

SOBRE A SENSIBILIDADE DA CULTURA DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES NA DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Fernando T. Silveira, Ralph Lainson, Jeffrey J. Shaw, Edna A. Ishikawa, Adelson A.A. Souza e Roseli R. Braga.

Foi investigada a presença de Leishmania, através da cultura de leucócitos circulantes, no sangue periférico de 60 pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, nas suas diferentes formas clínicas, assim como nas principais fases evolutivas da doença. Biópsias de lesões cutâneas e/ou de mucosa desses pacientes foram obtidas com a finalidade de isolar e caracterizar os parasitas, através da técnica de anticorpos monoclonais. Dos 60 pacientes examinados, foram isoladas 40 amostras de Leishmania das lesões biopsiadas, sendo 5 de Leishmania (V.) brasiliensis, 3 de L. (V.) guyanensis, 1 de L. (V.) lainsoni, 13 de L. (L.) amazonensis e 18 não puderam ser caracterizados a nível específico, porém, reagiram com anticorpos monoclonais do grupo braziliensis. Quanto à pesquisa através das culturas de leucócitos circulantes, esta revelou resultados completamente negativos. Com base nesses achados, os autores concluíram ser pouco consistente atribuir valor à cultura de leucócitos para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chaves: Leishmaniose tegumentar. Cultura de leucócitos circulantes. Detecção de *Leishmania*.

A ocorrência de lesões metastáticas observadas na leishmaniose tegumentar americana, quer seja na forma cutânea disseminada, cutâneo-mucosa ou cutânea difusa da doença, faz supor, fortemente, que as vias sangüínea e/ou linfática desempenham importante papel na propagação de lesões à distância do foco primário da infecção. Por esse motivo, a pesquisa de *Leishmania* no sangue periférico de pacientes com leishmaniose tegumentar tem sido alvo de interesse, não só com o intuito de confirmar esta hipótese, mas, também, de investigar o valor da cultura de leucócitos circulantes no diagnóstico da doença. Entretanto, os dados disponíveis na literatura são escassos e, na maioria das vezes, o número de pacientes examinados não parece ser suficiente para obtermos um conhecimento mais apurado sobre o assunto. Assim é que, de forma bastante inusitada, Bowdre e cols¹ conseguiram o isolamento de *Leishmania* sp. de um concentrado de leucócitos do sangue periférico de um único

paciente examinado, o qual apresentava lesões cutâneas múltiplas e comprometimento da mucosa nasal.

De modo semelhante, Ramos e cols⁴ relataram o isolamento de *Leishmania* sp. de células mononucleares do sangue circulante de quatro pacientes submetidos ao exame, sendo três da forma cutânea localizada e um da forma cutâneo-mucosa. Em contrapartida, Llanos-Cuentas e cols³ não tiveram o mesmo sucesso em isolar *Leishmania* do sangue periférico de dois pacientes portadores de lesões cutâneas múltiplas, além de invasão da mucosa naso-buco-faríngea. Por último, Cuba-Cuba e cols² também não lograram êxito no isolamento de *Leishmania* do sangue periférico de 21 pacientes da forma cutânea localizada, oriundos da região de Três Braços, Estado da Bahia, Brasil, zona esta de alta endemicidade para transmissão de *Leishmania braziliensis*.

Diante dos fatos que acima foram mencionados e, ainda, levando-se em conta que na Região Amazônica brasileira a leishmaniose tegumentar apresenta um largo espectro lesional, decidimos investigar a presença de *Leishmania* através da cultura de leucócitos do sangue periférico de 60 pacientes, cujas manifestações clínicas permitiram classificá-los dentro das formas cutânea localizada, cutânea disseminada, cutâneo-mucosa e cutânea difusa.

Instituto Evandro Chagas (Fundação SESP). Av. Almirante Barroso 492 - CP. 1128, 66050 Belém - Pará - Brasil.

Trabalho realizado com apoio da Fundação Serviços de Saúde Pública, MS, Brasil e Wellcome Trust, Londres.

Recebido para publicação em 9/3/89

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram examinados 60 pacientes, sendo 47 da forma cutânea localizada, 4 da forma cutânea disseminada, 5 da forma cutâneo-mucosa e 4 da forma cutânea difusa. Quanto ao número de lesões e o tempo de doença dos pacientes, estes podem ser vistos na Tabela 1.

caracterização específica desses parasitas: a) dentre as 32 amostras dos casos da forma cutânea localizada, 4 corresponderam a *Leishmania (V.) braziliensis*, 2 a *L. (V.) guyanensis*, 1 a *L. (V.) lainsoni*, 9 a *L. (L.) amazonensis* e 16 amostras não foram caracterizadas até o nível de espécie, porém, mostraram reatividade para anticorpos monoclonais do grupo *braziliensis*; b) das quatro amostras de pacientes da forma cutânea

Tabela 1 - Pesquisa de *Leishmania* no sangue periférico de 60 pacientes portadores de leishmaniose tegumentar.

