Naiura Vieira Pereira

**Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual
das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar
americana**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientadora: Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Naiura Vieira

Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual
das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar
americana / Naiura Vieira Pereira. -- São Paulo,
2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Mirian Nacagami Sotto.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Macrófagos
M2 3.CD163 4.CD206 5.Imuno-histoquímica 6.Dupla
marcação 7.Imunopatologia

USP/FM/DBD-017/18

Responsável: Kátia Maria Bruno - CRB-8/6008

*Aos meus pais, Claudio e Joce, e à minha irmã Naíma, por
fazerem com que esse momento se tornasse possível*

Ao final desta caminhada, gostaria de agradecer:

Especialmente à minha orientadora, **Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto**, pelo incentivo constante desde meu ingresso no mestrado; sua generosidade em ensinar e pela oportunidade diária de aprender com seus ensinamentos; por ser paciente, estar sempre presente e disponível durante o desenvolvimento deste trabalho; pelo carinho e companhia prazerosa. Tenho muita admiração pela senhora! Muito obrigada!

Flávia Cristaldi, Mariane Pereira Brito, Yasmim Leuzzi pelo precioso auxílio técnico na confecção das lâminas, pela prazerosa convivência diária e amizade ao longo destes anos.

Aos técnicos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica, **Maria Cristina Galhardo, Jacqueline Maria Cruz Aragão, Luciana Kassimiro, Antonio Marques e Aliete Pavoni Begnini** pelo auxílio com os procedimentos histológicos e pela amizade.

À **Aline Alves de Lima Silva** pela simpatia e auxílio no início das padronizações das duplas marcações.

Ao **Wellington Ferreira da Silva** por sua paciência e boa vontade ao ensinar a fotografar e a utilizar o programa Image Pro Plus para a quantificação das células.

À **Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva** por sua disponibilidade e preciosa ajuda em diversos momentos durante a realização deste trabalho.

À **Dra. Maria de Lourdes Higuchi, Joyce Kawakami, Márcia Martins Reis e Suely Palomino** do Laboratório de Patologia Cardíaca do InCor – HCFMUSP, disponibilidade ao me auxiliar com o escaneamento das lâminas.

À **Dra. Raquel Leão Orfali** pela amizade e auxílio com o programa EndNote.

À **Dra. Caroline Midori Takigami**, por organizar o banco de dados dos pacientes.

À **Isabel Figueiredo**, do Serviço de Acesso à Informação, da Divisão de Biblioteca e Documentação da FMUSP, pela confecção da ficha catalográfica e disponibilidade ao me auxiliar com as dificuldades que apareceram ao trabalhar com o programa EndNote.

Ao **Dr. Paulo Ricardo Criado, Dra. Ilana Halpern e Dra. Fernanda Guedes** por fazerem parte da minha banca de qualificação e contribuírem para o enriquecimento desse trabalho.

À **Dra Carla Pagliari**, pelo auxílio em vários momentos ao longo da realização deste trabalho e pela amizade de tantos anos.

Às amigas do Laboratório de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, **Rosana Cardoso, Luciane Kanashiro Galo, Cleusa Takakura, Mônica Rebeca Kauffman**, pela convivência, amizade, carinho e estímulo durante a realização deste trabalho.

Aos **familiares e amigos** pelo carinho, compreensão e estímulo ao longo desta jornada.

Ao **meu pai**, Claudio, por me ensinar tantos valores através dos seus exemplos; pelas caronas nos dias de chuva e para que eu não carregasse peso, quando estava com o notebook; e por falar que me ama tanto que o coração quase explode para fora do peito (hahaha). Te amo tanto!

À **minha mãe**, Joce, por sempre me incentivar a crescer e perseguir meus objetivos, mesmo que eles não sejam fáceis; por me falar para não incomodar os outros para não ser incomodada; pelo amor e carinho na forma de comidinhas deliciosas e por meu poupar das atividades domésticas para que estudasse. Te amo demais!

À **minha irmã**, Naíma, minha parceira da vida inteira, por sempre cuidar de mim; pelas diversas demonstrações de generosidade e auxílio quando precisei; por ser a irmã mais velha que puxa a orelha, quando necessário; e por ser minha melhor amiga. Amo muito!

*“Viva como se você fosse morrer amanhã.
Aprenda como se você fosse viver para sempre”.*
Mahatma Gandhi

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias.

Elaborados por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	08
3.1. Aspectos epidemiológicos, etiológicos e quadro clínico da leishmaniose tegumentar americana.....	09
3.2. Resposta tecidual cutânea da leishmaniose tegumentar.....	10
3.3. Relação parasita-hospedeiro e resposta imune.....	11
3.4. Resposta imune e dano tecidual na leishmaniose tegumentar	13
3.5. Mecanismos reguladores na leishmaniose tegumentar: linfócitos T reguladores e células dendríticas tolerogênicas.....	14
3.6. Macrófagos: expressão imunofenotípica no “continuum” de ativação.....	16
3.6.1. Macrófagos polarizados M2 na leishmaniose tegumentar.....	20
4. MÉTODOS.....	24
4.1. Casuística.....	25
4.2. Análise histopatológica.....	26
4.3. Demonstração dos macrófagos M2 (CD163+ e CD206+).....	26
4.4. Reação imuno-histoquímica de dupla marcação para demonstração da expressão dos fatores de transcrição pSTAT1 e CMAF por macrófagos imunomarcados com os anticorpos CD68	28

e CD163.....	
4.5. Análise quantitativa das células imunomarcadas.....	30
4.6. Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Demonstração De Macrófagos M2 (CD163+ e CD206+) nas lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana.....	33
5.1.1. Macrófagos M2 nas lesões cutâneas com reação granulomatosa e inflamatória difusa.....	36
5.1.2. Macrófagos M2 em lesões de pele de pacientes com as formas cutânea e mucocutânea da leishmaniose tegumentar americana.....	38
5.1.3. Macrófagos M2 nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana de acordo com a presença ou ausência de parasitas.....	40
5.1.4. Análise de correlação entre o número de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana.....	44
5.2. Comparação entre o número de células pSTAT1+/CD68+ (macrófagos M1) e o de células CMAF+/CD163+ (macrófagos M2) nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana...	45
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	57
8. ANEXOS.....	60
9. REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

βIG-H3	fator transformador de crescimento beta
BALB/c	linhagem de camundongo suscetível à leishmaniose
BSA	soroalbumina bovina
C57BL/6J	linhagem de camundongo resistente à leishmaniose
CAPPesp	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD	“cluster of differentiation”
CCL	“C-C motif chemokine ligand”
CMAF	“musculoaponeurotic fibrosarcoma proto-oncogene”
CR	receptor do sistema complemento
CXCL	“C-X-C motif chemokine ligand”
CXCR	“C-X-C motif Chemokine Receptor”
DC	célula dendrítica
DC-SIGN	“dendritic cell specific ICAM-grabbing non-integrin”
FcyR	receptor da porção Fc da imunoglobulina G
FN	fibronectina
FXIIIa	fator de coagulação XIIIa
GP63	glicoproteína 63
Hb	hemoglobina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano

Hp	haptoglobina
IDO	indolamina 2, 3 dioxigenase
IFN	Interferon
IGF	fator de crescimento “insulina-like”
IHQ	Imuno-histoquímica
IgG	imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
LAMP	“Lysosomal-associated membrane protein”
LC	leishmaniose cutânea
LMC	leishmaniose mucocutânea
LPG	lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	leishmaniose tegumentar Americana
LV	leishmaniose visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NETs	“neutrophil extracellular traps”
NK	células “Natural Killer”
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
pSTAT1	forma fosforilada do fator de transcrição nuclear STAT1
sCD163	forma solúvel do receptor “scavanger” CD163
TGF- β	fator de crescimento tumoral beta

-
- Th1** linfócitos T auxiliares do tipo 1
- Th2** linfócitos T auxiliares do tipo 2
- TLR** “toll-like receptor”
- TNF- α** Fator de necrose tumoral alfa
- Treg** Linfócitos T regulatórios

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Leishmaniose Tegumentar Americana. Reação granulomatosa com granuloma epitelióide bem organizado (A). Infiltrado inflamatório dérmico linfohistiocítico denso e difuso (B).....	26
Figura 2	Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana. Células mononucleares imunomarcadas com CD163 no infiltrado inflamatório dérmico e no entorno de granuloma (A) e de permeio ao infiltrado dérmico difuso superficial e profundo (B).....	34
Figura 3	Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana. Células imunomarcadas com o anticorpo CD206 com distribuição preferencial em torno de granulomas (A) e no infiltrado inflamatório dérmico difuso (B).....	35
Figura 4	Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com reação granulomatosa. Células CMAF/CD163+ (A) e pSTAT1/CD68+ (B).....	46
Figura 5	Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com reação inflamatória difusa. Células CMAF/CD163+ (A) e pSTAT1/CD68+ (B).....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Comparação entre número de macrófagos CD163+ em lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana com reação inflamatória granulomatosa (A) e inflamatória difusa (B).....	36
Gráfico 2	Comparação entre número de macrófagos CD206+ em lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana com reação inflamatória granulomatosa (A) e inflamatória difusa (B).....	37
Gráfico 3	Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele de doentes com a forma cutânea (A) e a forma mucocutânea (B) da leishmaniose tegumentar americana.....	38
Gráfico 4	Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele de doentes com a forma cutânea (A) e a forma mucocutânea (B) da leishmaniose tegumentar americana.....	39
Gráfico 5	Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B).....	40
Gráfico 6	Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B).....	41
Gráfico 7	Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana.....	42
Gráfico 8	Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana.....	42

Gráfico 9	Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma mucocutânea da leishmaniose tegumentar.....	43
Gráfico 10	Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma mucocutânea da leishmaniose tegumentar americana.....	43
Gráfico 11	Análise de correlação entre as populações de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana.....	45
Gráfico 12	Comparação entre o número de células pSTA1+/CD68+ (A) e CMAF+/CD163+ (B) em lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Dados clínicos e laboratoriais de doentes com a forma cutânea da leishmaniose.....	62
Quadro 2	Dados clínicos e laboratoriais de doentes com a forma mucocutânea da leishmaniose.....	63
Quadro 3	Dados referentes às contagens das células CD 163+ e CD206+ e aos parâmetros de comparação utilizados, em doentes com a forma cutânea da leishmaniose.....	64
Quadro 4	Dados referentes às contagens das células CD 163+ e CD206+ e aos parâmetros de comparação utilizados, em doentes com a forma mucocutânea da leishmaniose.....	65
Quadro 5	Dados referentes às contagens de células CMAF/CD163+ e pSTAT1/CD68+.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de macrófagos CD163+ e CD206+ em lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana de acordo com o tipo de resposta tecidual.....	37
Tabela 2	Número de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana de acordo com a forma clínica da doença.....	39
Tabela 3	Comparação do número de macrófagos CD163+ e CD206+ em lesões de pele de doentes com leishmaniose tegumentar americana de acordo com a presença ou ausência de parasitas.....	44
Tabela 4	Comparação entre o número de células pSTAT1/CD68+ e CMAF/ CD163+ nas lesões de pele da leishmaniose tegumentar americana	48

RESUMO

Pereira NV. *Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa endêmica no Brasil, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e possui duas formas clínicas principais, a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose mucocutânea (LMC). Os macrófagos têm papel crucial na patogênese da Leishmaniose como hospedeiros do parasita e atuam como células apresentadoras de antígenos, promovendo uma resposta imune de perfil Th1 contra a *Leishmania*. Os macrófagos polarizados M2, relacionados com resposta anti-inflamatória (Th2), são envolvidos no controle da inflamação e dano tecidual em várias doenças e estão associados à cronicidade nas doenças infecciosas. O objetivo deste trabalho foi verificar a participação dos macrófagos M2 nos sítios de lesão cutânea da LTA.

MÉTODOS: Sessenta e três biópsias de pele de lesões de LTA, obtidas de 48 doentes com LC e 15 de LMC, foram submetidas ao método imuno-histoquímico com os anticorpos anti-CD163 e anti-CD206, marcadores de macrófagos M2. Dez espécimes foram também submetidos à técnica imuno-histoquímica de dupla marcação com a utilização dos marcadores pSTAT-1 e CD68 para identificação de macrófagos M1 e CMAF e CD163 para identificação de macrófagos M2. **RESULTADOS:** Os espécimes de pele com reação inflamatória difusa ($n = 26$) exibiram maior número de células imunomarcadas com CD163, quando comparadas ao grupo com reação granulomatosa bem organizada ($n = 37$) ($p = 0,01$). Os macrófagos CD163+ também foram mais numerosos nas lesões de pele com a presença de formas amastigotas de *Leishmania* ($n = 39$) ao exame histopatológico ($p = 0,02$), quando comparadas às lesões onde os parasitas não foram observados ($n = 24$). O mesmo ocorreu quando comparados somente os espécimes do grupo de doentes com LC com a presença de parasitas ($n = 31$) e ausência dos mesmos ($n = 17$) ($p = 0,04$). As lesões de pele de doentes com LMC mostraram maior número de células CD206+ ($n = 15$) que a de doentes com LC ($n = 48$) ($p = 0,008$). Houve correlação positiva entre o número de células imunomarcadas com os anticorpos CD163 e CD206 (r de Spearman = 0,369). Os macrófagos +pSTAT1/CD68+ (M1) mostraram-se mais numerosos que os macrófagos CMAF+/CD163+ (M2) nos sítios de lesão cutânea da LTA. **CONCLUSÕES:** Os resultados obtidos sugerem que os macrófagos M2 têm um papel

na resposta imune “in situ” da LTA. Essas células devem atuar como células alvo, facilitando a entrada dos parasitas, a progressão da doença e parecem estar envolvidos nos mecanismos de cronicidade e nos processos de remodelamento tecidual dessa doença. As moléculas CD163 e CD206 podem ser consideradas bons marcadores teciduais de macrófagos M2, uma vez que mostraram correlação positiva em sua expressão. A técnica de dupla marcação confirmou a presença dos macrófagos M2 nas lesões cutâneas da LTA. Embora ocorra a presença de macrófagos M2, os macrófagos M1 são a população macrofágica predominante da resposta imune “in situ” da LTA.

