Fernanda Maria Duarte Rodrigues

**Avaliação imunopatológica do sítio de lesão de pacientes
com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por
Leishmania (Viannia) sp, no Estado do Maranhão, Brasil**

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

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

São Paulo

2012

Fernanda Maria Duarte Rodrigues

**Avaliação imunopatológica do sítio de lesão de pacientes
com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por
Leishmania (Viannia) sp, no Estado do Maranhão, Brasil**

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

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Fernanda Maria Duarte

Avaliação imunopatológica do sítio de lesão de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *Leishmania (Viannia) sp.*, no estado do Maranhão, Brasil / Fernanda Maria Duarte Rodrigues. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Carlos Eduardo Pereira Corbett.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Resposta imune celular 3.Linfócitos T reguladores 4.Citocinas 5.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-336/12

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Júlia, à minha madrinha Júlia e minhas irmãs, Luciana e Telma, pelo incentivo, ajuda e confiança que depositaram em mim. Muito Obrigada.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo P. Corbett, exemplo de dedicação à ciência e ética, pela orientação e pela oportunidade que me proporcionou de conhecer um pouco mais sobre o Universo Acadêmico.

À Profa Dra Cláudia Gomes, pela paciência, amizade e pelas sugestões enriquecedoras.

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, pela ajuda, pela amizade, apoio, convivência feliz no período que fiquei no LIM50.

Ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira pelo auxílio neste trabalho e sugestões que complementaram ainda mais este trabalho.

Ao Dr. Luiz Felipe Passero, pela ajuda incansável nos momentos mais críticos deste trabalho, paciência, amizade e carinho. MUITO OBRIGADA!

À Profa Patrícia Braga pela realização das análises estatísticas e por ajudar incansavelmente nas minhas dúvidas frequentes.

À Joyce, por todos esses anos de excelente convívio e por me ajudar muito, sempre. Obrigada!!

Aos amigos que fiz no LIM50, importantes para a conclusão desse trabalho: Bruno, Carol, Eduardo, Fernanda, Izildinha, Kely e Mariana.

À Thaíse, pela amizade, pelo apoio e ajuda, principalmente, na reta final. MUITO OBRIGADA!!!

Aos funcionários do LIM50: Dra. Vânia da Matta, Edson Tadeu, Lia Negrão. Muito obrigada pela ajuda de vocês, nunca vou esquecer!

Aos meus queridíssimos amigos Margareth FC Pádua, Sueli Yoshida, Claudia Rizzi, Priscila Vautier, Leonel C Costa, Érika Nakaira, por entenderem minhas oscilações de humor, minhas ausências e apoiarem essa etapa da minha vida. MUITO OBRIGADA!!

Aos funcionários da seção de Pós-graduação do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana	2
1.2.	Transmissão da LTA	6
1.3.	Formas Clínicas da LTA	9
1.4.	Resposta Imune da LTA	13
2.	OBJETIVOS	24
2.1.	Objetivo geral	25
2.2.	Objetivos específicos	25
3.	MÉTODOS	26
3.1.	Pacientes	27
3.2.	Coleta de Biópsias	28
3.3.	Identificação dos parasitas isolados dos pacientes	28
3.4.	Análise Histopatológica	30
3.5.	Análise Imunoistoquímica	30
3.5.1.	Anti-CD68 (clone KP1/ Dako Cytomation M0814)	31
3.5.2.	Anti-Lisozima (A0099/Dako Cytomation)	32
3.5.3.	Anti-CD1a (clone 010/Dako Cytomation)	33
3.5.4.	Anti-Fator XIIIa (CM 357-Biocare Medical, clone E980.1)	33
3.5.5.	Anti-CD4+ (OPD4/Dako Cytomation)	34
3.5.6.	Anti-CD8+ (CD8/144 Dako Cytomation)	35
3.5.7.	Anti-Foxp3 (H-190, Santa Cruz)	36
3.5.8.	Anti- IL-10+ (MAB 217/ROD)	37
3.5.9.	Anti-TGFβ-1 (Sc-146/Santa Cruz)	37
3.5.10.	Anti- IFN-γ+ (MAB 285/R&D)	38
3.6.	Análise quantitativa das células	39

