

# LEISHMANIOSE CUTÂNEA. DIAGNÓSTICO ULTRASTRUTURAL

J. F. MOURA NUNES, J. L. ALMEIDA RICARDO

Laboratório de Virologia e Serviço de Anatomia Patológica. Instituto Português de Oncologia *Francisco Gentil*. Palhavã. Lisboa.

## RESUMO

Os AA, usando microscopia electrónica de transmissão, descrevem a presença de Leishmanias em células histiocitárias de um granuloma de natureza não esclarecida pela observação histopatológica. O material observado foi fixado em formalina a 10% não tamponada, sendo no entanto a preservação subcelular suficiente para a identificação dos protozoários.

## SUMMARY

**Cutaneous leishmaniasis. Ultrastructural diagnosis.**

Using transmission electron microscopy, the Authors describe the presence of Leishmania in histiocytic cells of a granuloma of unknown etiology. The material observed has been fixed in non-buffered 10% formalin, the quality of subcellular preservation allowing the morphological identification of the protozoa.

## INTRODUÇÃO

Tem-se assistido, nos últimos anos, a uma crescente aceitação e aplicação dos estudos ultrastruturais em muitos campos da biomedicina, tirando-se partido da elevada resolução do microscópio electrónico que assim tem entrado na rotina de diagnóstico em numerosos Centros, sobretudo a partir do momento em que se tornou claro que em muitos casos a perfeita preservação celular, indispensável na investigação morfológica de carácter básico, pode ser, no domínio das aplicações diagnósticas, em boa parte dispensada. De facto está hoje bem estabelecido que a observação de material fixado, incluído e mesmo seccionado para observações de rotina anátomo-patológica pode, em muitos casos, dar um contributo definitivo no estabelecimento de um diagnóstico.<sup>1, 2</sup>

Certas doenças parasitárias podem ser diagnosticadas com facilidade em locais em que a sua presença é habitual ou provável. Pelo contrário podem ser de difícil diagnóstico quando aparecem em zonas onde são desconhecidas ou pouco frequentes. Neste trabalho descreve-se um caso de Leishmaniose cutânea de localização atípica numa doente que habita uma área onde a doença era, à data da observação — 1977 — pouco conhecida, e em que foi possível obter um diagnóstico definitivo através da observação de material bióptico fixado para exame anátomo - patológico de rotina.

## CASO CLÍNICO

C.M.P.M., 15 anos, sexo feminino, estudante, residente em Castelo Branco. Enviada ao IPOFG biópsia de nódulo duro subcutâneo da face anterior do antebraço, aparentemente recidiva de nódulo idêntico ressecado 10 meses antes do mesmo local. Na anamnese refere-se não haver razões para encarar a lesão como sendo de natureza infecciosa.

## MÉTODOS

Para as observações anátomo-patológicas de rotina o material foi fixado em formalina a 10% não tamponada, incluído em parafina, e os cortes de 5 µm corados pela hematoxilina-eosina.

Para as observações ultrastruturais foi utilizado parte do material que não foi incluído em parafina e que foi mantido como *reserva* no fixador durante cerca de 20 dias, à temperatura ambiente. Colheu-se um fragmento dos tecidos subcutâneos, que foi seccionado em blocos de volume inferior a 1 mm<sup>3</sup>, mantidos durante 24 horas (3 passagens) em tampão de cacodilato de sódio-HCl, 0,1 M, pH 7,3. Estes blocos foram depois post-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, desidratados pelo etanol e incluído em Epon 812 pelas técnicas habituais. Destes blocos fizeram-se cortes de 1 µm que foram corados pelo azul de toluidina

alcalino. Fizeram-se depois cortes finos das áreas seleccionadas a partir dos cortes de  $1\ \mu\text{m}$ , que foram contrastados pelo acetato de uranilo aquoso saturado e pelo citrato de chumbo. As observações foram feitas no microscópio electrónico Philips EM 300 da Unidade de Microscopia Electrónica da Faculdade de Medicina de Lisboa.

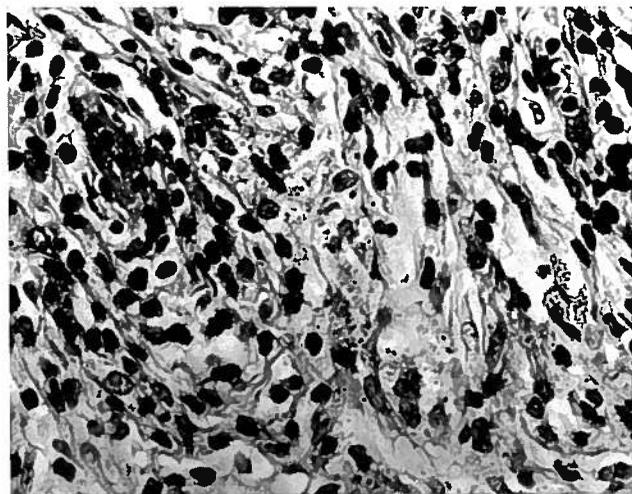


Figura 1: Granuloma de células linfo-histiocitárias. No citoplasma das células histiocitárias observam-se inclusões não identificadas. H & E.  $\times 500$ .