Descritores: leishmaniose cutânea; macrófagos M2; CD163; CD206; imuno-histoquímica; dupla marcação; imunopatologia

SUMMARY

Pereira NV. *M2 polarized macrophages in tissue immune response in cutaneous lesions of American tegumentary leishmaniasis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUCTION: American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an endemic infectious disease in Brazil, caused by *Leishmania* parasites and it has two main clinical forms, cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). Macrophages play a key role in leishmaniasis pathogenesis. They are definite parasite host and act as antigen presenting cells, eliciting a Th1 pattern of immune response (M1) against *Leishmania*. M2 polarized macrophages, related to an anti-inflammatory response (Th2), are involved in controlling inflammation and tissue damage in several diseases and are related to chronicity in infectious diseases. The aim of this study was verifying M2 macrophages “in situ” participation in ATL. **METHODS:** Sixty-three skin biopsies from LTA lesions, obtained from patients with CL (n=48) and MCL (n=15), were subjected to imunohistochemical technique with M2 macrophages markers CD163 and CD206 antibodies. Ten samples were selected for double staining technique with pSTAT1 and CD68 markers for M1 identification, and CMAF and CD163 markers for M2 macrophages identification. **RESULTS:** Skin samples displaying diffuse inflammatory reaction (n = 26) exhibited higher number of CD163 immune stained macrophages when compared to the well-organized granulomatous reaction group (n = 37) (p=0.01). CD163+ macrophages were higher in samples displaying *Leishmania* parasites (n = 39) at histopathology exam than the samples without parasites (n = 24) (p=0.02). Same result was observed when comparing the lesions of CL lesions with (n = 31) and without (n = 17) parasites (p = 0.04). MCL skin lesions (n = 15) showed higher number of CD206+ cells (p = 0.008) in comparison with skin lesions taken from CL patients (n = 48). Spearman test demonstrated a positive correlation between the number of CD163+ and CD206+ immune stained cells (Spearman r = 0,369). M1 macrophages (pSTAT1+/CD68+) were present in higher number when compared to M2 macrophages (CMAF+/CD163+) in the samples studied. **CONCLUSIONS:** The results suggest that M2 macrophages play a role in the *in situ* immune response of ATL. M2 polarized macrophages may act as host target cells facilitating parasites entry and promoting disease progression, but also seem to be involved with chronicity and tissue remodeling of ATL lesions. CD163 and CD206 molecules may be considered as good markers for M2 macrophages. Double staining technique confirmed the presence

of M2 macrophages, although M1 macrophages are the predominant macrophagic component in skin lesions of ATL.

Descriptors: Leishmaniasis, cutaneous; M2 macrophages; CD163; CD206; immunohistochemistry; double staining; immunopathology

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma parasitose transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) e causada por protozoários do gênero *Leishmania*, agrupados nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com os locais de desenvolvimento do parasita no intestino do flebotomíneo ¹. Um total de 21 espécies de *Leishmania* foram identificadas como patogênicas aos humanos. Os indivíduos acometidos podem desenvolver três formas principais da doença: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), sendo esta última a mais grave e letal, se não tratada ².

Ela é uma infecção tropical negligenciada associada à pobreza, mas fatores sociais, ambientais e climatológicos influenciam diretamente a distribuição da doença. É doença endêmica em 98 países e territórios, concentrados principalmente no Sudeste Asiático, Leste Africano, América Latina e países mediterrâneos. A doença acomete mais de 12 milhões de pessoas, tem entre 0,7 a 1,0 milhão de casos novos por ano e estima-se que 350 milhões estejam em risco de infecção. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esses números são subestimados, já que a notificação não é compulsória em grande parte dos países afetados, que são em sua maioria pobres e com deficiências no sistema de vigilância epidemiológica e métodos diagnósticos³. O aumento de indivíduos imunossuprimidos, devido à coinfeção da *Leishmania* com o HIV (vírus da imunodeficiência humana), pós-transplantados, uso de agentes quimioterápicos e terapias biológicas para condições inflamatórias crônicas recentemente introduzidas resultaram em um aumento da leishmaniose na Europa. Além disso, as viagens internacionais provocaram um aumento no número de casos de leishmaniose em países não endêmicos, tornando mais importante o conhecimento dessa parasitose ⁴.

A transmissão do parasita ocorre quando as formas flageladas promastigotas são transmitidas para o hospedeiro mamífero durante o repasto

sanguíneo do flebotomíneo. As promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos presentes no local de inoculação. No interior das células fagocíticas as promastigotas perdem o flagelo e se transformam em amastigotas, parasitas intracelulares obrigatórios. Multiplicam-se no citoplasma da célula hospedeira e infectam outros fagócitos após a rotura celular ⁵.

Os macrófagos são as células mais importantes no processo de fagocitose dos parasitas no sítio de lesão. Essas células têm um papel essencial na defesa do hospedeiro e na promoção e regulação da resposta imune, pois fornecem abrigo aos parasitas, apresentam os seus antígenos para os linfócitos T e produzem mediadores inflamatórios que promovem a eliminação da *Leishmania* ⁶.

A resposta imune adquirida via linfócitos Th1, estimulada pela produção de interferon- γ (IFN- γ), está associada à proteção, pois promove a eliminação dos parasitas através de processo oxidativo, caracterizado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO), realizado pelos macrófagos ativados. Além disso, os macrófagos também promovem a liberação de mediadores inflamatórios que participam da eliminação do parasita. Contudo, a resposta inflamatória exacerbada pode ocasionar dano tecidual ao doente. O reparo tecidual é realizado mediante a liberação de mediadores anti-inflamatórios como as interleucinas (IL) 4, IL-10 e o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), que inibem a ação macrofágica ^{7, 8}.

Os macrófagos são células conhecidas por sua grande plasticidade, pois podem apresentar diferentes fenótipos em resposta aos diferentes estímulos do microambiente. São classificados, de acordo com suas funções, em dois grupos, M1 e M2 ⁹.

Os macrófagos M1, ou classicamente ativados, apresentam atividade pró-inflamatória, mediante ao estímulo de IFN- γ , produzem citocinas e quimiocinas para o recrutamento de células de perfil Th1. Os macrófagos M1 expressam o antígeno leucocitário humano (HLA-DR), o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MCH-II) e a forma induzida de óxido nítrico sintase (iNOS), que é necessária para a eliminação dos parasitas ^{9, 10}.

Macrófagos M2 ou alternativamente ativados são estimulados por citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β . Essas células têm papel crítico na resolução da inflamação, na reparação tecidual e têm sido associados à cronicidade de doenças infecciosas ^{9, 10}. Embora a caracterização imunofenotípica dessas células no ambiente tecidual seja ainda controversa, os marcadores propostos na literatura são as moléculas CD206 (receptor de manose), CD163 (receptor *scavenger* de hemoglobina), receptor beta de folato e a IL-10 ¹¹.

O envolvimento dos macrófagos M2 na leishmaniose é pouco conhecido. São escassos os trabalhos da literatura científica que focam o seu papel nos processos patogénéticos da doença, alguns deles em modelos experimentais e no estudo de células do sangue e de extratos celulares obtidos de lesão ¹²⁻¹⁵. Entretanto, não encontramos estudos com enfoque na análise desse componente macrofágico no ambiente de lesão cutânea da leishmaniose tegumentar.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Gerais:

Verificar a participação de macrófagos M2 nos sítios de lesão cutânea da leishmaniose tegumentar americana de doentes com as formas cutânea e mucocutânea da doença.

Específicos:

- Demonstrar a presença de macrófagos M2 na resposta tecidual cutânea da leishmaniose tegumentar americana através de técnicas de imunohistoquímica com os imunomarcadores CD163 e CD206;
- Quantificar as células CD163+ e CD206+ e comparar a densidade de cada população celular entre a resposta tecidual granulomatosa e reposta inflamatória difusa não granulomatosa;
- Comparar a densidade das populações de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de doentes com a forma cutânea e mucocutânea;
- Comparar a densidade das populações de células CD163+ e CD206+ de acordo com a presença ou ausência de parasitas nas lesões;
- Verificar se os marcadores a serem utilizados (anticorpos CD163 e CD206) são adequados para a demonstração de macrófagos M2 nos sítios de lesão cutânea da leishmaniose tegumentar.

- Demonstrar, quantificar e comparar o número de macrófagos com perfil M1 com o de macrófagos M2, por meio da técnica de imunohistoquímica de dupla marcação com os marcadores pSTAT1/CD68 (M1) e CMAF/CD163 (M2), nessas lesões.

2. Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ETIOLÓGICOS E QUADRO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), que compreende as formas cutânea e mucocutânea da doença, ocorre em 20 países das Américas, sendo endêmica em 18 deles, incluindo o Brasil. A média anual, registrada no período de 2001 a 2015, é de 56.262 casos, com a redução de 10% no ano de 2015. Do total dos casos relatados na região em 2015, 70% deles ocorreram no Brasil (19.395), Colômbia (7.541) e Peru (5.459)¹⁶. No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, do total de casos notificados em 2016, 40% ocorreram na região norte, 25% na região nordeste, 15,5% na região centro-oeste, 9,4% na região sudeste e 1,7% na região sul¹⁷.

A LTA é causada por espécies de *Leishmania* conhecidas como do Novo Mundo. Ocasionalmente causam doença cutânea as espécies do complexo *L. mexicana*, e subgênero *Viannia*, mas também *L. major* e *L. infantum (chagasi)*. A forma mucocutânea é causada pelo subgênero *Viannia*, geralmente por *L. (V) braziliensis*, mas também por *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (L) amazonenses*^{1, 4}.

Duas formas morfológicas principais são identificadas no ciclo de vida da *Leishmania*: a forma promastigota extracelular flagelada de 15-20 µm de comprimento, presente no flebotomíneo e a amastigota, parasita intracelular obrigatório não flagelado, de 3-5 µm de comprimento, encontrado no interior de células da linhagem de monócitos/macrófagos nos hospedeiros mamíferos^{4, 18}.

As lesões cutâneas iniciais da leishmaniose surgem após um período de uma a quatro semanas da picada do inseto, como pápulas eritematosas únicas ou múltiplas, evoluem com aspecto pápulo-vesiculoso, pápulo-pustuloso,

pápulo-crostoso e finalmente se ulceram. As úlceras têm aspecto característico com bordas emolduradas e fundo granuloso. As lesões ulceradas podem evoluir espontaneamente para cicatrização ou originar placas vegetantes verrucosas. O envolvimento mucoso pode aparecer precocemente, ou um a dois anos, após o início da infecção por disseminação hematogênica do agente. As lesões mucosas são destrutivas e envolvem o tecido cartilaginoso do septo nasal, os lábios, palato, gengivas, língua, faringe e laringe. A leishmaniose tegumentar difusa ou anérgica caracteriza-se por lesões queloidianas múltiplas, entretanto, sem disseminação visceral ¹⁹.

3.2. RESPOSTA TECIDUAL CUTÂNEA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A resposta tecidual da LTA caracteriza-se por processo inflamatório crônico granulomatoso ou difuso não granulomatoso, frequentemente associado à plasmocitose tecidual ²⁰. A degeneração e necrose fibrinóide do colágeno associadas às alterações vasculares constituem achados frequentes nas lesões ^{21, 22}.

A forma difusa ou anérgica exhibe resposta tecidual caracterizada por proliferação e acentuado parasitismo de macrófagos ²³.

As alterações patológicas que caracterizam as diferentes formas de manifestação da doença são o reflexo do balanço entre a multiplicação dos parasitas, a resposta imune do hospedeiro e as alterações degenerativas e lesivas teciduais resultantes ²⁴.

3.3. RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE

A habilidade da *Leishmania* de infectar e persistir nas células apresentadoras de antígenos de seus hospedeiros é dependente da sua capacidade de acesso ao hospedeiro, de sobreviver no ambiente celular e de suprimir ou escapar dos mecanismos da resposta imune protetora de seus hospedeiros²⁵.

Nos mamíferos, as formas amastigotas de *Leishmania* residem no interior de células fagocíticas como macrófagos, células dendríticas (DC) e neutrófilos. Os macrófagos têm um papel inicial e fundamental na defesa do hospedeiro, ativação e regulação da resposta imune^{2, 26}.