3.7.	Análise estatística dos dados.....	40
4.	RESULTADOS.....	41
4.1.	Aspectos clínico-epidemiológicos dos pacientes	42
4.2.	Análise histopatológica das lesões cutâneas de LTA	43
4.3.	Análise imunopatológica da lesão.....	45
4.4.	Densidade Celular dos Marcadores Imunológicos	48
4.5.	Análise de correlação entre os marcadores imunológicos	51
4.6.	Análise da densidade celular de acordo com espécie de <i>Leishmania</i> causadora da LTA.....	52
4.7.	Análise da densidade celular de acordo com tempo de evolução da LTA	57
4.8.	Análise comparativa entre marcadores imunológicos versus aspectos histológicos.	62
5.	DISCUSSÃO.....	63
6.	CONCLUSÕES	74
7.	ANEXOS	77
7.1.	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP	78
7.2.	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores ou iguais a 18 anos de idade	79
7.3.	ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos de idade.....	80
7.4.	ANEXO D - Ficha Epidemiológica.....	81
8.	REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC - célula apresentadora de antígenos

BSA - Albumina bovina

CAPPesq - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

CD - *cluster of differentiation* (grupamento de diferenciação)

CDd - Célula dendrítica dérmica

CDs - Células Dendríticas

CLs - Células de Langerhans

CTLA-4 - *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*

DAB - Diaminobenzidina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético

ELISA - Teste imunoenzimático

Foxp3 - *forkhead Box protein 3*

G6PD - Glicose 6 Fosfato Desidrogenase

GITR - *glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor-related protein*

H&E - Hematoxilina e Eosina

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IDRM - reação intradérmica de Montenegro

IFN-γ - Interferon gama

IL - Interleucina

LCAD - Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa

LCDB - Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LIM50 - Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas - 50

LM - Leishmaniose Mucosa

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

MHC-I - complexo principal de histocompatibilidade de classe 1

MHC-II - complexo principal de histocompatibilidade de classe 2

NK - Célula *natural killer*

OH⁻ - Radical Hidroxila

PBS - tampão salino fosfatado

PBS Tween 20 - tampão salino fosfatado com 0,05% Tween 20

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PMN - Células polimorfonucleares

RNA_m - RNA (ácido ribonucleico) mensageiro

TBS - Tampão TRIS

TGF-β - fator de crescimento tumoral beta

Th - resposta T auxiliar

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

Tr1 - Células T regulatórias do tipo 1

Treg - Célula T regulatória

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da LTA no Velho e Novo Mundos.	3
Figura 2 - Distribuição de casos confirmados de LTA por regiões do Brasil. 3	
Figura 3 - Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> sp, causadoras da LTA no Brasil.	5
Figura 4 - (A) Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> e (B) Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no interior de macrófagos.....	7
Figura 5 - Ciclo evolutivo dos parasitas pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i>	8
Figura 6 - Aspectos clínicos e histopatológicos da LTA. (A e B) Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), (C e D) Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB).....	11
Figura 7 - Aspectos clínicos e histopatológicos da LTA. (A e B) Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD), (C e D) Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM)	12
Figura 8 - Resposta imune do hospedeiro veterbrado frente à infecção por <i>Leishmania</i> sp.....	22
Figura 9 - Análise histopatológica de lesão de pele de pacientes com LTA do Maranhão. (A) Infiltrado inflamatório mononuclear, (B) Granuloma epitelióide, (C) Granulomas com células gigantes, (D) Foco de necrose e fibrose.....	45
Figura 10 - Análise imunoistoquímica de biópsias de pele de pacientes com LTA do Maranhão. (A) Células de Langerhans (CD1a ⁺), (B) Células dendríticas da derme (fator XIIIa ⁺), (C) Macrófagos não ativados (CD68 ⁺) e (D) Macrófagos ativados (Lisozima ⁺)	46
Figura 11 - Análise imunoistoquímica de biópsias de pele de pacientes com LTA do Maranhão. (A) Linfócitos T CD4 (CD4 ⁺), (B) Linfócitos TCD8 (CD8 ⁺), (C) Células T regulatórias (Foxp3 ⁺), (D) Células produtoras de IFN γ (IFN- γ ⁺), (E) Células produtoras de TGF- β (TGF- β ⁺) e (F) Células produtoras de IL-10 (IL-10 ⁺).	47
Figura 12 - Densidade de macrófagos não ativados (CD68 ⁺) e ativados (lisozima ⁺) em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil.....	49
Figura 13 - Densidade de Células Dendríticas (CD1a ⁺ e Fator XIIIa ⁺) em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil	50
Figura 14 - Densidade dos linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e Treg em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil.....	50