## RESULTADOS

### Microscopia óptica

1. Material incluído em parafina, cortes corados pela hematoxilina-eosina: o exame microscópico (IPOFG, obs 8660 de 1977) mostrou tratar-se de um fragmento de pele em cuja derme superficial e profunda havia nódulos de células histiocitárias, tendo à periferia pequenos ninhos de linfócitos, que chegam até junto da epiderme. As células histiocitárias tinham, no citoplasma, inclusões ovais de pequenas dimensões, que não foram identificadas à data da primeira observação. O diagnóstico foi de granuloma infeccioso ou parasitário. Observações posteriores mostraram a existência de áreas da lesão muito ricas nestas inclusões (Figs. 1 e 2).

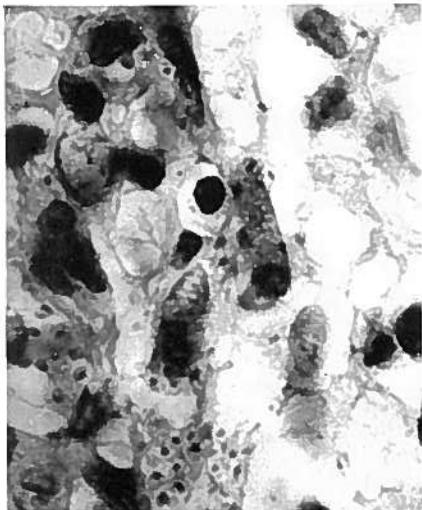


Figura 2: Maior ampliação de um grupo de células histiocitárias contendo inclusões. H & E.  $\times 1275$ .

2. Material incluído em Epon 812, cortes de  $1\ \mu\text{m}$ , corados pelo azul de toluidina alcalino: observaram-se dois tipos celulares, o primeiro constituído por células de núcleos claros e alongados, e o segundo tipo por células com núcleos mais escuros, arredondados e com citoplasma pouco abundante. Nas células de núcleo mais claro e alongado observaram-se, no citoplasma, inclusões circulares com um limite exterior muito fino e com conteúdo claro contendo uma granulação, geralmente excêntrica, muito corada.

### Microscopia electrónica

O material estava mal preservado segundo os critérios habituais da microscopia electrónica; foi no entanto possível identificar estruturas celulares e as suas interrelações, sendo nítida a existência de dois tipos celulares principais, equivalentes aos observados nos cortes de  $1\ \mu\text{m}$  (Fig. 3).

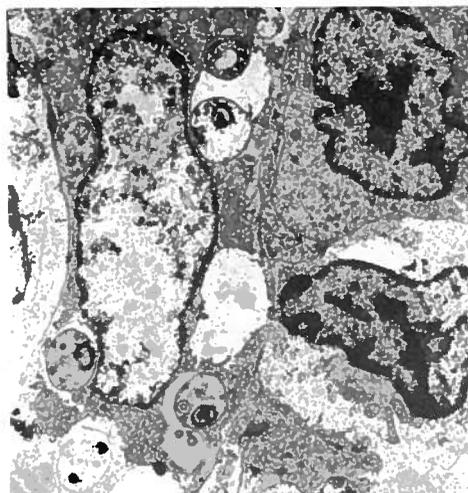


Figura 3: Células linfoides (L) e célula histiocitária (H) com inclusões citoplasmáticas (i).  $\times 3500$ .

No citoplasma das células que apresentavam núcleos alongados e de média densidade aos electrões encontraram-se numerosas estruturas arredondadas ou ovaladas, com diâmetro da ordem dos  $1,5$  a  $2\ \mu\text{m}$ , isoladas ou mais frequentemente em grupos de até 4 ou 5 elementos, ocupando vacúolos citoplasmáticos limitados por uma membrana (Fig. 4).

