíduos que foram assim testados.

Na caracterização da espécie do parasito, levou-se em conta: a) a morfologia dos amastigotas em esfregaços; b) o desenvolvimento dos microrganismos na pele de hamsters e em meio de cultura (água-sangue); c) a eletroforese de enzimas; e d) a reação a anticorpos monoclonais para promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

As biópsias, para fins de exame histológico, foram praticadas com "punch" de 6 mm, na margem das lesões, sob anestesia local, e os fragmentos obtidos, após fixa-

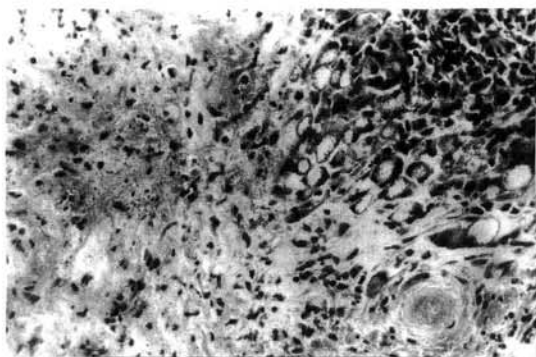


Fig. 1 - Os macrófagos do infiltrado, cheios de amastigotas, rompem-se e desaparecem junto à zona de necrose, à esquerda, na qual ainda se vêem restos dos parasitos. 400x.

ção em formalina tamponada, processados para inclusão em parafina. Os cortes, com espessura de 5 µm, receberam coloração por H&E e Giemsa.

RESULTADOS

O quadro histológico não diferiu muito de um caso para outro. A característica mais importante foi a presença, na derme, de macrófagos, em quantidade variável, contendo um único vacúolo - que parecia ocupar todo o citoplasma -, cheio de amastigotas. Células gigantes de tipo corpo estranho, com vacúolo idêntico, também podiam ser encontradas. Macrófagos e células gigantes assumiam, geralmente, uma disposição focal, em pequenos grupos ou em aglomerados importantes. Algumas vezes apareciam eles dispersos no seio de outros macrófagos, não parasitados, como que ainda em desenvolvimento.

Os macrófagos com parasitos eram indistinguíveis daqueles observados na forma difusa da doença, embora em menor número. Outras células da inflamação, como plasmócitos e linfócitos, presentes em abundância, apareciam misturadas aos macrófagos, muitas vezes envolvendo-os ou, então, formando coleções isoladas importantes. Tais células predominavam sobre os macrófagos, justamente o contrário do que acontece na forma difusa.

Macrófagos e amastigotas existiam em 28 dos 33 casos, sendo mais frequentes nos casos Montenegro-negativos (16/17) do que nos casos Montenegro-positivos (12/16). Como cada paciente, no entanto, foi submetido a uma biópsia simples, e a amostra tomada talvez não fosse representativa de toda a lesão, tal diferença, sem dúvida, é irrelevante. O único caso Montenegro-negativo, em que os parasitos não foram encontrados, era o de uma paciente com dez meses de evolução da doença, exibindo nos cortes sinais de fibrose da derme; sua úlcera, provavelmente, já se achava em regressão. Outros indivíduos Montenegro-negativos, no entanto, aos seis e sete meses de evolução, ainda estavam intencionalmente parasitados.

Nos casos Montenegro-positivos, a presença de amastigotas nos tecidos não guardou relação com o tempo de evolução e nem com a intensidade da resposta ao teste intradérmico. Nos quatro casos sem parasitos, o tempo de evolução variou de 2 a 9 meses, e a intensidade da resposta, de 17 a 13 mm. Entre os demais casos, porém, encontrava-se um paciente, com seis meses de

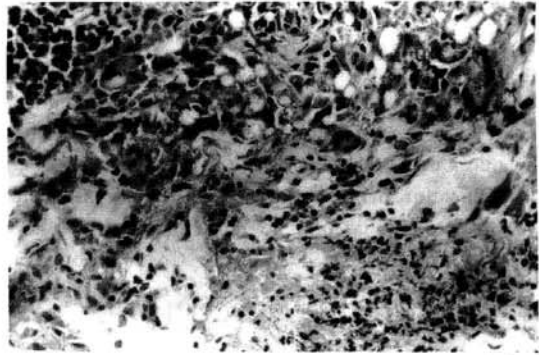


Fig. 2 - Infiltrado polimorfo na parte superior e área de necrose, infiltrada por leucócitos neutrófilos, na parte inferior. 400x.