Figura 15 - Densidade de células produtoras das citocinas TGF- β^+ , IL-10 $^+$ e IFN- γ^+ em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil.....	51
Figura 16 - Densidade de macrófagos não ativados e ativados (CD68 $^+$ e Lisozima $^+$) (A e B), células dendríticas (CD1a $^+$ e fator XIIIa $^+$) (C e D) e Linfócito T (CD4 $^+$ e CD8 $^+$) (E e F) em lesão de pacientes com LTA, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil.....	54
Figura 17 - Densidade de células Foxp3+, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil.	55
Figura 18 - Densidade de células produtoras de TGF- β em biópsias de pele de pacientes, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil.....	56
Figura 19 - Densidade de células produtoras de IL-10 e IFN- γ em biópsias de pele de pacientes, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil.....	56
Figura 20 - Densidade de macrófagos: (A) Ativados (Lisozima $^+$) e (B) Não ativados (CD68 $^+$), em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.	58
Figura 21 - Densidade de células dendríticas: (A) Células de Langerhans (CD1a $^+$) e (B) Células Dendríticas da Derme (fator XIIIa $^+$), em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.....	59
Figura 22 - Densidade de linfócitos T (CD4 $^+$ e CD8 $^+$) e Células Treg Foxp3 $^+$ em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.....	60
Figura 23 - Densidade de células produtoras de citocinas (TGF- β , IL-10 e IFN- γ) em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes com LTA, oriundos do Estado do Maranhão.....	43
Tabela 2 - Densidade celular dos marcadores imunológicos dos pacientes com LTA, oriundos do Estado do Maranhão.....	48
Tabela 3 - Densidade celular dos marcadores imunológicos em lesão de pacientes com LTA dos pacientes com LTA oriundos do Estado do Maranhão, de acordo com a espécie infectante.....	53
Tabela 4 - Densidade Celular dos marcadores imunológicos, de acordo com o tempo de evolução da doença, dos pacientes com LTA oriundos do Estado do Maranhão.....	57

Resumo

Rodrigues, FMD. Avaliação imunopatológica do sítio de lesão de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *Leishmania (Viannia) sp*, no Estado do Maranhão, Brasil. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, crônica, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A interação entre a espécie de *Leishmania* e os mecanismos da resposta imune do hospedeiro resulta em um amplo espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas na infecção humana. No Brasil, esta endemia representa um sério problema de saúde pública, sendo o estado do Maranhão responsável por 13% da casuística nacional. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil imunopatológico de lesões cutâneas de 22 pacientes com LTA, causada por *Leishmania (Viannia) sp*, oriundos do estado do Maranhão. A reação de imunoistoquímica em biópsias de pele foi realizada empregando os anticorpos monoclonais anti-humano CD68, CD1a, fator XIIIa, CD4, CD8, IL-10 e IFN- γ e os anticorpos policlonais anti-Lisozima, Foxp3 e TGF- β . A análise histológica das lesões demonstrou a presença de intenso infiltrado inflamatório na derme composto de macrófagos, linfócitos e plasmócitos com formação de granuloma na maioria dos casos. Formas sugestivas de *Leishmania* foram observadas em 90,9% dos casos examinados. A análise imunoistoquímica mostrou densidade superior de macrófagos ativados (4824,0 células/mm²) quando comparados aos não ativados 3458,9 células/mm²). Foi detectada densidade de células de Langerhans (CD1a⁺) de 310,4 células/mm² na epiderme e células dendríticas dérmicas (fator XIIIa⁺) de 633,6 células/mm² na derme. Foi verificada ainda, predominância de linfócitos T CD8⁺ (2374,1 células/mm²) em relação a T CD4⁺ (1267,6 células/mm²). A densidade de células Treg Foxp3⁺ foi de 301,3 células/mm². A análise de correlação mostrou correlação positiva entre células TGF- β ⁺ e T CD8⁺ e fator XIIIa⁺; e uma correlação negativa entre a densidade de células IFN- γ ⁺ e TGF- β ⁺. As lesões de pacientes infectados com *L. (Viannia) sp*, apresentaram maior densidade de células Treg Foxp3⁺, e IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ quando comparadas a de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A densidade de células TGF- β ⁺ mostrou-se semelhante nos dois grupos de pacientes. A avaliação dos marcadores de acordo com o tempo de evolução da doença, não mostrou diferenças entre as densidades de células imunomarcadas. Esses dados indicam que embora exista um perfil imunopatológico associado ao controle da infecção, a presença de uma resposta regulatória no sítio da lesão pode estar relacionada à persistência parasitária.