	Formas clínicas observadas			
	C. localizada	C. disseminada	Cutâneo-mucosa	C. difusa
Nº de lesões	1-4	7-16	1	*
Tempo de doença	1 mês-18 anos	1-5 meses	1-3 anos	2-14 anos
Total de pacientes	47	4	5	4

* Não foi referida, por tratar-se de pacientes com lesões de natureza variada (nódulos, tubérculos, placas infiltradas, etc...) e amplamente distribuídas no tegumento.

Objetivando a pesquisa de *Leishmania* através da cultura de leucócitos circulantes, 10 ml de sangue venoso heparinizado foram coletados de cada paciente, em seguida centrifugados durante 15 minutos (3.000 rpm) e o creme leucocitário semeado com pipeta Pasteur em quatro tubos de meio Difco ágar-sangue (Walton e cols⁶), rotineiramente usado em nosso laboratório para manutenção de amostras-padrão de 14 espécies de *Leishmania*. Posteriormente, as culturas eram mantidas à temperatura de 23°C, e examinadas, semanalmente, durante quatro semanas. Além disso, foram tomadas biópsias de lesões cutâneas e/ou mucosas, com a finalidade de isolamento do parasita em hamster e em meio de cultura (Difco ágar-sangue), o que serviu para a caracterização dos parasitas através da técnica de anticorpos monoclonais, de acordo com Shaw e cols⁵.

RESULTADOS

A partir de biópsias tomadas de lesões cutâneas e/ou mucosas dos 60 pacientes examinados, foram isoladas 40 amostras de *Leishmania* (66% dos casos), sendo 32 provenientes de pacientes da forma cutânea localizada (68% de 47 casos), 4 de pacientes da forma cutânea disseminada (100% dos casos) e 4 de pacientes da forma cutânea difusa (também 100% dos casos). Nenhum isolamento foi obtido de qualquer dos 5 casos de forma cutâneo-mucosa.

Empregando-se a técnica de anticorpos monoclonais, chegou-se aos seguintes resultados, quanto à

disseminada, uma correspondeu a *L. (V.) braziliensis*, um a *L. (V.) guyanensis* e duas não chegaram a ser caracterizadas a nível específico, contudo, também reagiram contra anticorpos monoclonais do grupo *braziliensis*, e c) as quatro amostras dos casos da forma cutânea difusa foram caracterizadas com *L. (L.) amazonensis*.

Quanto à pesquisa de *Leishmania* através da cultura de leucócitos circulantes, esta revelou-se absolutamente negativa, isto é, não obtivemos cultivo de *Leishmania* dentre os 60 pacientes examinados.

DISCUSSÃO

De acordo com o que foi dito antes, uma das características de maior interesse acerca da leishmaniose tegumentar na Região Amazônica se refere aos diferentes tipos lesionais observados nos pacientes com a doença, fato este que, sem dúvida, mantém estreita relação, não só com a condição imunogenética do indivíduo infectado, mas, também, com o caráter específico dos diferentes parasitas envolvidos com a doença na referida região. Dessa forma, se por um lado, não fomos capazes de isolar *Leishmania* do sangue periférico de pacientes portadores da doença, por outro, estes resultados assumem caráter da maior importância, uma vez que o contingente de pacientes examinados era formado por um largo espectro clínico-lesional, associado às diferentes espécies de *Leishmania* localmente existentes. Além disto, cabe salientar, ainda, o fato de que foram examinados pacientes nos três estágios evolutivos da doença,

compreendendo as fases aguda, intermediária e crônica da infecção. A este respeito, Llanos-Cuentas e cols³ e Cuba-Cuba e cols² sugerem que, em se tratando de infecções causadas por *Leishmania (V.) braziliensis*, a disseminação dos parasitas via corrente sanguínea pode ocorrer durante as primeiras semanas da infecção (fase aguda), ocasionando lesões metastáticas nas mucosas em poucos meses de doença, ou de outro modo, tais lesões aparecem em fase tardia da doença (fase crônica), após um ou mais anos. Entretanto, conforme atestam nossos resultados, foram isoladas não só amostras de *L. (V.) braziliensis*, como, também, de *L. (V.) guyanensis*, provenientes de lesões dérmicas de pacientes com história de um mês ou mais de doença, sem que, no entanto, tivéssemos o mesmo sucesso no isolamento desses parasitas, quando tentamos o cultivo de leucócitos circulantes dos mesmos pacientes.