Diferentes espécies de *Leishmania* contam com uma gama de receptores nos macrófagos, incluindo os receptores do sistema complemento (CR), receptores de manose (CD206), receptores de fibronectina e os receptores Fcy (FcyR). O tipo de receptor utilizado pelo parasita pode afetar o curso da infecção. A absorção mediada por CR via CR3 e CR1 inibe a inflamação e o “burst” de superóxido, bem como o acúmulo dos marcadores lisossomais LAMP1 e catepsina D. Isso pode propiciar condições mais favoráveis para o parasita no fagossoma de macrófagos. No entanto, em conjunto com receptores de fibronectina, as condições inflamatórias mais acentuadas podem resultar na eliminação do parasita. A sinalização do receptor de manose (CD206) desencadeia vias inflamatórias e a liberação mais eficiente de enzimas hidrolíticas no fagolisossomo. A fagocitose mediada por FcyR leva a uma maior ativação da NADPH oxidase no fagossoma recém-formado. As interações entre as moléculas de superfície da *Leishmania*, em especial GP63 e lipofosfoglicano (LPG), e os receptores macrofágicos acima citados, são as principais responsáveis pelas alterações nas cascatas de sinalização das células envolvidas, que acarretam mudança do direcionamento da resposta imune e favorecem a sobrevivência do parasita^{27, 28}.

Nos modelos experimentais, os polimorfonucleares neutrófilos são as células que se dirigem inicialmente ao local do inóculo e são parasitadas pelas formas promastigotas de *Leishmania* ²⁹. Embora os mecanismos que direcionam essa resposta ainda não sejam bem definidos, a rapidez da resposta e sua associação com o dano tecidual sugerem um papel para as alarminas, moléculas endógenas que sinalizam danos celular e tecidual ^{5, 30}. Os neutrófilos podem atuar como “Cavalos de Tróia”, transferindo as promastigotas silenciosamente para os macrófagos, através da fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Além disso, os neutrófilos são capazes de atacar e matar as formas promastigotas de *Leishmania* pelo mecanismo de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs – “neutrophil extracellular traps”) ^{31, 32}.

Entretanto, a maioria das células que albergam os parasitas pertence ao sistema fagocítico mononuclear: monócitos, macrófagos e células dendríticas. Os parasitas multiplicam-se no interior das células hospedeiras locais e recrutadas no processo inflamatório. Nos sítios de lesão esses elementos celulares exercem diferentes funções: os macrófagos são cruciais para a multiplicação e eliminação dos parasitas, assim como as células dendríticas que fazem o elo entre a imunidade inata e adaptativa ³³.

A presença do parasita promove a migração de monócitos para os sítios de inoculação da infecção, assim como sua diferenciação em células dendríticas. As células dendríticas incorporam antígenos de *Leishmania* e exercem a atividade de apresentação antigênica, através do aumento da expressão de MHC-II, culminando na ativação e diferenciação de linfócitos de perfil Th1. Essas células promovem a lise dos parasitas, através da produção de IFN- γ . Nos sítios de lesão os linfócitos T CD8+ também secretam IFN- γ . Por outro lado, o controle da resposta imune é mediada pela IL-10, citocina produzida por linfócitos T reguladores (Treg), linfócitos T CD8+, células natural killer (NK), linfócitos B, macrófagos e células dendríticas ⁵.

Os estudos com modelos experimentais em camundongos de linhagens resistentes (C57Bl/6j) e susceptíveis (BALB/c) à *Leishmania* proporcionam uma melhor compreensão da relação parasita-hospedeiro e da resposta imune na leishmaniose cutânea. A resolução da infecção depende da eficiência da

resposta imune do hospedeiro. A imunidade mediada por células é importante para esse controle. Tanto a resistência quanto à susceptibilidade ao parasita é mediada pelos linfócitos T CD4⁺ e dependem do perfil de citocinas por eles produzidas. A secreção IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ Th1 promove a proteção à doença, enquanto que IL-4 e IL-10 produzidas pelas células CD4⁺ Th2 facilitam a disseminação do parasita. O IFN- γ medeia a eliminação dos parasitas por estimular os macrófagos. A IL-4, IL-10 e o TGF- β são citocinas inibidoras da ação macrofágica ⁷.

A doença ativa ocorre quando a resposta imune mediada por células específica não é totalmente eficaz. Os linfócitos T CD4⁺ são essenciais para conferir resistência ao parasita, mas também contribuem para os processos patogênicos da doença ⁶.

3.4. RESPOSTA IMUNE E DANO TECIDUAL NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Como acima exposto os macrófagos são células de grande importância na infecção por *Leishmania*. Essas células podem fornecer abrigo aos parasitas por longos períodos, atuar como células apresentadoras de antígenos e promover a secreção de moléculas que induzem a resposta inflamatória e a eliminação do agente infeccioso. Contudo, estudos experimentais com macrófagos derivados de monócitos do sangue de indivíduos com as formas cutânea e mucosa de leishmaniose demonstram que essas células podem também permitir a sobrevivência dos parasitas e ao mesmo tempo produzir altos níveis de citocinas pró-inflamatórias que atraem neutrófilos, monócitos e linfócitos T ativados para os sítios de lesão o que resulta na ampliação da reação inflamatória que contribui para o dano tecidual e, portando, a doença ⁶.

Na leishmaniose tegumentar a resposta imune de tipo Th1 controla a multiplicação e disseminação dos parasitas, entretanto, não é capaz de eliminá-los totalmente ³⁴. Por outro lado, a resposta imune exagerada e exacerbada com produção de citocinas pró-inflamatórias promove o dano tecidual ⁸.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) exerce um importante papel de proteção na leishmaniose humana e experimental. Entretanto, essa citocina pró-inflamatória promove o dano tecidual na leishmaniose tegumentar ⁶.

Do acima exposto podemos observar que na leishmaniose tegumentar a resposta imune pode controlar a disseminação do parasita, mas também é exacerbada e induz dano tecidual e, portanto, doença. Entretanto, mecanismos reguladores da resposta imune têm sido identificados na leishmaniose tegumentar.

3.5. MECANISMOS REGULADORES NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: LINFÓCITOS T REGULADORES E CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÊNICAS

Os linfócitos Treg exercem papel importante na regulação das respostas imunes e são responsáveis pela tolerância imunológica. Essas células são CD4⁺ CD25⁺ e estão presentes no sangue periférico e timo. Têm papel na imunomodulação da intensidade da resposta efetora em processos infecciosos, com a prevenção de lesões induzidas, ou resultantes, da resposta imune ³⁵.

Na leishmaniose experimental, as células Treg foram demonstradas nos sítios de lesão e estariam relacionadas ao controle dos parasitas a longo prazo ³⁶. Entretanto, as Treg estariam envolvidas na reativação de leishmaniose experimental persistente ³⁷. Nas lesões de leishmaniose cutânea humana, linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ apresentam características fenotípicas e funcionais de células Treg ³⁵. Essas células participam do processo de resolução das lesões crônicas da leishmaniose cutânea ³⁸.

As células dendríticas (DC) são reguladores chave da resposta imune. São capazes tanto de promover como suprimir a resposta imunológica dependente de linfócitos T. As DC podem induzir tolerância, ao invés de ativação do sistema imune, quando do processo de apresentação antigênica³⁹.

A promoção de tolerância pelas DC depende da integração de informações do sistema imune inato e adaptativo. Pode ser resultante da ausência de sinais, como quando ocorre a promoção de tolerância pela apresentação de antígenos por DC imaturas. Resulta de resposta a agentes tolerogênicos como a IL-10 e TGF-beta, ou por sinais na imunidade adaptativa através de Treg³⁹.

Um dos mecanismos relacionados com a tolerância ou imunossupressão é o da ação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Esta enzima degrada o aminoácido triptofano. IDO é uma enzima intracelular que é expressa de modo constitutivo pelas células trofoblásticas, epidídimo, íleo distal, cólon, linfonodos, baço, timo e pulmões. Foi demonstrado que IDO representa um mecanismo potencial para o desenvolvimento de tolerância mediada por DC. As DC que expressam IDO inibem a proliferação de linfócitos T pela depleção de triptofano e acúmulo de seus metabólitos. Esses induzem a expansão de células Treg. As DC reguladoras atuam na indução de tolerância. As DC imaturas ativam as células Treg CD4+CD25+ e expressam IDO de modo constitutivo³⁹.

Os catabólitos do triptofano (quinurenina e o ácido 3-hidroxiantralínico e quinolínico) induzem a apoptose de linfócitos T e alteram a função de linfócitos T ativados, linfócitos B e células NK⁴⁰. A expressão local de IDO pode suprimir a resposta imunológica pelo bloqueio de linfócitos T e células natural killer (NK). Células dendríticas IDO+ promovem a proliferação de células Treg CD4+CD25+⁴¹.

Nas lesões cutâneas de leishmaniose ocorre maior expressão de mRNA de IDO, assim como abundância de células Treg⁴².

3.6. MACRÓFAGOS: EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA NO “CONTINUUM” DE ATIVAÇÃO

Os macrófagos são células conhecidas por sua grande plasticidade, pois podem apresentar diferentes fenótipos em resposta aos diferentes estímulos do microambiente ⁹. Essas células exibem um espectro de atividade funcional em condições de homeostasia e patológicas ^{43, 44}. Dependendo do estímulo do microambiente os macrófagos ativados adquirem capacidade microbicida, pró-inflamatória e anti-tumoral. Por outro lado, também podem contribuir nos processos de reparação tecidual, resolução da inflamação, de crescimento tumoral e promoção de metástases ⁴⁵.

Essa capacidade de atividade macrofágica é dependente de diferentes citocinas e assim sendo os macrófagos são classificados em dois grupos, macrófagos M1 ou classicamente ativados e Macrófagos M2 ou alternativamente ativados ⁹.

Os macrófagos M1 são aqueles que apresentam atividade pró-inflamatória, mediante ao estímulo de IFN- γ e a produtos microbianos, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas. Essas células produzem uma quantidade significativa de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-15, IL-18, IL-12 e TNF- α ⁴⁶ e quimiocinas como CCL15/HCC-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL13/BCA-1, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 e CXCL11/I-TAC, que coordenam o recrutamento de células NK na resposta imune Th1, por sua atividade em CXCR3 ⁴⁷⁻⁵³. Os macrófagos M1 apresentam altos níveis de MHC-II e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e baixos níveis de MRC1 (receptor de manose) ou Fc γ RII, expressando também HLA-DR ⁵⁴. As células M1 são caracterizadas pela elevada capacidade endocítica e habilidade de eliminar patógenos intracelulares, relacionadas à restrição de ferro e outros nutrientes aos microrganismos, acidificação do fagossomo e liberação de óxido nítrico (NO) através da ação de iNOS ^{10, 55-59}.

Os macrófagos M2 são considerados como um “continuum” de células relacionadas funcional e fenotipicamente, com um papel crítico na inflamação tipo Th2 e na fase de resolução e reparação tecidual. Pela predominância funcional são subdivididos em três grupos M2a, M2b e M2c ¹⁰.

A ativação M2a ocorre quando os macrófagos são estimulados com as citocinas IL-4 e IL-13, produzidas principalmente por células Th2, mastócitos e basófilos ⁶⁰. A ação dessas citocinas nos macrófagos promove a atividade anti-inflamatória, devido à diminuição dos mediadores inflamatórios e também à diminuição da expressão de moléculas de superfície como CD14 e CCR5 ^{43, 61-63}. O estímulo das células M2a por IL-4 leva ao aumento da expressão de vários receptores do tipo “Scavenger” e lectinas de membrana tipo C como a dectina-1 e a “dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin” (DC-SIGN) ⁴⁹. Essas células também expressam fibronectina 1 (FN-1) e a proteína associada a matriz β IG-H3, que promove a fibrogênese ⁶⁴ associada ao fator de coagulação FXIII e o fator de crescimento “insulina-like” 1 (IGF-1), o que propicia sinalização para a reparação tecidual e proliferação celular ⁶⁵. Através de estudo com modelos murinos sabe-se que as células M2a não expressam iNOS, mas expressam altos níveis de arginase - 1, o que altera a via metabólica do NO e faz com que não haja produção de NO, comprometendo a atividade microbicida contra os patógenos intracelulares. Entretanto, há promoção de crescimento celular, formação de colágeno e reparação tecidual ^{10, 66, 67}.

As células M2b ocorrem pelo estímulo de LPS ou IL-1 β , através de “Toll-like receptor” 4 (TLR4) ou IL-1R e imunocomplexos reconhecidos pela porção Fc da imunoglobulina G (Fc γ R) ^{68, 69}. São células funcionalmente contrárias às M1, pois são caracterizadas pela baixa produção de IL-12 e alta produção de IL-10, perfil esse que favorece o desenvolvimento de uma reposta adaptativa Th2 ⁷⁰. Elas também garantem a produção de IgG 1 pelos linfócitos B ⁷¹. As células M2b diferem das M2a por produzirem IL-10 em níveis muito mais altos, mas também produzem quantidades consideráveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, indicando que essas células não são anti-inflamatórias por si só. Foi demonstrada uma produção seletiva de CCL1/I-309, o agonista de CCR8, por

esses macrófagos, o que pode ter relevância para o recrutamento de células Treg^{10, 43, 48, 72, 73}.