Descritores: Leishmaniose cutânea, resposta imune celular, Linfócitos T reguladores, citocinas, imunoistoquímica

Summary

Rodrigues, FMD. Immunopathologic evaluation in the lesion site of patients with American Tegumentary Leishmaniasis, caused by *Leishmania (Viannia) sp*, in Maranhão State, Brazil. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a chronic, non contagious, infectious disease caused by different protozoan parasite species of the genus *Leishmania*. The interaction between *Leishmania* species and host response results in a wide spectrum of clinical, histopathological and immunopathological presentations in humans infection. In Brazil, this endemic disease is a serious public health problem and Maranhão State is responsible for 13% of Brazilian cases. The aim of this study was to characterize the immunopathology of lesions from 22 biopsies of patients with ATL, caused by *Leishmania (Viannia) sp*, from Maranhão State. Immunohistochemistry was carried out by incubating skin biopsies with monoclonal mouse anti- human CD68, CD1a, XIIIa factor, CD4, CD8, IL-10 and IFN- γ and polyclonal rabbit's anti- human lysozyme, Foxp3 and TGF- β . Analysis of skin biopsies demonstrated a dense inflammatory infiltrate in the dermis, characterized by the presence of mononuclear cells, mainly lymphocytes, macrophages, plasma cells and granulomas in most samples. Suggestive forms of amastigotes were detected in 90.9% samples observed. Immunohistochemistry showed high levels of activated macrophages (4824.0 cell/mm²) when compared to inactive macrophages (3458.9 cells/mm²). In the epidermis, the densities of Langerhans Cells (CD1a⁺) were 310.4 cells/mm², while in the dermis the densities of dermal dendritic cells (factor XIIIa⁺) were 633,6 cells/mm². High density of CD8 T⁺ lymphocytes (2374.1 cell/mm²) has been found compared to CD4⁺ T lymphocytes (1267.6 cell/mm²). The cellular density of Treg (Foxp3⁺) was 301 cells/mm². Among cell markers there were positive correlations between TGF- β -producing cells and CD8⁺ T lymphocytes and between TGF- β -producing cells and dendritic dermal cells, as well as a negative correlation between TGF- β -producing cells and IFN- γ -producing cells. Patients infected with *L. (Viannia) sp*. presented increased densities of Treg cells and IL-10 and IFN- γ - producing cells compared to *Leishmania (Viannia) braziliensis* infected patients. The density TGF- β ⁺ producing cells was similar in both groups of patients. Evaluation of Immunological markers according time of infection showed no differences in the densities of immunostain cell. Results suggest that the profile of immunopathological response is associated to the control of infection, although the presence of a regulatory response at the site of infection can be responsible to the persistence of parasite in skin.

Descriptors: American cutaneous leishmaniasis, cellular immune response, T-Lymphocytes regulatory, cytokines, immunohistochemistry

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, que acomete diferentes hospedeiros vertebrados, como animais silvestres, domésticos e o homem, ainda que acidentalmente. Os hospedeiros invertebrados são os insetos fêmeas vetores, conhecidos como flebotomíneos (Roberts, 2006). Os agentes etiológicos dessa doença são protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e gênero *Leishmania*, (Ross, 1903; OMS, 2006).

Essa patologia é considerada um problema de saúde pública de caráter endêmico, que acomete, aproximadamente, 1,5 milhões de pessoas em 88 países, espalhados pelos 4 continentes: americano, europeu, asiático e africano; porém somente em 30 países a notificação é compulsória (Figura 1) (BRASIL, 2010).

Figura 1 - Distribuição da LTA no Velho e Novo Mundos. Fonte: OMS 2006

No Brasil, entre os anos de 2001 a 2003, os Estados do Pará, Maranhão e Tocantins, apresentaram 47% do total de casos de LTA detectados no país, (BRASIL, 2010). No tocante ao Estado do Maranhão, entre 2004 e 2008, foram registrados 12.656 casos de LTA, o que corresponde a uma taxa de 37% de casos registrados no Nordeste e 13% no Brasil (Figura 2) (BRASIL, 2009).

Figura 2 - Distribuição de casos confirmados de LTA por regiões do Brasil. Fonte: BRASIL, 2009.

A LTA ocorre em indivíduos de ambos os sexos, sendo mais frequente no sexo masculino (74% dos casos) e em todas as faixas etárias, predominantemente em indivíduos maiores de 10 anos (90% dos casos). Essa doença caracteriza-se pelo comprometimento cutâneo, sendo que a presença de úlceras na pele são as lesões mais observadas nos pacientes (85%), de formato arredondado, com bordas delimitadas e elevadas, com fundo avermelhado e granulações grosseiras que podem curar espontaneamente ou evoluir para o tecido mucocartilaginoso (BRASIL, 2010).

As espécies de *Leishmania* causadoras de LTA pertencem aos subgêneros *Viannia* (Lainson; Shaw, 1987) e *Leishmania* (Ross, 1903); no Brasil, sete espécies estão associadas à essa doença (Figura 3):

- ✓ *Leishmania Viannia braziliensis* (Vianna, 1911),
- ✓ *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Floch, 1954),
- ✓ *Leishmania (Viannia) lainsoni*, (Silveira et al., 1987),
- ✓ *Leishmania (Viannia) shawi* (Lainson et al., 1989),
- ✓ *Leishmania (Viannia) naiffi* (Lainson; Shaw, 1989),
- ✓ *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (Silveira et al., 2002),
- ✓ *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Lainson; Shaw, 1972).