evolução e uma resposta de 9 mm, que ainda possuía numerosos parasitos na lesão. Além disso, outros cuja resposta era de 10 a 11 mm ao teste também apresentavam nos cortes abundantes células parasitadas. Destaque-se aqui que o paciente com a resposta mais alta (13 mm) e sem parasitos nos tecidos, tinha sete lesões evoluindo há dois meses apenas. Destaque-se, também, que nos quatro casos sem parasitos, a reação tecidual consistiu em granulomas de histiócitos epitelióides, desprovidos de vacúolos.

Um aspecto interessante observado ainda nos cortes foi a necrose em massa, progressiva, das células parasitadas. A alteração estava presente em 18 dos 33 casos, tanto negativos (10 casos) como positivos (8 casos) ao teste de Montenegro. Nesse tipo de necrose, os macrófagos por ela atingidos, no centro dos acúmulos, primeiro se rompem e liberam os amastigotas dos vacúolos; depois, ambos se fundem em uma massa de aspecto irregular, cercada por macrófagos ainda íntegros, cheios de parasitos, os quais, mais tarde, serão também envolvidos pelo processo. A parte necrosada, que pode alcançar a epiderme, é posteriormente invadida por leucócitos neutrófilos; restos nucleares, sob a forma de grânulos negros, são nela encontrados. Por fim, a julgar-se pelo achado eventual de tecido conjuntivo jovem no seu interior, cercado por células gigantes primitivas, a área toda sofre absorção e cicatrização.

DISCUSSÃO

A forma circunscrita de infecção por *L. (L.) amazonensis* tem sido pouco estudada, certamente porque seu reconhecimento exige o emprego sistemático de vários procedimentos, indispensáveis à caracterização das espécies causadoras de leishmaniose tegu-

mentar. Além disso, a distribuição do agente é restrita; parece estar ligada à Amazônia, região em cujas matas encontra *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* - vetor da espécie - os criadouros apropriados. Nas comunidades de Três Braços e Corte de Pedra, importantes áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis*, no Estado da Bahia, e onde o vetor principal é *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, nenhuma infecção por *L. (L.) amazonensis* fora encontrada, até 1980 (J.M.L. Costa, informação pessoal), apesar do elevado número de casos registrados - 1.416 pessoas - na população local ¹.

O estudo da histopatologia, ora feito, mostrou que na forma localizada da infecção ocorre um quadro bem próximo daquele observado na forma difusa ou anérgica. Embora não característico, poderá ele servir de ajuda na distinção imediata entre as úlceras causadas por *L. (L.) amazonensis* e aquelas devidas a outras espécies. O achado de um quadro assim, em pacientes com lesões ulceradas, deve levantar logo a suspeita de o agente ser *L. (L.) amazonensis*.

A persistência dos macrófagos com amastigotas - principais componentes da reação tissular - deve ser assinalada. Quando o agente é *L. (V.) braziliensis*, células parasitadas são vistas, comumente, nas fases iniciais da doença; depois de algumas semanas, no entanto, os parasitos se tornam escassos, restando apenas um infiltrado denso, que ocupa toda a espessura da derme, rico em plasmócitos, linfócitos e macrófagos não parasitados. Algumas vezes é possível o achado, no seio desse infiltrado inespecífico, de grupos de histiócitos epitelióides, as clareiras de Montenegro. Já na infecção por *L. (L.) amazonensis*, os macrófagos com parasitos persistem por vários meses - seis ou mais - nas lesões, e o quadro, nesse ínterim, pouco se modifica.

A persistência dos macrófagos nos tecidos deve-se, provavelmente, a uma incapacidade dessas células para lidar com os amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, a qual se refletiria na intensidade da resposta ao teste de Montenegro pelos pacientes. Mesmo entre os Montenegro-positivos, mais da metade dos casos (9/17) poderia ser classificada como reatora fraca (pápula eritematosa com diâmetro inferior a 10 mm), havendo dois no limite da positividade (5 mm). Em dois outros pacientes, cuja resposta, ao contrário, foi francamente positiva (pápulas de 12 e 13 mm de diâmetro, respectivamente), afóra a ausência de parasitos nos cortes, a reação tecidual era constituída por histiócitos epitelióides, em formação granulomatosa. Os resultados do teste de

Montenegro sugerem que há inibição, pelo menos parcial, da imunidade celular, induzida por essa espécie de *Leishmania*.