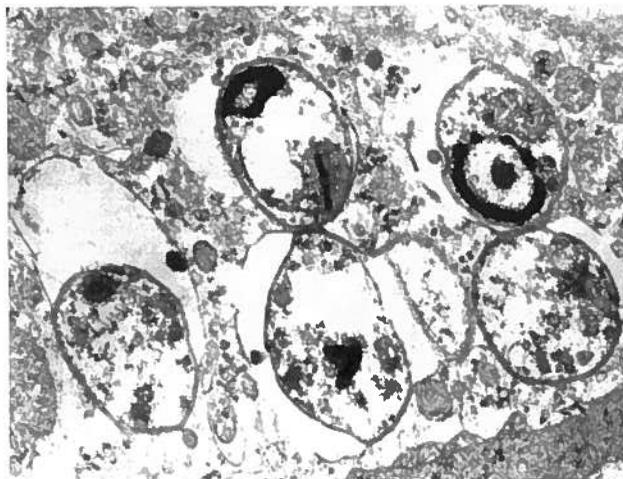


Figura 4: Grupo de inclusões citoplasmáticas.  $\times 15\ 500$ .

O limite exterior destas inclusões era constituído por uma estrutura trilaminar revestida interiormente por uma camada, descontínua, de elementos microtubulares que apareciam consoante a incidência do corte, como círculos ou linhas paralelas (Figs. 5, 6 e 7). No interior das inclusões encontrava-se uma estrutura muito densa, em forma de anel, por vezes aberta, muitas vezes com um centro de densidade aos electrões também muito elevada.

Duas outras estruturas consistentemente encontradas foram flagelos seccionados em diferentes incidências (Figs. 5 e 7) e ainda formações alongadas de média densidade aos electrões com uma área fibrilar muito densa alinhada pelo seu eixo maior (Figs. 5 e 6). Estas estruturas estavam associadas aos flagelos e dispostas perpendicularmente às suas bases.

Estes elementos morfológicos são característicos de protozoários do género *Leishmania*.

## DISCUSSÃO

Tem sido crescente o auxílio da microscopia electrónica no diagnóstico clínico. Está hoje bem estabelecido o interesse desta técnica morfológica na caracterização de quadros patológicos em nefrologia, no estudo de doenças metabólicas, no diagnóstico histogenético de alguns tumores, e ainda em certas doenças a vírus.<sup>2,4</sup>

O poder de resolução do microscópio electrónico, na prática da ordem dos 0,5 a 1,0 nm, é muito superior ao do microscópio óptico (cerca de 250 nm), o que, associado a outros aspectos das técnicas preparativas, permite a identificação de estruturas características, sugestivas ou patognomónicas de diferentes tipos celulares ou agentes patogénicos microbianos.

São bem conhecidas as condições críticas em que se deve proceder à fixação dos tecidos nos estudos ultraestruturais.<sup>5</sup> Tem no entanto vindo a ser reconhecido que é possível identificar certas estruturas subcelulares em material processado pelas técnicas de rotina da histopatologia.<sup>2, 6, 7</sup>

No caso que se apresenta, apesar de se ter utilizado material fixado em formalina não tamponada durante cerca de 20 dias, foi possível encontrar preservadas muitas das estruturas características dos tecidos observados. Não foi assim difícil reconhecer células de natureza histiocitária nas células alongadas e de núcleo alongado e claro, e de natureza linfóide nas células de núcleo mais pequeno, arredondado e denso.

As inclusões intracitoplasmáticas descritas apresentam aspectos morfológicos que permitem a sua identificação como protozoários do género *Leishmania*: a forma ovalada das secções do parasita, com diâmetro próximo dos 2  $\mu\text{m}$ , a existência de um flagelo que tem a sua origem na vizinhança do complexo quinetoplasto-mitochondria, bem como a distribuição da rede microtubular situada internamente em relação à membrana plasmática.<sup>8-10</sup> A existência destes protozoários na lesão confirma a sugestão inicial de se tratar de um granuloma parasitário e permite um diagnóstico de leishmaniose cutânea.

O diagnóstico de leishmaniose cutânea é geralmente baseado nos dados clínicos e histológicos. No entanto para um diagnóstico definitivo considerava-se necessário isolar o agente, usando técnicas de cultura em meios apropriados, ou proceder à sua identificação nos cortes histológicos.<sup>11, 12</sup>

No caso que apresentamos a localização da lesão era atípica, no antebraço e não na face como é habitual.<sup>13-16</sup> O material foi enviado a este Instituto já fixado em formol, pelo que, mesmo que se suspeitasse da natureza da lesão, era impossível proceder a um exame cultural.



Figuras 5 a 7: Maior ampliação de algumas inclusões. Núcleos (N), flagelos (F), quinetoplastos (h) e estruturas microtubulares (setas).  $\times 22\ 000$ ,  $30\ 500$  e  $26\ 500$ .