Figura 3 - Distribuição de espécies de *Leishmania* sp, causadoras da LTA no Brasil. Fonte: BRASIL, 2010.

Dentre essa variedade de espécies, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* se destacam, pois apresentam grande potencial patogênico ao homem (Silveira et al., 2008).

O diagnóstico clínico é realizado a partir da observação das lesões que acometem os pacientes infectados associado a anamnese do indivíduo. O diagnóstico laboratorial é realizado através da pesquisa direta do parasita em esfregaço corado por Giemsa, junto com o diagnóstico indireto, representado pelo teste de hipersensibilidade tardia - Intradermoreação de Montenegro, utilizado para avaliação de resposta imune celular. Em laboratórios de referência, a observação histopatológica da lesão (coloração por hematoxilina e eosina, H&E), técnicas de imunoistoquímica, cultivo do

parasita *in vitro* e *in vivo*, exames sorológicos (imunofluorescência e ELISA) e PCR (reação em cadeia da polimerase) são muito utilizados com resultados satisfatórios, pois auxiliam o diagnóstico da doença, diferenciam a espécie causadora da infecção e proporcionam um possível entendimento da imunopatologia da doença (Singh; Sivakumar, 2003).

1.2. Transmissão da LTA

A transmissão da LTA ocorre através da picada da fêmea do flebotomíneo, inseto que pertence à ordem Diptera, Família Psychodidae e Gênero *Lutzomyia* (Lainson et al., 1994).

O parasita *Leishmania* possui um ciclo biológico caracterizado pela presença de duas formas morfológicas: a promastigota (Figura 4A) e a amastigota (Figura 4B). No inseto vetor, a *Leishmania* é encontrada na forma promastigota, flagelada, no tubo digestório; no vertebrado, encontra-se na forma amastigota, no interior de células do sistema imune fagocitário, como macrófagos e monócitos (Alexander et al., 1999).

Figura 4 - (A) Formas promastigotas de *Leishmania* e (B) Formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos. Fonte: BRASIL, 2010

O inseto fêmea do flebotomíneo se infecta após exercer o hematofagismo em vertebrados e ingerir macrófagos com formas amastigotas; no intestino do vetor. No intestino do inseto, estas formas se diferenciam em promastigotas, multiplicam-se e migram para a prosbóscida do inseto. Em seguida, ao praticar o repasto sanguíneo, regurgita na pele do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas infectantes, as quais serão fagocitadas por macrófagos, que poderão eliminar o parasita, via mecanismos leishmanicidas. Parasitas resistentes a tais mecanismos permanecerão no interior dessas células, onde se multiplicarão por divisão binária até ruptura da célula fagocitária (Figura 5) (Almeida et al., 2003).

Figura 5 - Ciclo evolutivo dos parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*. Fêmeas de flebotomíneos infectadas com *Leishmania* ao exercerem seu hematofagismo, transmitem a infecção ao hospedeiro vertebrado (1), formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos (2) e se transformam em amastigotas (3), se multiplicam por divisão binária simples até a ruptura dos macrófagos (4). Após novo repasto sanguíneo em hospedeiro infectado (5), fêmeas de flebotomíneos ingerem células parasitadas, que no seu sistema digestório, liberam as formas amastigotas (6), que se diferenciam em formas promastigotas (7), se multiplicam e podem infectar novo hospedeiro suscetível. Fonte: Adaptado de Kaye, 2011.

1.3. Formas Clínicas da LTA

Os pacientes com LTA podem apresentar desde resistência (assintomáticos), como suscetibilidade (sintomáticos) à doença, apresentando um amplo espectro clínico, caracterizado pelas formas: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB), Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD) e Leishmaniose Mucosa (LM); essas características são dependentes de fatores imunogenéticos do hospedeiro e do agente etiológico (Silveira et al., 2004, Silveira et al., 2009).

A LCL pode ser causada pelas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e é caracterizada pela presença de lesões na pele, que se iniciam a partir da picada do vetor. Estas se apresentam como uma pápula eritematosa e podem evoluir, ainda que lentamente, para formas liquenoide, impetigoide, tuberculosa ou lupoide, nodular, vegetante e ectimatoide (Figura 6A e B). A presença de úlceras com bordas elevadas e tecido de granulação (lesão com borda emoldurada) é frequente nesses casos. Apesar de ser assintomática no início da infecção, a mesma pode evoluir, e a disseminação parasitária pode ocorrer via sanguínea ou linfática e resultar em lesões mucosas (Silveira et al., 1997). A histopatologia das biópsias dessas lesões demonstra que em pacientes infectados por *L. (L.) amazonensis* há um infiltrado de macrófagos densamente parasitados, contudo para indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia* os parasitas no interior dos macrófagos são escassos e há a presença de

linfócitos no infiltrado inflamatório (Magalhães et al., 1986; Moraes; Silveira, 1994).