Os macrófagos do tipo M2c são estimulados por IL-10, TGF- β ou glucocorticoides. As células M2c são consideradas como macrófagos desativados na medida em que sua marca é a regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias, o aumento da atividade de eliminação de debris celulares e promoção de programa funcional de reparação. A produção de IL-10 é importante para limitar a duração e intensidade das reações imunes e inflamatórias, através da inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, a diminuição da expressão de MHC-II e de moléculas co-estimulatórias, necessárias para apresentação de antígenos por monócitos e macrófagos. O TGF- β atua como um regulador negativo da expressão de CD163 pelos macrófagos e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-18 induzidas por LPS⁷⁴. Os glucocorticoides são liberados em resposta a vários sinais de estresse e são essenciais para manutenção da homeostase. Seu reconhecimento ocorre no núcleo celular e promove a supressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12 e de mediadores pró-inflamatórios como iNOS⁷⁵. Os glucocorticoides também inibem a resposta inflamatória aumentando a expressão de IL-10, e de outras moléculas com funções anti-inflamatórias como o receptor “scavenger” CD163 e interferindo no sistema IL-1^{10, 76}.

Devido à plasticidade dos macrófagos é difícil sua caracterização imunofenotípica frente aos seus diferentes estados de ativação, não existe um único marcador específico para a identificação de macrófagos polarizados⁷⁷. Entretanto, a identificação de macrófagos M2, na resposta tecidual dos processos neoplásicos, tem sido feita por painel de marcadores. Os marcadores que se expressam nos macrófagos dos ambientes tumorais (M2) são representados por: CD206 (receptor de manose), CD163 (receptor “scavenger” de hemoglobina), receptor beta de folato e a IL-10. Ao contrário dos macrófagos M1, os M2 não expressam iNOS e IL12p70¹¹.

Devido à dificuldade de estabelecer os melhores marcadores imunofenotípicos teciduais para os macrófagos M2, tem sido proposta técnicas

imuno-histoquímicas de dupla marcação utilizando-se o fator de transcrição CMAF (“musculoaponeurotic fibrosarcoma proto-oncogene”) essencial para a expressão do gene de IL-10 nos macrófagos, associado ao marcador CD163. Em contrapartida, os macrófagos M1 podem ser evidenciados pela marcação da forma fosforilada do fator de transcrição nuclear pSTAT-1, expressa pelos macrófagos ativados por interferons, e um marcador de macrófagos como o anticorpo CD68⁷⁸.

Os macrófagos regulatórios podem desenvolver-se nos estágios tardios da resposta da imunidade adaptativa. Sua função seria de atenuar a resposta imune e limitar a inflamação. Em modelos experimentais, os macrófagos regulatórios podem ser obtidos pelo estímulo “in vitro” com agonistas de “Toll-like receptors” (TLR) em presença de imunocomplexos. Esses macrófagos produzem altos níveis de IL-10. Os macrófagos associados a tumores são de tipo regulatório⁷⁹.

Os macrófagos M1 e M2 representam extremos de um *continuum* de ativação macrofágica⁴³. A população macrofágica é dinâmica, pois participa da inflamação e também nos eventos de resolução desse processo. A cronicidade das doenças infecciosas parece ser associada ao perfil M2 de macrófagos⁸⁰.

Sabe-se que o macrófago é a célula alvo principal na LTA. A atividade leishmanicida dos macrófagos é resultado de sua capacidade de produzir derivados tóxicos do oxigênio e NO em resposta ao IFN- γ . O óxido nítrico (NO) é crítico para a eliminação do parasita, já que em modelos experimentais macrófagos desprovidos da forma induzida de iNOS são incapazes de controlar a infecção e eliminar promastigotas em cultura⁷. A inibição da produção de NO pode resultar da produção de IL-10 e/ou TGF- β ⁸¹.

Os parasitas induzem o macrófago a produzir TNF- α , o que potencializa a ação do IFN- γ e, desse modo, ocorre um aumento de sua ativação^{82, 83}. A produção de NO se faz a partir de L-arginina pela ação de iNOS. A expressão de iNOS está aumentada nas lesões de leishmaniose cutânea localizada, com pequeno número de parasitas, entretanto, na forma cutânea disseminada poucas células expressam a iNOS. As células iNOS+ nos sítios de lesão são os

macrófagos⁸⁴. Entretanto, Vieira et al.⁸⁵ observaram igual número de células iNOS positivas nas formas localizada e disseminada da LTA.

Nas lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar, assim como os macrófagos, as células dendríticas Fator XIIIa+ coexpressam iNOS. Essas células são também parasitadas por formas amastigotas de *Leishmania*⁸⁶. Entretanto, os dendrócitos dérmicos com coexpressão de iNOS foram observados em menor número que os macrófagos, nessas lesões.

A participação de macrófagos com perfil M1 é essencial no controle parasitário das lesões de leishmaniose tegumentar e, poderíamos dizer que haveria também a participação de dendrócitos dérmicos com provável capacidade leishmanicida⁸⁷.

3.6.1. MACRÓFAGOS POLARIZADOS M2 NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Em modelo experimental *in vitro* foi observado que somente os macrófagos polarizados M2 permitem o crescimento de *Leishmania*⁸⁸.

A arginase -1, considerada como uma enzima do ciclo da ureia no fígado, hidrolisa a L-arginina em ureia e ornitina, que depois é metabolizada em poliaminas. O aumento da expressão de arginase - 1 nas células mieloides resulta no aumento da absorção da L-arginina extracelular, reduzindo assim os níveis de L-arginina no microambiente, o que compromete a ativação eficiente dos linfócitos T⁸⁹. Abebe et al.¹⁴ demonstraram alta expressão de arginase - 1 nas lesões de leishmaniose cutânea, através de estudo por citometria de fluxo de células isoladas de homogenatos de lesões cutâneas. Esses autores

verificaram que cerca de 95% das células com expressão citoplasmática de arginase -1 eram também CD15+ (polimorfonucleares neutrófilos), por outro lado somente 1% das células arginase - 1 positivas coexpressavam marcadores de macrófagos (CD14+/ CD15-). Os autores relacionaram a alta expressão de arginase - 1 com a alteração da função de linfócitos T, o que resultaria na demora e falha de resolução das lesões da leishmaniose cutânea. Em estudo prévio ⁹⁰, com modelo experimental de leishmaniose cutânea, o mesmo grupo de pesquisa observou que o aumento na atividade da arginase - 1 contribui para o desenvolvimento da leishmaniose persistente, devido à supressão local de reposta por células T. Entretanto, os dados são controversos entre murinos e humanos. Outros trabalhos realizados indicam que as citocinas IL-4 e IL-13 não são capazes de induzir a expressão de arginase -1 em macrófagos derivados de monócitos humanos. As análises dos perfis de transcrição dessas células induzidas por IL-4 e IL-13 não detectaram a expressão dos genes Ym1, Fizz1 e arginase - 1, que têm a expressão aumentada nos macrófagos murinos ^{12, 91-93}.

A molécula CD163 é uma glicoproteína que faz parte da superfamília rica em cisteína do receptor “scavenger” (“scavenger receptor cysteine-rich superfamily”), expressa somente em monócitos, macrófagos e neutrófilos. Essa molécula é um receptor dos complexos de hemoglobina (Hb) e hemoglobina-haptoglobina (Hp, Hb-Hp). Os metabólitos resultantes da degradação intracelular de hemoglobina exibem efeitos antioxidativos e anti-inflamatórios potentes. Foi observado “in vivo”, que a ligação da Hb ao CD163 induz a liberação de IL-10 e outros mediadores anti-inflamatórios ⁹⁴. Verificou-se também que a IL-10 aumenta a expressão de CD163 ^{95, 96} e que os níveis plasmáticos de CD163 (sCD163) se correlacionam inversamente com a expressão de CD163 nos monócitos do sangue ^{15, 97}.

A hanseníase virchowiana exhibe maior número de macrófagos CD163+ sendo que 40% das células CD163+ expressam a molécula IDO. Experimentos “in vitro” mostram que a expressão de CD163 pode ser induzida em macrófagos parasitados pelo *M. leprae* e isto parece ser parte da estratégia do parasita para criar um ambiente favorável para sua entrada e sobrevivência no

interior das células macrofágicas. Foi proposto que os altos níveis séricos de sCD163 poderiam ser utilizados como indicadores da gravidade de doenças como hanseníase e a Leishmaniose visceral (VL). O aumento na liberação de CD163 parece estar associado com um controle imunossupressor da inflamação^{15, 98, 99}.

Os receptores de manose (CD206) são glicoproteínas transmembranas, lectinas tipo C, que são expressos na superfície de diversos tipos de células, como os fagócitos mononucleares, especialmente macrófagos teciduais, células da retina, células dendríticas fibroblastos, entre outras¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Esses receptores participam da adesão e absorção de glicoproteínas manosiladas. Como já citado, o CD 206 também tem papel na defesa do hospedeiro devido a sua capacidade de reconhecer padrões de açúcares presentes na membrana plasmática e paredes celulares de uma gama de agentes infecciosos, mediando a sua internalização e promovendo a ligação da imunidade inata com a adaptativa^{105, 106}. Sabe-se que as formas promastigotas de *L. (L.) donovani* utilizam os receptores de manose durante a invasão dos macrófagos^{13, 101, 107-110}.

Frente à revisão realizada podemos dizer que na leishmaniose tegumentar o controle da multiplicação dos parasitas seria dependente da ativação de macrófagos polarizados M1, com capacidade leishmanicida devido a sua habilidade de produzir NO e espécies reativas de oxigênio, sob influência das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, a atividade inflamatória exacerbada resultante é lesiva e culmina com o dano tecidual que caracteriza a doença. São conhecidos mecanismos reguladores da resposta imune e da inflamação, dependentes da atuação de células dendríticas e linfócitos com função reguladora, sob influência de citocinas como a IL-10.

Os macrófagos apresentam características fenotípicas e funcionais de acordo com o microambiente aos quais estão submetidos. Os macrófagos ativados de modo alternativo, macrófagos polarizados M2, também estariam envolvidos nos mecanismos regulatórios para a atenuação da inflamação e, nos processos infecciosos crônicos, seriam a população macrofágica predominante⁸⁰.

Parece-nos interessante verificar se os macrófagos polarizados M2 estão presentes nas lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar, correlacionando-os com o tipo de resposta tecidual predominante (se granulomatosa ou difusa não granulomatosa), com a forma clínica dos doentes e à presença dos parasitas nas lesões, assim como, comparar a densidade desses macrófagos M2 com o de macrófagos M1.

4. Métodos

4. MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

Foram selecionados espécimes de lesões de pele de 62 doentes com a forma cutânea (n=48) e mucocutânea (n=14) da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo que no grupo mucocutâneo um dos 14 espécimes foi obtido de lesão de palato. As amostras foram obtidas no período de 2001 a 2014 e provenientes dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios diagnósticos empregados para a classificação de LTA foram: quadro clínico, reação intradérmica de Montenegro positiva e/ou demonstração de formas amastigotas e/ou antígeno de *Leishmania* nas lesões.

Os espécimes com material de biópsia insuficiente para realização da técnica de imuno-histoquímica e prontuários com dados incompletos foram excluídos da casuística.

As idades dos pacientes variaram entre dois e 71 anos (média de 36 anos), sendo que 37 deles pertenciam ao sexo masculino e 26 ao feminino. Os dados clínicos completos referentes ao sexo, idade, forma da doença, localização e tipo de lesão, características da resposta inflamatória, reação intradérmica de Montenegro e presença de parasitas estão apresentados nos anexos B, C, D e E.

Todos os pacientes eram brasileiros e residentes no país, onde a LTA é causada pelos parasitas dos complexos *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) mexicana*¹.

4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras de pele foram classificadas de acordo com a resposta tecidual em reação granulomatosa bem organizada ou reação inflamatória difusa, com raros esboços granulomatosos e, geralmente com muitos plasmócitos (Figura 1).

Figura 1 - Leishmaniose Tegumentar Americana. Reação granulomatosa com granuloma epitelióide bem organizado (A). Infiltrado inflamatório dérmico linfocitário denso e difuso (B). Hematoxilina e eosina $\times 100$

4.3. DEMONSTRAÇÃO DOS MACRÓFAGOS M2 (CD163+ E CD206+)

Cortes histológicos de quatro μm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co.,

St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavagem em água corrente por cinco minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em banho maria a 95°C, sendo imersas na solução “Target Retrieval Solution” pH 9,0 (cód. S2367, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), por 20 minutos.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4.

A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Procedeu-se à incubação com os anticorpos primários anti-CD163 (NCL-CD163, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) e anti-CD206 (MCA5552Z, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nas diluições 1:200 e 1:1000, respectivamente. Os anticorpos foram diluídos em soroalbumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “over-night” a 4°C.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em PBS, pH 7,4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário (Novolink Max Polymer Detection System, cód. K0690, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero (Novolink Max Polymer Detection System, cód. RE7280-K, Leica Microsystems, Newcastle

Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Subsequentemente, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos e posteriormente lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100) e lamínulas de vidro.

Os controles positivos das reações (cortes histológicos de fragmentos de pele com hanseníase virchowiana) foram submetidos aos mesmos procedimentos em cada uma das reações, assim como os controles negativos, estes com a substituição dos anticorpos primários por PBS, ou soro isotípico não reagente.

4.4. REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE DUPLA MARCAÇÃO PARA DEMONSTRAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO PSTAT1 E CMAF POR MACRÓFAGOS IMUNOMARCADOS COM OS ANTICORPOS CD68 E CD163

Com o objetivo de comparar a presença de macrófagos M1 e M2 na resposta tecidual cutânea da LTA foram selecionadas amostras de dez pacientes do grupo de estudo (seis com a forma cutânea e quatro com a forma mucocutânea da LTA), para avaliação da coexpressão dos fatores de transcrição pSTAT1 (para IFN gama) e CMAF (para IL-10) pelas células imunomarcadas com os anticorpos CD68 e CD163 respectivamente.