Por outro lado, à data das observações (1977) apenas havia indícios de 2 casos de leishmaniose cutânea em residentes na área de Castelo Branco.<sup>13, 16</sup> Só posteriormente a 1977 foram descritos casos de leishmaniose cutânea nesta área do País.<sup>14</sup>

As observações anátomo-patológicas inicialmente efectuadas mostraram a presença de inclusões intracelulares pouco abundantes cujas características, analisadas por microscopia óptica, não permitiram, na altura, a sua identificação, pelo que se decidiu recorrer às observações ultra-estruturais. Uma análise mais detalhada da peça anátomo-patológica demonstrou, posteriormente, a existência de áreas do tecido em que as Leishmanias eram muito abundantes, como é visível nas Figs. 1 e 2.

Este caso mostra como a microscopia electrónica pode auxiliar e complementar, em alguns casos, o diagnóstico histológico, mesmo recorrendo a material em condições de preservação muito diferentes das consideradas indispensáveis em outros estudos estruturais. Esta possibilidade deve estar sempre presente quando se encaram situações em que a caracterização de estruturas de dimensões menores que o poder de resolução do microscópio óptico surge como necessária.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BURNS, W. A.; HAMMOND, J.; HOWATSON, A.; HATZ, A.; WHITE, J.: The clinician's view of diagnostic electron microscopy. *Human Pathol.* 1975; 6: 467-478.
2. JOHANNESSEN, J. V.: Use of paraffin material for electron microscopy. In SOMMERS SC, ROSEN PP, eds. *Pathology Annual*, vol. 12, part 2: London: *Appleton Century Crofts* 1977; 189-224.
3. HSIUNG, G-D.; FONG, C. K. Y.; AUGUST, M. J.: The use of electron microscopy for diagnosis of virus infections: an overview. *Progr. Med. Virol.* 1979; 25: 133-159.
4. GYORKEY, F.; MIN K-W.; KRISKO, I.; GYORKEY, P.: The usefulness of electron microscopy in the diagnosis of human tumors. *Human Pathol.*, 1975; 6: 421-441.
5. SJOSTRAND, F. S.: *Electron Microscopy of Cells and Tissues*. New York: *Academic Press* 1967.
6. BURNS, J.: Preparation of thin epoxy resin sections from thick sections of paraffin-embedded material. *J. Clin. Pathol.*, 1970; 23: 643-645.
7. ROSSI, G. L.; LUGINBUHL, A.; PROBST, D.: A method for ultrastructural study of lesions found in conventional histological sections. *Virchows Arch. Abt. A Pathol. Anat.*, 1970; 350: 216-224.
8. BOURLOND-REINERT, L.; NICOLAY, M.: Leishmaniose cutanée: étude ultrastructurale. *Dermatologica*, 1975; 151: 113-124.
9. JOHANNESSEN, J. V.; FINSETH, I.; KROGE, H-K.; TRAEELAND, H.: Cutaneous leishmaniosis. Philips Case Histories in Human Medicine, n.º 5, p. 1-5. Eindhoven: Philips, 1975.
10. TUAN, P. D.; AZAR, H. A.; MOSCOVIC, E. A.: The ultrastructure of *Leishmania tropica* in the oriental shore. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1970; 64: 1.
11. FARAH, F. S.; MALAK, J. A.: Cutaneous leishmaniasis. *Arch. Dermatol.*, 1971; 103: 467-474.
12. KURBAN, A. K.; MALAK, J. A.; FARAH, F. S.; CHAGLASSIAN, H. T.: Histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Arch. Dermatol.*, 1966; 91: 396-401.
13. NORONHA, T.: Clinical features of autochthonous cutaneous leishmaniasis in Portugal. An autochthonous case of malignant cutaneous leishmaniasis. *Arq. Patol.*, 1968; 40: 127-138.
14. CAPITÃO-MOR, M. M.; SILVA, L. G.: Leishmaniose cutânea. *Trab. Soc. Port. Dermatol. Venereol.*, 1979; 38: 189.
15. OLIVEIRA, A.; VERDE, S. F.; CAPITÃO-MOR, M. M.; SILVA, L. G.; PICOTO, A.; MARTINS, O.: Leishmaniose cutânea. *Trab. Soc. Port. Dermatol. Venereol.*, 1979; 38: 189.
16. CALDEIRA, J. B.; NOBRE, G.; LACERDA, M. H.; SILVA, L. G.: Leishmaniose cutânea (Botão do Oriente). *Trab. Soc. Port. Dermatol. Venereol.*, 1969; 27: 177.

Pedido de separatas: J. F. Moura Nunes  
 Lab. de Virologia  
 Inst. Port. Oncologia  
 1093 Lisboa Codex  
 Portugal