A forma LCDB apresenta inúmeras lesões ulceradas distribuídas pela pele, longe do sítio de inoculação primária (Figura 6C e D) (Silveira et al., 2008). A resposta imune celular depende da espécie envolvida; assim, em pacientes infectados pelo subgênero *Viannia* é possível observar, na região da derme, a presença de linfócito e plasmócitos com raros macrófagos e parasitas; e em indivíduos infectados por *L. (L.) amazonensis* uma resposta celular T inibida (Silveira et al., 2004).

Figura 6 - Aspectos clínicos e histopatológicos da LTA. (A e B) Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), (C e D) Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB). Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando T. Silveira

A LCAD é causada pela espécie *L. (L.) amazonensis* e apresenta lesões infiltrativas e nodulares. A histopatologia é caracterizada pela presença de um infiltrado denso de macrófagos com inúmeras amastigotas em seu interior, e raros linfócitos e células plasmáticas (Figura 7A) (Pearson et al., 1981, Silveira et al., 2004). A LM, associada a *L. (V.) braziliensis*, compromete a região da mucosa do indivíduo, principalmente a nasal e sua ocorrência se deve, muitas vezes, à evolução da LCL, apresenta como padrões de lesões úlcero-infiltrante, poliposa e terebrante (Figura 7B); a

resposta celular apresenta um intenso infiltrado celular caracterizado por linfócitos, plasmócitos, poucos histiócitos e escassez de parasitas (Magalhães et al., 1986).

Figura 7 - Aspectos clínicos e histopatológicos da LTA. (A e B) Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD), (C e D) Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM). Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira

1.4. Resposta Imune da LTA

A resposta imunológica no homem é complexa e resulta da interação entre parasita e hospedeiro, como fatores de virulência e mecanismos imunológicos que resultam em uma suscetibilidade ou resistência a infecção (Tripathi et al., 2007) (Figura 8).

Após a inoculação das formas promastigotas na derme do homem, instala-se uma resposta inflamatória local, caracterizada, inicialmente, pela ação do sistema complemento, que possui uma atividade lítica importante, uma vez que contribui para a migração de polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos para o sítio de infecção, causando morte parasitária (Laurenti et al., 2004). Estudos mais recentes têm demonstrado que os PMN participam não somente da lise do parasita nessa fase inicial da infecção, como também podem funcionar como células hospedeiras temporárias do parasita (“Cavalo de Troia”), antes de entrarem em apoptose, permitindo a entrada silenciosa da *Leishmania* nos macrófagos com fraca ativação de mecanismos leishmanicidas (van Zandbergen et al., 2004; Rogers et al., 2009).

Os parasitas resistentes escapam dos mecanismos da imunidade inata e são fagocitados por células do sistema fagocitário, como os macrófagos. No interior destas células ativadas, os parasitas, nas formas amastigotas, sofrem a ação de mecanismos leishmanicidas como a produção de óxido nítrico e do estresse oxidativo, como radical hidroxila

(OH⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), pelo fagócito, resultando na eliminação destes (Mauël et al., 1991).

Entretanto, algumas espécies de *Leishmania* ainda persistem no sítio de infecção, através de mecanismos de escape, como a indução da produção de moléculas imunossupressoras, como a citocina TGF-β, capaz de inibir a função do macrófago; e IL-10; capaz de suprimir as citocinas TNF-α e IFN-γ, importantes no controle das infecções por *Leishmania* sp (Ding et al., 1990; Tsunawaki et al., 1988).

Além dos macrófagos, as células dendríticas (CDs), residentes na pele, desempenham um papel importante na patogênese da doença (Sotto et al., 2010). Dentre estas, as células de Langerhans (CLs), localizadas na epiderme, cujo marcador celular é CD1a, possuem a função de processar e apresentar antígenos por endocitose, via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, e ativar resposta imune específica (Xavier et al., 2005; Silveira et al., 2008). Estudos com *Leishmania major* demonstraram que as CLs possuem um papel intermediário entre os macrófagos e as células T, uma vez que estas possuem a capacidade de apresentar os antígenos aos linfócitos T, através da migração da pele aos linfonodos regionais, resultando em ativação destas células (Moll, 1993, Moll et al., 1995). Xavier et al., 2005, observou que pacientes infectados por *L. (L.) amazonensis* apresentavam uma densidade maior de CLs quando comparados aos infectados por *L. (Viannia) sp*. Os autores sugerem uma

modulação da resposta imune por essas células neste último grupo, uma vez que nesses pacientes a resposta é mais exacerbada.