Por outro lado, com base em nossa experiência no acompanhamento de alguns casos de leishmaniose cutânea determinados por *Leishmania (L.) amazonensis*, podemos dizer que as infecções por esta espécie guardam certa semelhança com relação ao que foi dito sobre a *Leishmania (V.) braziliensis*, uma vez que em algumas circunstâncias a *L. (L.) amazonensis* também provoca lesões de metástases em pouco tempo (8 a 10 meses) em decorrência da infecção localizada, assim como, em outras, as lesões aparecem de forma insidiosa, levando mais de um ano para o seu surgimento. Nesse sentido, achamos importante enfatizar, também, que, dentre os pacientes com leishmaniose cutânea localizada, nove apresentavam infecção por *L. (L.) amazonensis*, cujos tempos de evolução da doença, 1 a 6 meses, poderiam suscitar a presença de parasitas circulantes no sangue, o que, mais uma vez, não foi demonstrado nesses pacientes.

Outro aspecto a ser considerado se relaciona à resposta imune do hospedeiro infectado, uma vez que tem sido cogitada a idéia de que a disseminação de parasitas através da corrente sanguínea seria um evento transitório, modulado pela resposta imunológica "normal" do indivíduo (Llanos-Cuentas e cols³). Nesse caso, a pesquisa em pacientes com deficiência imunológica no setor celular e com grande número de parasitas na derme, como é o caso de pacientes com leishmaniose difusa, poderia ser considerada tarefa mais fácil. Porém, o cultivo de leucócitos de quatro pacientes, dois deles em fase de franca progressão da doença, também resultou negativo em duas tentativas realizadas.

Em conclusão, levando-se em conta os aspectos discutidos acima, julgamos inconsistente atribuir grande valor à cultura de leucócitos para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, conforme sugerem Bowdre e cols¹ e Ramos e cols⁴. No primeiro caso, os autores relataram um achado absolutamente fortuito, resultan-

te do exame de apenas um paciente. No segundo, embora os autores afirmem o isolamento de *Leishmania* do sangue periférico de quatro pacientes examinados, a caracterização dos parasitas fundamentou-se em material obtido de biópsias de lesão de pele, e não do cultivo de células sanguíneas, fato este que permite questionar não só a viabilidade, como, também, a identidade dos parasitas obtidos da cultura de leucócitos. Por último, acreditamos ser oportuno lembrar, ainda, que, à luz dos resultados por nós observados, parece-nos muito pouco provável a hipótese de que o sangue humano ingerido por flebotomíneos possa assumir papel de importância na epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana, segundo sugerem, também, Ramos e cols⁴.

SUMMARY

The possible presence of Leishmania in the peripheral blood of 60 patients with American cutaneous leishmaniasis was investigated by the culture of circulating leucocytes. Patients were selected with a variety of clinical forms of the disease and in different evolutionary stages of infection. Biopsies of skin and/or mucosal lesions were made in order to isolate the parasites, which were identified using monoclonal antibodies. 40 isolations were obtained, including 5 of Leishmania (Viannia) braziliensis, 3 L. (V.) guyanensis, 1 L. (V.) lainsoni, 13 L. (Leishmania) amazonensis and 18 which could only be identified as parasites of the braziliensis complex. Cultures of circulating leucocytes were consistently negative, and the authors conclude that this method is of little use in diagnosis of cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis.

Key-words: Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Culture of circulating leucocytes. Detection of *Leishmania*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bowdre JH, Campbell JL, Walker DH, Tart DE. American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes. *American Journal of Clinical Pathology* 75: 435-438, 1981.
2. Cuba-Cuba CA, Llanos-Cuentas EA, Marsden PD. Failure to detect circulating *Leishmania* in mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 346, 1986.
3. Llanos-Cuentas EA, Arana M, Cuba-Cuba CA, Rosa AC, Marsden PD. Leishmaniasis cutanea disseminada associada a metastasis en mucosas, causada por *Leish-*

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ishikawa EA, Souza AAA, Braga RR. Sobre a sensibilidade da cultura de leucócitos circulantes na detecção de leishmania no sangue periférico de pacientes com leishmaniose tegumentar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 22: 143-146, Jul-Set, 1989

- mania braziliensis braziliensis*: Fracaso en el hallazgo de parasitos circulantes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18: 271-272, 1985.
4. Ramos RT, Grimaldi G Jr, Oliveira Neto MP. Isolation of *Leishmania* from peripheral blood cells in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Brazil. In: Resumos da IX Reunião Anual Sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas/Caxambú, MG, Brasil, R-186, 1982.
 5. Shaw, JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David Jr. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 69-72, 1987.
 6. Walton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Parasitology* 63: 1118-1119, 1977.