É difícil entender-se o significado dos casos Montenegro-negativos, muito semelhantes, inclusive pela histopatologia, aos da forma difusa, a não ser pelo aspecto clínico observado nos pacientes - lesões ulceradas, às vezes não mais do que uma por indivíduo. A única diferença microscópica registrada foi a necrose maciça dos macrófagos parasitados, com eliminação de um número considerável de parasitos pela ulceração formada. Essa necrose não corresponde, pelo aspecto, às alterações descritas por MAGALHÃES et al. ³ na leishmaniose humana por *L. (V.) braziliensis*, ficando mais próxima daquela observada por MONROY et al. ⁴ na infecção de cobaias por *L. enriettii*. Microscopicamente, na infecção experimental, descreveram MONROY et al. ⁴ uma necrose maciça de macrófagos, densamente parasitados, na área central das lesões; a maioria dos parasitos, mortos ou não durante o processo necrotizante, era eliminada pela úlcera, junto com células mortas e restos nucleares. A necrose ocorria justamente quando o nível de anticorpos no soro dos animais estava se aproximando do pico, para declinar logo depois. Embora o processo fosse, sem dúvida, de origem imunitária, relacionado com a imunidade humoral, a cura das lesões, segundo os autores, tinha lugar somente quando os macrófagos mostravam já sinais de ativação, o que acontecia após a carga parasitária ter sido reduzida, substancialmente, através da necrose. O teste cutâneo mostrava-se sempre positivo nas cobaias inoculadas, e as lesões começavam a desaparecer, espontaneamente, a partir da décima semana da infecção.

Ainda que a necrose dos macrófagos esteja ligada à imunidade humoral, sua ausência na forma difusa humana, forma em que há grave inibição específica da imunidade celular, mas não da humoral, indica que o desencadeamento do processo necrótico, pelo menos em sua fase mais inicial, depende da ativação, mesmo fraca, dos macrófagos.

SUMMARY

Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

The microscopic changes found in the localized form of the human cutaneous leishmaniasis due to

Leishmania (Leishmania) amazonensis are reported. In this form, less known than the diffuse one caused by the same species, the clinical manifestations are identical to those produced by other *Leishmania* species of the subgenus *Viannia*. There is, however, in the localized infection by *L. (L.) amazonensis*, a peculiar feature, only recently discovered: about 50% of the affected individuals are Montenegro-negatives. The main histologic change observed in the skin sections was the presence of groups of macrophages with a large vacuole in the cytoplasm, containing many amastigotes. The microscopic picture is similar to that found in the diffuse form of the disease, the difference being only quantitative. When in large numbers, the macrophages suffers necrosis, which generally starts at the center of the groups. First, in this process, the membrane of the parasitized cells ruptures, and the amastigotes become free; later, both cells and parasites are destroyed. The picture can be seen either in Montenegro-negative or in Montenegro-positive patients. The macrophages with amastigotes may persist in tissues for as long as 6-7 months, while in the infections due to *L. (V.) braziliensis* the parasites usually disappear in a few weeks.

REFERENCES

1. COSTA, J.M.L.; VALE, K.C.; FRANÇA, F. et al. - Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania Viannia braziliensis* em lesões cutâneas. Rev. Soc. bras. Med. trop. 23: 205-208, 1990.
2. LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T. et al. - A *Leishmania* e as leishmanioses. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS; 50 ANOS DE CONTRIBUIÇÃO ÀS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E À MEDICINA TROPICAL. Belém. Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v. 1, p. 83-124.
3. MAGALHÃES, A.V.; MORAES, M.A.P.; RAICK, A.N. et al. - Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. I. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 28: 253-262, 1986.
4. MONROY, A.; RIDLEY, D.S.; HEATHER, C.J. & RIDLEY, M.J. - Histological studies of the elimination of *Leishmania enriettii* from skin lesions in the guinea-pig. Brit. J. exp. Path., 61: 601-610, 1980.
5. SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. et al. - Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 85: 735-738, 1991.

Recebido para publicação em 03/12/1993.

Aceito para publicação em 15/04/1994.