Outra população de célula apresentadora de antígenos de destaque, é a célula dendrítica dérmica (CDd), que constitui um fagócito mononuclear derivado da medula óssea capaz de fagocitar e transportar os antígenos específicos do parasita para o linfonodo regional mais próximo do sítio da infecção. No sítio, a CDd inicia a apresentação de antígenos específicos de *Leishmania* para as células T “naïve” que se diferenciam em CD8⁺ e CD4⁺. Desse modo, a CDd representa uma importante célula apresentadora de antígenos dos parasitas, via MHC-II, com capacidade de estimular a resposta imune inata e modular a resposta imune adquirida de célula T (Zaba et al., 2007; Garg et al., 2007; Soong, 2008). Neste sentido, a CDd parece ter um papel central na imunopatogênese da LTA, uma vez que ela representa o veículo que promoverá o primeiro contato do antígeno do parasita com a resposta imune de célula T (Von Stebut et al., 1998, Lemos et al., 2004). O principal marcador destas células é o Fator XIIIa⁺. Sotto et al., (2010) detectaram um aumento do número CDd Fator XIIIa⁺, em pacientes com LTA em relação à pele normal e constataram ainda, que estas células têm a capacidade de internalizar formas amastigotas de *Leishmania*, participando assim dos mecanismos patogénéticos da doença, atuando também como APC.

O padrão de inflamação apresentado na LTA está associado à presença de células TCD4⁺ e ao perfil de resposta induzida; assim a

resistência à *Leishmania*, observada em camundongos C57BL/6, produz um perfil de resposta Th1, com produção de citocinas, como IFN- γ , que ativam macrófagos a produzir espécie reativas de oxigênio e nitrogênio, como óxido nítrico, causando morte parasitária, e resolução da doença; por outro lado, a suscetibilidade, demonstrado em camundongos BALB/c, resulta em um perfil de resposta Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 e progressão da doença (Tripathi et al., 2007; Mossman; Coffman, 1989). Dentro deste contexto, pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis*, principalmente nas formas LCAD e LCDB, apresentam um perfil de resposta TCD4/Th2, sugerindo uma tendência à supressão da resposta imune celular, enquanto que pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, um perfil TCD4/Th1, com tendência a uma resposta hiperreativa (Silveira et al., 2004).

Nesse sentido, o controle e a manutenção dessas células efectoras ocorrem através da ativação de células T regulatórias (Treg), pelas CDs. O papel das Treg na resposta inflamatória vem sendo amplamente estudado, uma vez que são capazes de modular a resposta inflamatória em Th1 ou Th2 (Yamazaki et al., 2007; Belkaid et al., 2002). As células Treg surgem como mais uma das varias linhagens diferenciadas a partir de células T CD4⁺, quando estas são ativadas por antígenos. Além das linhagens efectoras referidas acima (Th1 e Th2), existem as Th17 e, dentro da linhagem das Treg existem duas subpopulações, Treg naturais e Treg induzidas, que diferem quanto à ativação, especificidade e expressão de receptores (Bluestone; Abbas, 2003; Chen et al., 2011).

As células T regulatórias naturais são timo-dependentes e apresentam o fenótipo $CD4^+CD25^+$. Tais células expressam constitutivamente os marcadores GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor-related protein*) e CTLA- 4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*), contudo a presença do marcador Foxp3 (*forkhead Box protein 3*) está diretamente envolvido no desenvolvimento deste subtipo de célula regulatória. (Cools et al., 2007)

As células T regulatórias induzidas se desenvolvem na periferia e são conhecidas como Tr1 e Th3. Tais subpopulações não exercem suas atividades supressoras através de contato celular, mas sim por mediadores imunológicos solúveis (Jonuleit et al., 2001). As células Tr1 são geradas a partir dos linfócitos T $CD4^+$ e podem controlar a ativação de ambas as populações de células T naïves e de memória, também podem suprimir tanto a resposta Th1 quanto Th2. as respostas imunológicas (Groux, 2003). De uma forma similar às Tr1, as células Th3 podem suprimir a resposta Th1 e Th2 (Weiner, 2001), mas suas funções supressoras não são antígeno específicas e, portanto podem ter um amplo espectro de funções nas doenças inflamatórias, objetivando atingir a homeostasia (Askenasy et al., 2008, Bacchetta et al., 2005).