A técnica utilizada para a realização da dupla marcação se assemelha à técnica de imuno-histoquímica descrita acima e dessa maneira, o protocolo empregado é o mesmo até a etapa em que o anticorpo primário é aplicado.

Primeiramente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-pSTAT1 (SC-135648, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), na diluição 1:300 e anti-CMAF (SC-7866, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), na diluição 1:600. A diluição dos anticorpos foi feita na mesma solução de BSA fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “over-night” a 4°C.

Após a lavagem das lâminas, por duas vezes, em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário (Novolink Max Polymer Detection System, cód. K0690, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero (Novolink Max Polymer Detection System, cód. RE7280-K, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Subsequentemente, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e posteriormente lavadas em PBS pH 7,4. Em seguida, elas foram incubadas com os anticorpos primários anti-CD68 (clone KP-1, cód. 168M-96, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) na diluição 1:100 e CD163 (NCL-CD163, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK), na diluição 1:300, “over-night” a 4°C.

As lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com anticorpo secundário (PicTure Max HRP

Polymer Conjugate Broad Spectrum, cód.87-8983, Invitrogen Corporation, Camarillo, USA) pronto para uso, em câmara úmida, por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após a lavagem das lâminas em PBS pH 7,4, por duas vezes, foi realizada uma nova incubação com o polímero (PicTure Max HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum, cód.87-8983, Invitrogen Corporation), durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Para a etapa de revelação dos sítios antigênicos dos marcadores citoplasmáticos/membranosos (CD68 e CD163) foi utilizada a solução cromógena TrueBlue Peroxidase substrate (cód. 71-00-64, KLP, Gaithersburg, USA), pronta para uso e para os fatores de transcrição nucleares (CMAF e pSTAT1) o cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

As lâminas foram lavadas em água destilada por dois minutos e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100) e lamínulas de vidro.

Cortes histológicos de lesões de hanseníase virchowiana foram utilizados para controle positivo da dupla reação com o fator de transcrição CMAF e de hanseníase tuberculoide para a reação com o fator de transcrição pSTAT1.

4.5. ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS IMUNOMARCADAS

Todas as lâminas imunomarcadas foram digitalizadas pelo sistema Aperio Scan Scope Slide Scanner (Vista, CA, USA). As lâminas digitalizadas obtidas foram analisadas por meio do software Aperio's Image Scope Viewer. Foram

obtidas seis imagens de cada caso, de regiões com maior número de células e no aumento de 200x. Para a quantificação das células imunomarcadas utilizou-se o software de análise de imagem Image Pro Plus (Image-Pro Plus 4.5.0.29, MediaCybernetics). Todas as células mononucleares do infiltrado dérmico imunomarcadas com os anticorpos CD163 ou CD206 foram quantificadas. Entretanto, com relação às duplas marcações, só foram quantificadas as células que apresentavam colocalização dos dois marcadores nucleares e citoplasmáticos/membranosos em questão (pSTAT1+/CD68+ e CMAF+/CD163+). Desse modo, obteve-se a média de células mononucleares imunomarcadas/mm² para cada espécime.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0b, através do qual foram feitas comparações entre os grupos por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Fez-se a comparação do número de células imunomarcadas pelos anticorpos CD163 e CD206/mm² entre os grupos, de acordo com o tipo de reação tecidual (granulomatosa bem organizada ou infiltrado inflamatório difuso), espécimes de pele de pacientes com a forma cutânea e mucocutânea, e de acordo com a presença ou ausência dos parasitas/antígenos parasitários nas lesões.

Fez-se também a análise de correlação entre os marcadores CD163 e CD206 pelo teste de correlação de Spearman.

Para os 10 casos submetidos às duplas marcações fez-se a análise comparativa entre o número de células/mm² com coexpressão de pSTAT1+/CD68+ (macrófagos M1) e CMAF+/CD68+ (macrófagos M2) utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

O nível de significância considerado para as análises estatísticas foi de 95%.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. DEMONSTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS M2 (CD163+ E CD206+) NAS LESÕES CUTÂNEAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Todas as amostras do estudo apresentaram macrófagos CD163+ e CD206+ em meio ao infiltrado inflamatório dérmico. As células imunomarcadas com os anticorpos CD163 e CD206 estavam distribuídas de forma difusa entre outras células inflamatórias na derme papilar e reticular. Nos espécimes com resposta tecidual caracterizada por granulomas epitelioides bem organizados, as células marcadas estavam localizadas também ao redor dos granulomas (Figuras 2A e 3A).

Figura 2 - Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana. Células mononucleares imunomarcadas com CD163 no infiltrado inflamatório dérmico e no entorno de granuloma (A) e de permeio ao infiltrado dérmico difuso superficial e profundo (B). Técnica imuno-histoquímica com o cromógeno diaminobenzidina $\times 100$ (detalhe $\times 400$)

Figura 3 - Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana. Células imunomarcadas com o anticorpo CD206 com distribuição preferencial em torno de granulomas (A) e no infiltrado inflamatório dérmico difuso (B). Técnica imunohistoquímica com o cromógeno diaminobenzidina $\times 100$ (detalhe $\times 400$)

5.1.1. MACRÓFAGOS M2 NAS LESÕES CUTÂNEAS COM REAÇÃO GRANULOMATOSA E INFLAMATÓRIA DIFUSA

O número das células CD163+ foi maior no grupo de lesões cutâneas com resposta inflamatória difusa que naquele com resposta granulomatosa organizada ($p=0,01$) (Gráfico 1, Tabela 1, anexos D e E).

Gráfico 1 - Comparação entre número de macrófagos CD163+ em lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana com reação inflamatória granulomatosa (A) e inflamatória difusa (B). Barra—mediana. Teste Mann-Whitney

No que se refere à expressão das células CD206+, não foi encontrada diferença entre os padrões histológicos da resposta inflamatória, granulomatosa e difusa ($p>0,05$) (Gráfico 2 e Tabela 1).

Gráfico 2 - Comparação entre número de macrófagos CD206+ em lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana com reação inflamatória granulomatosa (A) e inflamatória difusa (B). Barra—mediana. Teste Mann-Whitney

Tabela 1 - Número de macrófagos CD163+ e CD206+ em lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana de acordo com o tipo de resposta tecidual

	Resposta tecidual	n	Mediana	Min-Máx*	Valor de p
CD163	Granulomatosa	37	77,2	11,5-238	p=0,01
	Difusa	26	102	39,8-298	
CD206	Granulomatosa	37	72,4	15,1-247	p>0,05
	Difusa	26	89,4	6,9-194	

*Mínimo-Máximo. Teste Mann-Whitney

5.1.2. MACRÓFAGOS M2 EM LESÕES DE PELE DE PACIENTES COM AS FORMAS CUTÂNEA E MUCOCUTÂNEA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

76% das amostras de pele (48 casos) eram provenientes de pacientes com a forma cutânea e 24% com a forma mucocutânea (15 casos) da LTA. O número das células CD163+ não diferiu entre os grupos ($p>0.05$) (Gráfico 3 e Tabela 2). Entretanto, foi observado um número aumentado de macrófagos CD206+ no grupo com a forma mucocutânea da LTA ($p=0.007$) em comparação ao grupo com a forma cutânea da doença (Gráfico 4 e Tabela 2).

Gráfico 3 - Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele de doentes com a forma cutânea (A) e a forma mucocutânea (B) da leishmaniose tegumentar americana. Barra—mediana. Teste de Mann-Whitney

Gráfico 4 - Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele de doentes com a forma cutânea (A) e a forma mucocutânea (B) da leishmaniose tegumentar americana. Barra-mediana. Teste de Mann-Whitney

Tabela 2 - Número de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana de acordo com a forma clínica da doença

Marcador	Forma Clínica	n	Mediana	Min-Máx*	Valor de p
CD163	cutâneo	48	88	14,7-298	p>0,05
	mucocutâneo	15	83,4	11,5-175	
CD206	cutâneo	48	68,5	6,90-247	p=0,008
	mucocutâneo	15	98,3	22,8-191	

*Mínimo-Máximo. Teste Mann-Whitney

5.1.3. MACRÓFAGOS M2 NAS LESÕES DE PELE DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE PARASITAS

Quando os espécimes foram avaliados de acordo com a presença (n=39) ou ausência (n=24) de amastigotas de *Leishmania*, observou-se um número maior de macrófagos CD163+ nos espécimes com formas amastigotas do parasita que naquelas com ausência de parasitas ao exame histológico (p=0,02) (Gráfico 5 e Tabela 3). Contudo, o número de células mononucleares CD206+ não diferiu entre os mesmos grupos analisados (p>0,05) (Gráfico 6 e Tabela 3).

Gráfico 5 - Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B). Barra—mediana. Teste de Mann-Whitney

Gráfico 6 - Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B). Barra-mediana. Teste de Mann-Whitney

Os espécimes de pele de doentes com a forma cutânea que apresentavam amastigotas de *Leishmania* (n=31) exibiram um número maior de macrófagos CD163+ ($p=0,04$) do que nas amostras em que os parasitas estavam ausentes (n=17) (Gráfico 7). O número de células CD206+ não diferiu entre os mesmos grupos de comparação (Gráfico 8). A mesma comparação não mostrou diferença quanto ao número de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de pacientes com a forma mucocutânea de LTA ($p>0,05$) (Gráfico 9 e 10 e tabela 3).

Gráfico 7 - Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. Barra-mediana; teste de Mann-Whitney

Gráfico 8 - Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. Barra-mediana. Teste de Mann-Whitney

Gráfico 9 - Comparação do número de macrófagos CD163+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma mucocutânea da leishmaniose tegumentar americana. Barra-mediana. Teste de Mann-Whitney

Gráfico 10 - Comparação do número de macrófagos CD206+ entre lesões de pele com a presença (A) e ausência de formas amastigotas (B), de pacientes com a forma mucocutânea da leishmaniose tegumentar americana. Barra-mediana. Teste de Mann-Whitney

Tabela 3 - Comparação do número de macrófagos CD163+ e CD206+ em lesões de pele de doentes com leishmaniose tegumentar americana de acordo com a presença ou ausência de parasitas

Marcador	Forma Clínica	Antígeno de Leishmania	n	Mediana	Min-Máx*	Valor de p
CD163	cutâneo + mucocutâneo	presente	39	101	11,5-298	p=0,02
		Ausente	24	78,8	14,7-175	
	cutâneo	presente	31	100	34,8-298	p=0,04
		Ausente	17	81,3	14,7-121	
	mucocutâneo	presente	8	106	11,5-175	p>0,05
		Ausente	7	74,5	34,8-175	
	cutâneo + mucocutâneo	presente	39	85,9	6,90-247	p>0,05
		ausente	24	70,8	15,1-191	
CD206	cutâneo	presente	31	72,4	6,90-247	p>0,05
		ausente	17	60	15,1-157	
	mucocutâneo	presente	8	102	22,8-191	p>0,05
		ausente	7	98,3	68,5-191	

*Mínimo-Máximo. Teste Mann-Whitney

5.1.3. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE CÉLULAS CD163+ E CD206+ NAS LESÕES DE PELE DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O teste de Spearman mostrou que o número de células CD163+ teve correlação positiva ($p=0,002$; r de Spearman= 0,369) com o número de células CD206+ presentes nas amostras de lesões cutâneas de LTA (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Análise de correlação entre as populações de células CD163+ e CD206+ nas lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana ($p=0,002$; r de Spearman= 0,369) - Teste de correlação de Spearman

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE CÉLULAS pSTAT1+/CD68+ (MACRÓFAGOS M1) E O DE CÉLULAS CMAF+/CD163+ (MACRÓFAGOS M2) NAS LESÕES DE PELE DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As reações imuno-histoquímicas de dupla marcação, realizadas em dez amostras de lesões cutâneas, demonstraram a expressão nuclear dos fatores de transcrição de interferon gama (pSTAT1) e de interleucina 10 (CMAF) em células imunomarcadas com os anticorpos CD68 e CD163, respectivamente.

A distribuição dessas células na resposta tecidual, das amostras de pele estudadas, foi semelhante às daquelas imunomarcadas somente com os anticorpos CD163 e CD206 (Figuras 4 e 5). Seis das amostras de pele submetidas às técnicas de dupla marcação eram provenientes de pacientes com a forma cutânea e quatro com a forma mucocutânea da LTA (anexo F).

Figura 4 - Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com reação granulomatosa. Células CMAF/CD163+ (A) e pSTAT1/CD68+ (B). Dupla marcação (→) técnica imuno-histoquímica com diaminobenzidina (marcação em castanho para CMAF e pSTAT1) e solução cromógena TrueBlue Peroxidase substrate (marcação em azul para CD68 e CD163) x200

Figura 5 - Lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana com reação inflamatória difusa. Células CMAF/CD163+ (A) e pSTAT1/CD68+ (B). Dupla marcação (→). Técnica imuno-histoquímica com diaminobenzidina (marcação em castanho para CMAF e pSTAT1) e solução cromógena TrueBlue Peroxidase substrate (marcação em azul para CD68 e CD163) x200

Verificamos que o número de macrófagos M1 (células pSTAT1+/CD68+) foi maior que o de macrófagos M2 (células CMAF+/CD163+) ($p=0,02$) na resposta tecidual da LTA (Gráfico 11 e Tabela 4).

Gráfico 12 - Comparação entre o número de células pSTAT1+/CD68+ (A) e CMAF+/CD163+ (B) em lesões de pele de leishmaniose tegumentar americana. Barra-mediana; teste de Mann-Whitney

Tabela 4 - Comparação entre o número de células pSTAT1/CD68+ e CMAF/ CD163+ nas lesões de pele da leishmaniose tegumentar americana

Marcadores	n	Mediana	Máximo-mínimo	Valor de p
pSTAT1/CD68	10	50,9	6,85-103,6	p=0,02
CMAF/CD163	10	15,28	4,85-48,82	

Teste Mann-Whitney

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Os macrófagos são elementos celulares cruciais na infecção por *Leishmania* uma vez que podem albergar os parasitas por longos períodos, atuam como células apresentadoras de antígenos, secretam moléculas que induzem a resposta inflamatória e atuam na eliminação de parasitas através da produção de derivados tóxicos do oxigênio e NO. Entretanto, estudos experimentais com macrófagos derivados de monócitos do sangue de indivíduos com as formas cutânea e mucosa de leishmaniose, mostraram que estas células permitem a sobrevivência dos parasitas e produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias que atraem neutrófilos, monócitos e linfócitos T ativados, o que resulta na ampliação da reação inflamatória que contribui para o dano tecidual e, portando, doença ⁶.

As células macrofágicas exibem acentuada plasticidade, uma vez que adquirem diferentes fenótipos dependendo dos diferentes estímulos do microambiente. A ativação dos macrófagos pode ser pró-inflamatória, denominada M1 (clássica) ou anti-inflamatória, M2 (alternativa). Os macrófagos M1 caracterizam-se pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, HLA-DR e iNOS. Por outro lado, os macrófagos M2 expressam baixos níveis dessas moléculas e podem ser identificados por marcadores como a arginase-1, CD14, receptor de manose (CD 206), receptor CD163 ("Hemoglobin-Haptoglobin Scavenger Receptor"), IL-10 e TGF- β 1 ⁹. Entretanto, o que ocorre é um "continuum" de estados fenotípicos e funcionais. A população macrofágica é dinâmica, participa da inflamação e atua também nos processos de resolução da inflamação e remodelamento tecidual. A evolução para a cronicidade das doenças infecciosas está associada ao perfil M2 de macrófagos ⁸⁰.

Nós demonstramos a participação de células CD163+ e células CD206+ na resposta inflamatória das lesões de pele de doentes com as formas cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) da leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Tanto lesões cutâneas de pacientes com a forma LC e como com a forma LMC da doença exibiram células mononucleares imunomarcadas para CD163 e CD206 em meio ao infiltrado inflamatório dérmico. Entretanto, os macrófagos M2 não fizeram parte da formação do granuloma, mas foram observados no entorno dessas estruturas.

A molécula CD163 é uma glicoproteína que faz parte da superfamília rica em cisteína do receptor “scavenger” (“scavenger receptor cysteine-rich superfamily”) e sua expressão é regulada por vários mediadores inflamatórios como IFN- γ , IL-6, IL-10 e glucocorticoides ¹¹¹⁻¹¹⁵.

O número de macrófagos que expressaram CD163 foi maior nas lesões de pele com reação inflamatória difusa em comparação ao grupo com reação granulomatosa. Nas doenças infecciosas, a organização da reação inflamatória “in situ” é associada à resposta imune celular e ao tipo de perfil imune. A reação granulomatosa bem organizada é relacionada com um microambiente de perfil Th1 dominante ¹¹⁶. Embora, com exceção da leishmaniose cutânea difusa ¹¹⁷⁻¹¹⁹, todas as formas clínicas da LTA apresentam predominantemente um perfil imune Th1, a resposta inflamatória “in situ” difusa pouco organizada pode estar relacionada a uma pior resposta imune local o que justificaria um maior número de macrófagos M2 nas lesões ^{6, 29}.

Observamos um número maior de células CD163+ nas lesões pele em que as formas amastigotas da *Leishmania* estavam presentes, quando comparadas às lesões onde os parasitas não foram observados ao exame dos cortes histológicos de rotina e mesmo ao exame de imuno-histoquímica para pesquisa de leishmânias. Ao analisarmos somente o grupo com a forma cutânea da doença também verificamos um maior número de células CD163+ nos casos em que as formas amastigotas estavam presentes.

Na hanseníase os macrófagos CD163+ estão relacionados à internalização da micobactéria. Esses macrófagos que expressam a molécula CD163 mostram-se em maior número nas lesões do polo virchowiano da hanseníase que nas lesões do polo tuberculoide. Além disso, cerca de 40% das células que expressam a molécula IDO (indolamina 2-3 dioxigenase)

também expressam o CD163. Experimentos “in vitro” demonstram que o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão de CD163 pelos macrófagos parasitados e, desse modo, propiciar um ambiente favorável não somente para a entrada do parasita na célula hospedeira como para a sua sobrevivência no ambiente intracelular ¹⁵.

A molécula CD163 também é encontrada sob a forma solúvel (sCD163) em sobrenadantes de cultura celular e no plasma humano. Os doentes com a forma virchowiana da hanseníase apresentam altos níveis de sCD163 no sangue. Esse sCD163 aumentado deve ser decorrente não somente dos monócitos do sangue, mas também de macrófagos residentes nos tecidos. A manutenção dos níveis elevados de sCD163 correlaciona-se com os níveis de IL-10, TNF e com a atividade de IDO ¹⁵.

O receptor CD163 na sua forma solúvel também tem sido proposto como indicador de gravidade de doenças inflamatórias e infecciosas, como a hanseníase e a leishmaniose visceral (LV), uma vez que os níveis mais altos de sCD163 correlacionam-se com as apresentações clínicas mais graves dessas doenças. Na LV, os níveis de sCD163 apresentam correlação direta com o volume do fígado e do baço e correlação inversa com a contagem de neutrófilos. Experimentos “in vitro” demonstram que *L. amazonensis* e *L. infantum* induzem a expressão de CD163 em monócitos/macrófagos e neutrófilos, o que sugere que essas células são as fontes de sCD163 observados na LV ⁹⁹.

Apesar das lesões de doentes com LC onde foram demonstradas formas amastigotas terem apresentado maior número de macrófagos CD163+, não observamos diferença no número de macrófagos CD163+ das lesões de pele de pacientes com LMC no que se refere à presença ou não de parasitas. A LMC associa-se a um dano tecidual acentuado relacionado à uma forte reação inflamatória (perfil M1), que se segue por resposta anti-inflamatória para o controle do dano tecidual (perfil M2), que ocasiona a cronicidade ¹²⁰. Desse modo, podemos interpretar que as células CD163+ relacionam-se mais à cronicidade das lesões na LMC e não propriamente à facilitação da

sobrevivência dos parasitas, como foi proposto para a hanseníase virchowiana e LV.

Podemos também relacionar os resultados acima discutidos à possível não especificidade da molécula CD163 como marcador de macrófagos M2, uma vez que as células dendríticas dérmicas, que expressam Fator XIIIa também são imunomarcadas pelo anticorpo anti-CD163¹²¹. Por outro lado, nas lesões de pele de LTA os dendrócitos dérmicos que expressam fator XIIIa são parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*⁸⁶. Parte desse componente dendrocítico dérmico expressa iNOS, embora em menor número que o componente macrofágico nos sítios de lesão cutânea da LTA⁸⁷. Além disso, há controvérsias sobre o CD163 como marcador exclusivo de macrófagos M2. No microambiente do linfoma de Hodgkin, entre as células CD163+ algumas coexpressam fatores de transcrição associados à polarização M1¹²². Não podemos descartar a possibilidade de que essas células CD163+ que coexpressam o fator de transcrição para os interferons descritas no microambiente do linfoma de Hodgkin seriam, de fato, o componente dendrocítico dérmico Fator XIIIa/iNOs+ observado nas lesões de LTA e não propriamente macrófagos polarizados M1 que expressam CD163.

Outro fato a ser considerado é o momento da coleta das biópsias e o momento em que o paciente se encontra no desenvolvimento da infecção. Pelo fato do nosso estudo ser retrospectivo, esses momentos podem diferir de paciente para paciente e poderiam expressar diferenças nas características imunofenotípicas das células da resposta inflamatória/imune “in situ”. A demora na procura médica, pelos doentes, pode implicar na confirmação diagnóstica em fase mais avançada da doença, quando já pode estar ocorrendo o direcionamento da resposta imune com participação dos macrófagos M2, para a atenuação da resposta inflamatória e início do processo de remodelamento tecidual¹²³.

A molécula CD206 é um receptor de manose, uma lectina tipo C que é expressa na superfície de vários tipos celulares e medeia a adesão e internalização de glicoproteínas manosiladas^{103, 105, 124-126}. Os receptores de manose também participam da endocitose de diferentes patógenos que

possuem resíduos de manose na sua superfície como o *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Candida albicans*^{102, 127, 128}. As formas promastigotas da *L. (L.) donovani* utilizam os receptores de manose durante a invasão de macrófagos. Entretanto, após a infecção das células alvo ocorre a diminuição da expressão destes receptores^{13, 101, 107-110}.

Na leishmaniose dérmica pós calazar foi observado o aumento da expressão das moléculas CD206 e arginase-1 pelas células CD68+ (macrófagos). Além disso, ocorreria ativação alternante de monócitos/macrófagos, o que permitiria a cronicidade dessa condição de envolvimento cutâneo por leishmânias viscerotrópicas¹²⁹.

Demonstramos que o número de macrófagos CD206+ encontrado nas lesões de pele dos pacientes com LMC foi maior que o número dessas células presentes nas lesões de doentes com LC. Essa observação pode ser explicada pela evolução da LMC à cronicidade, que estaria relacionada com a polarização M2 no ambiente lesional¹³⁰.

O receptor macrofágico CD206 tem papel na patogênese da leishmaniose, uma vez que facilita a entrada e multiplicação do parasita na célula hospedeira através da criação de um microambiente imunossupressor via polarização M2, prejudicando assim, a apresentação antigênica¹²⁹.

Devido às controvérsias da literatura quanto à demonstração de macrófagos M2 nos sítios de lesão e microambiente de neoplasias⁴³ realizamos a imunomarcagem desse componente macrofágico utilizando dois anticorpos, CD163 e CD206. A arginase-1, embora revele macrófagos M2 nos modelos experimentais de murinos, não é considerada um bom marcador para essa população celular em tecido humano. Isso porque alguns trabalhos mostraram que as citocinas IL-4 e IL-13 não são capazes de induzir a arginase-1 em monócitos e macrófagos derivados de monócitos humanos. As análises dos perfis de transcrição de monócitos induzidos por IL-13 e de macrófagos induzidos por IL-4 em humanos não detectaram a expressão dos genes *Ym1*, *Fizz1* e *arginase*, que têm a expressão aumentada nos macrófagos murinos. Acredita-se que a variação ocorra devido às diferenças entre os gêneros,

humanos e murinos^{12, 91-93}. Além disso, Abebe et al.¹⁴, ao analisarem homogenatos obtidos de lesões cutâneas de LC observaram que 95% da arginase 1 era proveniente de neutrófilos e somente 5% dos macrófagos.

Apesar das diferenças observadas na população celular estudada, quando da separação dos espécimes analisados nos subgrupos, acreditamos que os dois marcadores foram adequados para revelar a população de macrófagos M2. Essa observação é reforçada pelo resultado do teste de Spearman que mostrou haver correlação positiva entre o número de células imunomarcadas pelos anticorpos CD163 e CD206.

Devido à dificuldade de se chegar a um consenso sobre os marcadores de macrófagos mais adequados, principalmente no que se refere aos macrófagos de perfil M2, alguns trabalhos têm utilizado a dupla marcação com marcadores conhecidos de macrófagos (CD68 e CD163) e fatores de transcrição relacionados aos perfis M1(STAT1) e M2 (CMAF), para uma melhor caracterização imunofenotípica dessas células “in situ”. O fator de transcrição STAT1 tem a sua expressão aumentada em resposta aos IFN tipo I, II e III e a sua forma fosforilada (pSTAT1) liga-se à região promotora de genes estimulados por IFN^{131, 132}. O CMAF é um fator de transcrição essencial para a expressão do gene da IL-10 em macrófagos^{78, 133}.

Com o auxílio da técnica imuno-histoquímica de dupla marcação, observamos que nos sítios de lesão as células pSTAT1+/CD68+ estavam presentes em maior número que as células CMAF+/CD163+, o que indica uma predominância de macrófagos M1, relacionada com o perfil Th1 da resposta imune que é observada nas leishmanioses tegumentares, com exceção da forma anérgica^{6, 130}.

Demonstramos que na LTA, a população macrofágica nos sítios de lesão não é exclusivamente composta por macrófagos M1, tendo-se em vista que foram identificadas células de perfil M2 tanto nas lesões de pele de doentes com a forma cutânea como mucocutânea. Desse modo, evidenciamos que macrófagos diferentemente polarizados podem coexistir, mesmo numa doença que se caracteriza por exibir um perfil predominantemente Th1, como a

LTA. Esses nossos resultados são embasados pelos dados da literatura, que demonstram que a polarização dos macrófagos é um processo dinâmico. Ressaltamos também que a investigação “in situ” é importante para a compreensão do papel da polarização dos macrófagos na patogênese dos processos inflamatórios/imunes, infecciosos e mesmo neoplásicos^{78, 134, 135}.

Os resultados obtidos nos permitem dizer que os macrófagos M2 participam da resposta imune “in situ” da LTA, apesar de haver uma predominância de macrófagos M1 sobre os M2. Os macrófagos M2 mostraram-se em maior número na resposta tecidual difusa não granulomatosa e nas lesões de doentes onde os parasitas ainda eram observados ao exame histopatológico, o mesmo ocorrendo quando analisadas somente as lesões do grupo LC. Desse modo, podemos considerar que os macrófagos polarizados M2 devem atuar como células alvo do hospedeiro, facilitando a entrada dos parasitas e a progressão da doença. Por outro lado, os macrófagos M2 devem também estar envolvidos nos mecanismos de cronicidade e nos processos de remodelamento tecidual, uma vez que as lesões dos doentes com a forma mucocutânea, que se caracteriza por curso crônico e maior destruição/reparo tecidual, mostraram maior número de células M2 (CD206+) do que aquelas do grupo de doentes com a forma cutânea^{29, 120, 135}.

A demonstração da participação de macrófagos polarizados M2 nas lesões cutâneas da LTA pode contribuir para embasar a possibilidade de estratégias para a reorientação da polarização de macrófagos¹²⁹ como mais uma opção terapêutica da LTA, principalmente no que se refere à evolução para a cronicidade e remodelamento das lesões.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Os macrófagos M2 participam da resposta imune “in situ” cutânea da leishmaniose tegumentar americana.
- Os macrófagos M2 (CD163+) foram mais abundantes nas lesões cutâneas com resposta inflamatória difusa não granulomatosa que naquelas com resposta granulomatosa.
- Os macrófagos M2 (CD163+) foram mais numerosos nas lesões cutâneas, independentes da forma clínica da doença, com presença de formas amastigotas que nas lesões onde os parasitas não foram observados.
- Os macrófagos M2 (CD163+) foram mais numerosos nas lesões cutâneas com presença de formas amastigotas dos doentes com a forma cutânea da LTA que nas lesões desse grupo de doentes onde os parasitas não foram observados.
- Os macrófagos M2 (CD206+) foram mais abundantes nas lesões cutâneas de doentes com a forma mucocutânea que daqueles com a forma cutânea da doença.
- Os marcadores CD163 e CD206 podem ser considerados bons marcadores teciduais de macrófagos M2, uma vez que mostraram correlação positiva em sua expressão.

- A técnica de dupla marcação confirmou, por meio da expressão das células CMAF+/CD163+, a presença dos macrófagos M2 nas lesões cutâneas da LTA.

- Embora os macrófagos M2 estivessem presentes, os macrófagos de perfil M1 foram a população macrofágica predominante da resposta imune “in situ” da LTA.

8. Anexos

8. ANEXOS

Anexo A: Documento de aprovação da CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
 Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: : MACRÓFAGOS POLARIZADOS M2 NA RESPOSTA TECIDUAL DAS LESÕES CUTÂNEAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
Pesquisador Responsável: Mirian Nacagami Sotto **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Naiura Vieira Pereira **CAAE:** 18477113.6.0000.0068
Co-autores: Ilana HalpernCarla PagliariPaulo Ricardo Criado
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10974
Número do Parecer: 335.476
Data da Relatoria: 17/07/2013

Apresentação do Projeto: Trata-se de pesquisa retrospectiva que utilizará material de biopsia de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar estocado na Divisão de Dermatologia do HCFMUSP, nos quais serão realizados estudos imunohistoquímicos

Objetivo da Pesquisa: Identificar por perfil imunofenotípico a presença de macrófagos M2, identificados por imunohistoquímica, nas lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar e, comparar esta população macrofágica com a população de macrófagos INOS+, correlacionando os achados com as características clínico evolutivas da doença. Trata-se de estudo retrospectivo onde serão utilizadas peças de biopsias do laboratório de dermatopatologia da Divisão de Dermatologia do HCFMUSP. Sendo dispensado o TCLE

Avaliação dos Riscos e Benefícios: não há riscos envolvidos no estudo proposto

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: não apresenta questionamentos de natureza ética

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: os termos encontram-se adequados

Recomendações: aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: aprovado sem pendências

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 18 de Julho de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
 Vice-Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
 CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb
 55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo B: Quadro 1 - Dados clínicos e laboratoriais de doentes com a forma cutânea da leishmaniose

n	Caso	Idade	Sexo	Local da biópsia	Tipo de lesão	Reação de Montenegro
1	LC01	26	M	antebraço D	úlceras e nódulo	8 mm
2	LC02	55	F	antebraço D	NC	NC
3	LC03	9	F	mão e antebraço E	úlceras e nódulo	10 mm
4	LC04	49	F	ponta e dorso nasal	verrucosa	negativa
5	LC05	49	F	glúteo E	NC	20x30 mm
6	LC06	56	M	tórax anterior a E	úlceras	20 mm
7	LC07	34	M	antebraço E	úlceras	10 mm
8	LC08	20	F	dorso	úlceras	18x20 mm
9	LC09	64	M	submandibular	úlceras	9 mm
10	LC10	63	M	braço D	verrucosa	15 mm
11	LC11	43	F	glúteos	sarcoidea	7 mm
12	LC12	32	F	perna D	úlceras	9 mm
13	LC13	40	M	coxa E	verrucosa	10 mm
14	LC14	11	F	antebraço D	úlceras	18 mm
15	LC15	55	F	perna E	verrucosa	negativa
16	LC16	55	M	fronte e pé D	úlceras	30x25 mm
17	LC17	15	F	perna E	úlceras	6 mm
18	LC18	25	M	calcanhar D	NC	NC
19	LC19	27	M	face e dorso	úlceras	6 mm
20	LC20	45	F	malar E	úlceras	negativa
21	LC21	71	M	perna	úlceras	NC
22	LC22	43	M	perna E	úlceras	25x20 mm
23	LC23	24	M	tornozelo D	úlceras	8 mm
24	LC24	30	F	braço D	úlceras	8 mm
25	LC25	52	M	braços D e E	úlceras	NC
26	LC26	45	M	braço E	úlceras	7 mm
27	LC27	43	M	face E	nódulos	19x20 mm
28	LC28	54	M	mandíbula E	sarcoidea	15 mm
29	LC29	50	F	pé D	úlceras	9mm
30	LC30	4	F	perna E	úlceras	5 mm
31	LC31	47	M	punho E	úlceras	6 mm
32	LC32	39	M	coxa D	úlceras	10mm
33	LC33	21	M	retroauricular D	úlceras	5mm
34	LC34	10	F	perna D	úlceras	10mm
35	LC35	34	F	braço D	nódulo úlcera	NC
36	LC36	25	M	braço E	úlceras	25x34 mm
37	LC37	4	M	perna E	úlceras	5 mm
38	LC38	21	M	mandíbula E	nódulo verrucoso	13 mm
39	LC39	19	M	perna	NC	NC
40	LC40	11	M	pé D	úlceras	NC

41	LC41	34	F	tonozelo D	úlcer e pápula	NR
42	LC42	50	F	perna E	úlcer	8 mm
43	LC43	2	F	mão E	verrucosa	7 mm
44	LC44	10	F	perna E	úlcer	11 mm
45	LC45	60	m	mão E	úlcer	negativa
46	LC46	8	F	mento	verrucosa	7 mm
47	LC47	42	M	cervical E	nódulo	negativa
48	LC48	38	M	braço D	nódulo	5 mm

F – feminino; M- masculino; NC- não consta; NR – não realizado; D- direito; E – esquerdo

Anexo C: Quadro 2 - Dados clínicos e laboratoriais de doentes com a forma mucocutânea da leishmaniose

n	Caso	Idade	Sexo	Local da biópsia	Tipo de lesão	Comprometimento mucoso	Reação de Montenegro
1	LMC01	7	M	periumbilical	NC	mucosa oral	NC
2	LMC02	43	M	mento	sarcoidea	mucosa naso-orofaríngea	NC
3	LMC03	38	F	pele SOE	nódulo	mucosa nasal	10 mm
4	LMC04	49	F	pele infranasal à D	pápula	narina D	30 mm
5	LMC05	62	M	pele supralabial	úlcer	mucosa naso-orofaríngea	10 mm
6	LMC06	66	M	pele do nariz	úlcer	mucosa nasal	NC
7	LMC07	37	M	pele do nariz	verrucosa	narina	10 mm
8	LMC08	46	M	pré-auricular à D	úlcer	mucosa naso-orofaríngea	NC
9	LMC09	39	M	asa nasal E	verrucosa	mucosa naso-orofaríngea	10 mm
10	LMC10	62	M	pele supralabial	úlcer	mucosa naso-orofaríngea	5 mm
11	LMC11	63	M	palato	úlcer	mucosa oral	6 mm
12	LMC12	49	M	coxa E	verrucosa	mucosa nasal	6 mm
13	LMC13	7	F	columela nasal	úlcer	narina	negativa
14	LMC14	13	F	mento	úlcer-verrucosa	mucosa oral	3 mm
15	LMC15	52	F	pele SOE	úlcer	mucosa naso-orofaríngea	NC

F – feminino; M- masculino; NC- não consta; D- direito; E – esquerdo; SOE – sem outra especificação

Anexo D: Quadro 3 - Dados referentes às contagens das células CD 163+ e CD206+ e aos parâmetros de comparação utilizados, em doentes com a forma cutânea da leishmaniose

n	Caso	Reação Inflamatória	Parasita (HE)	IHQ	CD163 (cél/mm ²)	CD206 (cél/mm ²)
1	LC01	granulomatosa	ausente	(-)	115,98	119,7
2	LC02	granulomatosa	ausente	(-)	94,8	90,44
3	LC03	granulomatosa	ausente	(-)	59,84	63,13
4	LC04	difusa	ausente	(-)	107,08	109,38
5	LC05	granulomatosa	ausente	(-)	84,6	135,32
6	LC06	granulomatosa	ausente	(-)	17,8	49,54
7	LC07	granulomatosa	ausente	(-)	97,7	145,78
8	LC08	granulomatosa	ausente	(-)	14,72	50,85
9	LC09	granulomatosa	ausente	(-)	51,16	42,61
10	LC10	granulomatosa	ausente	(-)	105,94	50,31
11	LC11	granulomatosa	ausente	(-)	120,77	15,13
12	LC12	difusa	ausente	(-)	70,01	68,61
13	LC13	difusa	ausente	(-)	81,29	59,06
14	LC14	granulomatosa	ausente	(-)	76,26	55,07
15	LC15	difusa	ausente	(-)	21,19	27,97
16	LC16	granulomatosa	ausente	(-)	113,27	157,39
17	LC17	granulomatosa	ausente	(-)	37,48	60,04
18	LC18	granulomatosa	ausente	(+)	73,89	86,16
19	LC19	difusa	presente	(+)	297,81	59,51
20	LC20	difusa	presente	(+)	162,03	113,44
21	LC21	difusa	presente	(+)	103,59	85,91
22	LC22	granulomatosa	ausente	(+)	71,06	33,39
23	LC23	difusa	presente	(+)	133,97	133,62
24	LC24	difusa	presente	(+)	110,18	194,43
25	LC25	granulomatosa	presente	(+)	56,12	72,36
26	LC26	difusa	presente	(+)	206,45	33,58
27	LC27	granulomatosa	presente	(+)	77,23	21,76
28	LC28	granulomatosa	presente	(+)	238	93,82
29	LC29	granulomatosa	presente	(+)	57,22	46,68
30	LC30	difusa	presente	(+)	69,93	92,89
31	LC31	difusa	presente	(+)	180,74	126,92
32	LC32	granulomatosa	ausente	(+)	78,71	94,7
33	LC33	difusa	ausente	(+)	90,82	49,99
34	LC34	granulomatosa	presente	(+)	39,58	59,53
35	LC35	difusa	presente	(+)	163,83	43,32
36	LC36	granulomatosa	presente	(+)	84,7	111,98
37	LC37	difusa	presente	(+)	100,03	6,9
38	LC38	granulomatosa	ausente	(+)	210,56	246,58
39	LC39	difusa	ausente	(+)	84,8	58,24
40	LC40	difusa	presente	(+)	122,04	85,2

41	LC41	difusa	presente	(+)	49,19	78,51
42	LC42	granulomatosa	presente	(+)	115,76	55,53
43	LC43	granulomatosa	ausente	(+)	120,25	92,51
44	LC44	granulomatosa	presente	(+)	57,38	69,59
45	LC45	granulomatosa	presente	(+)	116,56	43,67
46	LC46	difusa	presente	(+)	85,13	23,34
47	LC47	difusa	presente	(+)	150,96	131,93
48	LC48	granulomatosa	presente	(+)	34,8	68,47

HE- material corado pela Hematoxilina-eosina; IHQ – material submetido a pesquisa do antígeno de Leishmania pela técnica de imuno-histoquímica

Anexo E: Quadro 4 - Dados referentes às contagens das células CD 163+ e CD206+ e aos parâmetros de comparação utilizados, em doentes com a forma mucocutânea da leishmaniose

n	Caso	Resposta Inflamatória	Parasita (HE)	IHQ	CD163 (cél/mm ²)	CD206 (cél/mm ²)
1	LMC01	difusa	ausente	(-)	83,39	171,41
2	LMC02	granulomatosa	ausente	(-)	175,03	190,77
3	LMC03	difusa	ausente	(-)	83,42	145,88
4	LMC04	granulomatosa	ausente	(-)	73,1	72,98
5	LMC05	granulomatosa	ausente	(-)	34,8	68,47
6	LMC06	granulomatosa	ausente	(-)	59,37	82,81
7	LMC07	granulomatosa	ausente	(-)	74,54	98,33
8	LMC08	difusa	presente	(+)	75,5	94,58
9	LMC09	granulomatosa	presente	(+)	110,19	130,6
10	LMC10	difusa	presente	(+)	174,62	106,33
11	LMC11	granulomatosa	ausente	(+)	11,46	22,75
12	LMC12	difusa	ausente	(+)	115,22	133,29
13	LMC13	granulomatosa	ausente	(+)	80,65	190,56
14	LMC14	granulomatosa	ausente	(+)	101,02	92,09
15	LMC15	granulomatosa	presente	(+)	142,17	98,31

HE- material corado pela Hematoxilina-eosina; IHQ – material submetido a pesquisa do antígeno de Leishmania pela técnica de imuno-histoquímica

Anexo F: Quadro 5 – Dados referentes às contagens de células CMAF+/CD163+ e pSTAT1+/CD68+

n	Caso	Forma da doença	CMAF/CD163 (cél/mm ²)	pSTAT1/CD68 (cél/mm ²)
1	LC03	cutânea	26,89	64,38
2	LC06	cutânea	12,81	22,95
3	LC07	cutânea	26,25	25,97
4	LC19	cutânea	4,85	6,85
5	LC39	cutânea	9,28	50,51
6	LC41	cutânea	17,75	51,28
7	LMC01	Mucocutânea	44,94	103,6
8	LMC04	Mucocutânea	48,82	100,76
9	LMC05	Mucocutânea	5,84	66,66
10	LMC13	Mucocutânea	7,48	20,46

9. Referências

9. REFERÊNCIAS

- 1 Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 471-8.
- 2 Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*. 2009; 47: 412-23.
- 3 World Health Organization. Leishmaniasis. 2017 [citado em 21 dez. 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- 4 Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014; 69 Suppl 1: S10-8.
- 5 Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 604-15.
- 6 Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, *et al*. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis*. 2012; 12: 75.
- 7 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989; 7: 145-73.
- 8 Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, *et al*. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002; 70: 6734-40.
- 9 Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, *et al*. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*. 2010; 70: 5728-39.
- 10 Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 13: 453-61.
- 11 Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*. 2011; 9: 216.
- 12 Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, *et al*. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. 2013; 121: e57-69.
- 13 Hespanhol RC, de Nazaré C Soeiro M, Meuser MB, de Nazareth S L Meirelles M, Côrte-Real S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53: 35-44.
- 14 Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, *et al*. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: e1684.
- 15 Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, *et al*. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 2925-36.
- 16 Organização Pan-americana da Saúde. Informe epidemiológico das Américas. Leishmanioses. *Informe Leishmaniose*;5: Washington 2017 [citado em 21 dez. 2017]. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34113>
- 17 Brasil. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. 2017 [citado em 21 dez. 2017]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>

-
- 18 Hommel M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J Infect.* 1999; 39: 101-11.
- 19 Sampaio S, Rivitti E. Leishmanioses e outras dermatoses por protozoários. *Dermatologia.* Artes Médicas: São Paulo 2007; 756-64.
- 20 Montenegro J. Anatomopatologia da leishmaniose cutânea (úlceras de Bauru). *An Paul Med Cirurg.* 1924; 15: 5-11.
- 21 Ridley DS, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980; 74: 508-14.
- 22 Portugal H. Contribuição ao estudo da histopatologia da leishmaniose tegumentar. *Ver Méd Cirurg.* 1929; 37: 403-12.
- 23 Convit J, Lapenta P. Sobre un caso de Leishmaniosis tegumentaria de forma disseminada. *Rev Policlín Caracas.* 1948; 17: 153-58.
- 24 Castés M, Tapia FJ. [Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]. *Acta Cient Venez.* 1998; 49: 42-56.
- 25 Bifeld E, Clos J. The genetics of *Leishmania* virulence. *Med Microbiol Immunol.* 2015; 204: 619-34.
- 26 Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science.* 1987; 236: 551-7.
- 27 Roy S, Kumar GA, Jafurulla M, Mandal C, Chattopadhyay A. Integrity of the actin cytoskeleton of host macrophages is essential for *Leishmania donovani* infection. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1838: 2011-8.
- 28 Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 2015; 10: 111-29.
- 29 Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 551-61.
- 30 Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007; 81: 1-5.
- 31 Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003; 11: 210-4.
- 32 Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, *et al.* *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol.* 2016; 309: 7-18.
- 33 von Stebut E, Tenzer S. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol.* 2017.
- 34 Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 143-8.
- 35 Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, *et al.* CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2006; 193: 1313-22.
- 36 Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420: 502-7.
- 37 Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med.* 2004; 200: 201-10.
- 38 Rodriguez-Pinto D, Navas A, Blanco VM, Ramírez L, Garcerant D, Cruz A, *et al.* Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e1627.
-

-
- 39 Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 762-74.
- 40 Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med (Berl)*. 2008; 86: 145-60.
- 41 Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, *et al*. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci*. 2007; 98: 874-81.
- 42 Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, *et al*. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun*. 2009; 77: 1465-74.
- 43 Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002; 23: 549-55.
- 44 Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 953-64.
- 45 Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, *et al*. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res*. 2009; 69: 9395-403.
- 46 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 133-46.
- 47 Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. 2005; 23: 344-6.
- 48 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25: 677-86.
- 49 Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006; 177: 7303-11.
- 50 Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS*. 2004; 112: 481-95.
- 51 Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16: 593-609.
- 52 Strieter RM, Belperio JA, Burdick MD, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis relevant to chronic fibroproliferation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4: 23-6.
- 53 Szekanecz Z, Koch AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2001; 13: 202-8.
- 54 Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15: 749-95.
- 55 Ezekowitz RA, Gordon S. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. *Contemp Top Immunobiol*. 1984; 13: 33-56.
- 56 Mosser DM, Handman E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol*. 1992; 52: 369-76.
- 57 Gruenheid S, Gros P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr Opin Microbiol*. 2000; 3: 43-8.
- 58 Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J Interferon Res*. 1989; 9: 329-37.

-
- 59 MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 323-50.
- 60 Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992; 176: 287-92.
- 61 Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J Virol.* 1998; 72: 7642-7.
- 62 Hart PH, Burgess DR, Vitti GF, Hamilton JA. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. *Blood.* 1989; 74: 1222-5.
- 63 Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, Burger D, Dayer JM. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J Immunol.* 2000; 164: 5952-60.
- 64 Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, *et al.* Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaG-H3. *Scand J Immunol.* 2001; 53: 386-92.
- 65 Töröcsik D, Bárdos H, Nagy L, Adány R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2132-9.
- 66 Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 1101-4.
- 67 Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001; 167: 6533-44.
- 68 Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I. *J Exp Med.* 1998; 188: 217-22.
- 69 Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000; 67: 508-14.
- 70 Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002; 72: 101-6.
- 71 Anderson CF, Mosser DM. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* 2002; 168: 3697-701.
- 72 Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 23-35.
- 73 Goerdts S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 1999; 10: 137-42.
- 74 Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem.* 1992; 267: 23301-8.
- 75 Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67: 201-12.
- 76 Ehrchen J, Steinmüller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, *et al.* Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood.* 2007; 109: 1265-74.
- 77 Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 2011; 11: 2391-402.
-

-
- 78 Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One*. 2013; 8: e80908.
- 79 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 958-69.
- 80 Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008; 181: 3733-9.
- 81 Myler P, Fasel N. *Leishmania* after the genome. Norfolk: Caister Academic Press 2007.
- 82 Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. 1990; 144: 4794-7.
- 83 Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania* major through the induction of nitric oxide. *J Immunol*. 1990; 145: 4306-10.
- 84 Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rölinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002; 70: 4638-42.
- 85 Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA, Barral-Netto M, et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 979-83.
- 86 Sotto MN, Halpern I, Kauffman MR, Pagliari C. Factor XIIIa+ dermal dendrocyte parasitism in American tegumentary leishmaniasis skin lesions. *Am J Dermatopathol*. 2010; 32: 15-8.
- 87 Halpern I. Células dendríticas plasmocitóides, dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos, macrófagos e expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase na resposta tecidual cutânea da leishmaniose tegumentar americana [tese]. Universidade de São Paulo: Faculdade de Medicina 2012; 128.
- 88 Farrow AL, Rana T, Mittal MK, Misra S, Chaudhuri G. *Leishmania*-induced repression of selected non-coding RNA genes containing B-box element at their promoters in alternatively polarized M2 macrophages. *Mol Cell Biochem*. 2011; 350: 47-57.
- 89 Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*. 2009; 158: 638-51.
- 90 Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, Abebe T, et al. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e480.
- 91 Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol*. 2004; 20: 126-33.
- 92 Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, et al. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol*. 2005; 174: 6561; author reply 61-2.
- 93 Dasgupta P, Keegan AD. Contribution of alternatively activated macrophages to allergic lung inflammation: a tale of mice and men. *J Innate Immun*. 2012; 4: 478-88.
- 94 Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res*. 2004; 94: 119-26.

-
- 95 Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, *et al.* Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*. 2000; 12: 1312-21.
- 96 Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*. 2005; 210: 153-60.
- 97 Davis BH, Zarev PV. Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005; 63: 16-22.
- 98 Moestrup SK, Møller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med*. 2004; 36: 347-54.
- 99 Silva RL, Santos MB, Almeida PL, Barros TS, Magalhães L, Cazzaniga RA, *et al.* sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005486.
- 100 Shepherd VL, Campbell EJ, Senior RM, Stahl PD. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. *J Reticuloendothel Soc*. 1982; 32: 423-31.
- 101 Basu N, Sett R, Das PK. Down-regulation of mannose receptors on macrophages after infection with *Leishmania donovani*. *Biochem J*. 1991; 277 (Pt 2): 451-6.
- 102 Noorman F, Barrett-Bergshoeff MM, Bekkers M, Emeis JJ, Rijken DC. Inhibition of mannose receptor-mediated clearance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) by dextran: a new explanation for its antithrombotic effect. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 1249-54.
- 103 Lane KB, Egan B, Vick S, Abdolrasulnia R, Shepherd VL. Characterization of a rat alveolar macrophage cell line that expresses a functional mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 1998; 64: 345-50.
- 104 Straus W. Competition between glycoprotein hormones and horseradish peroxidase for mannose-specific binding sites in cells of endocrine organs. *Histochemistry*. 1983; 78: 289-302.
- 105 Linehan SA, Martínez-Pomares L, Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect*. 2000; 2: 279-88.
- 106 Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002; 111: 927-30.
- 107 Blackwell JM. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunol Lett*. 1985; 11: 227-32.
- 108 Palatnik-de-Sousa CB, Dutra HS, Borojevic R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML). *Acta Trop*. 1993; 53: 59-72.
- 109 Chakraborty R, Chakraborty P, Basu MK. Macrophage mannosyl fucosyl receptor: its role in invasion of virulent and avirulent *L. donovani* promastigotes. *Biosci Rep*. 1998; 18: 129-42.
- 110 Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 66: 319-28.
- 111 Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122: 794-801.
- 112 Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willis AC, *et al.* A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol*. 1993; 23: 2320-5.
-

-
- 113 Högger P, Dreier J, Droste A, Buck F, Sorg C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J Immunol.* 1998; 161: 1883-90.
- 114 Schaer DJ, Boretti FS, Hongegger A, Poehler D, Linnscheid P, Staeger H, *et al.* Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics.* 2001; 53: 170-7.
- 115 Schaer DJ, Boretti FS, Schoedon G, Schaffner A. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol.* 2002; 119: 239-43.
- 116 Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003; 25: 107-12.
- 117 Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol.* 1995; 34: 474-9.
- 118 Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 1996; 84: 188-94.
- 119 Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schrieffer A, *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105: 438-44.
- 120 Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19: 454-9.
- 121 Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2517-25.
- 122 Barros MH, Segges P, Vera-Lozada G, Hassan R, Niedobitek G. Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. *PLoS One.* 2015; 10: e0124531.
- 123 Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013; 229: 176-85.
- 124 Stahl P, Schlesinger PH, Rodman JS, Doebber T. Recognition of lysosomal glycosidases in vivo inhibited by modified glycoproteins. *Nature.* 1976; 264: 86-8.
- 125 Leteux C, Chai W, Loveless RW, Yuen CT, Uhlin-Hansen L, Combarous Y, *et al.* The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin. *J Exp Med.* 2000; 191: 1117-26.
- 126 Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, *et al.* Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science.* 2002; 295: 1898-901.
- 127 Soeiro MeN, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MeN, Araújo-Jorge TC. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell Struct Funct.* 1999; 24: 139-49.
- 128 Stahl PD. The macrophage mannose receptor: current status. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 2: 317-8.
- 129 Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Roy S, Dalton JE, Kundu S, Sarkar A, *et al.* M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9: e0004145.
-

-
- 130 de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* 2012; 3: 145.
- 131 Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 675-87.
- 132 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The Immune System in Health & Disease. 6ª edição edn. New York: Garland Publishing House Science 2005.
- 133 Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol.* 2005; 174: 3484-92.
- 134 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122: 787-95.
- 135 Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72: 4111-26.