Na leishmaniose murina, foi demonstrado que a presença de $CD4^+CD25^+$ em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com *L. major* levou a uma reativação da doença, possivelmente por suprimir os mecanismos de controle parasitário, que são mediados pela resposta Th1

(Mendez et al., 2004). Foi demonstrado que em pacientes com LTA causada por *L. (V.) braziliensis* as Treg são encontradas no sítio de infecção em níveis superiores ao encontrados em pacientes-controle (pele normal), reforçando o papel dessas células na modulação das células T CD4⁺, e na inibição de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ (Campanelli et al., 2006, Ji et al., 2005). Em paralelo a esse mecanismo, em lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, as células Treg sintetizam IL-10 e promovem a supressão de proliferação e produção de citocinas por células T efetoras, promovendo persistência parasitária (Carneiro et al., 2009). Outros autores demonstraram também, que a presença de TGF- β no sítio de infecção funciona como um mecanismo de escape da *Leishmania*, uma vez que, promove a inibição da ação macrofágica, através da supressão de mecanismos oxidativos, colaborando deste modo, para a evolução da doença (Reed, 1999, Barral-Netto et al., 1992).

Desta forma, o equilíbrio entre essas subpopulações, células T efetoras e Treg, contribui para uma resposta imune adequada, em contrapartida, um desequilíbrio dessas subpopulações pode levar a patogênese e progressão da doença (de Bôer et al., 2007).

O papel do linfócito T CD8⁺ nas infecções por *Leishmania* ainda não está totalmente esclarecido, provavelmente está associado à produção intensa de IFN- γ e TNF- α , e consequente atividade citolítica, em resposta a persistência parasitária (Bogdan et al., 1990). Atualmente, são reconhecidas duas subpopulações efetoras de linfócitos T CD8⁺, que se distinguem pelo

padrão de citocinas que produzem após encontro com antígeno. Os linfócitos T CD8⁺ citolíticos 1 (Tc1) predominantemente produzem IFN- γ e TNF- α , e são capazes de eliminar células alvo através de perforina ou mecanismos associados à Fas ligante. Os Tc2 produzem principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 e destroem células alvos através da via das perforinas. Embora ambas sejam citotóxicas, parte desta população também pode favorecer a evolução da doença com a produção de citocinas inibitórias da resposta Th1, ou mesmo alterar a responsividade dos macrófagos às citocinas Th1, possivelmente por adquirem um fenótipo regulatório (Acapuzzato et al., 2004). A respeito da função dessa célula, Belkaid et al., 2002 em estudos experimentais com camundongos C57BL/6 infectados com baixas doses de *L. major* demonstraram que a presença tanto de linfócitos TCD4, como TCD8 podem prevenir a reativação da doença. No entanto, em pacientes com LTA, causada por *L. (V.) braziliensis*, um aumento de níveis de linfócitos T CD8 pode estar associado à cura em pacientes com LCL, caracterizando, possivelmente, um papel modulador dessa célula, uma vez que promove o controle da infecção e resolução da infecção (Da Cruz et al., 1994; Coutinho et al., 1998; Rostami et al., 2010). Gaafar et al., (1999) demonstraram também altas densidades destas células infiltrantes na lesão no momento do diagnóstico, e à medida que houve regressão espontânea das lesões, o número dos linfócitos regrediu, indicando um importante papel destes na contenção de lesões primárias causadas por *L. major*. Portanto, estas células tem um papel funcional importante sob algumas condições, e

sua presença ou funcionalidade no sítio de infecção pode variar nas infecções naturais e experimentais.

Dentre as citocinas envolvidas na resposta imune das leishmanioses, foi dado destaque, neste estudo, ao IFN- γ , TGF- β , IL-10.

O controle da infecção por *Leishmania* é dependente da resposta imune mediada por células. Dentro deste contexto, uma citocina importante na resposta imune desencadeada frente à *Leishmania* é o IFN- γ , produzida, principalmente, por células T CD4⁺ do tipo Th1, e por células NK ("*natural killer*"), estimuladas por IL-12. IFN- γ pode modificar alguns parâmetros da imunidade inata e adquirida, pois em macrófagos, esta citocina pode induzir a produção de uma série de compostos leishmanicidas, como o óxido nítrico, e aumentar a expressão de moléculas de MHC, facilitando em conjunto a eliminação do agente infeccioso e uma melhor apresentação de antígenos aos linfócitos (Strehl et al., 2005). Em camundongos resistentes, células TCD4⁺ do tipo Th1 produzem IFN- γ , que ativa a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), levando ao desencadeamento da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (NO) (Bogdan et al., 2000; Brandonisio et al., 2001).

A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do TGF- β . Essa citocina está relacionada com desativação de macrófago, inibição da ação do IFN- γ e redução da expressão de moléculas MHC classe II (Ding et al., 1990). A infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* leva à

produção de TGF- β (Barral Neto et al., 1994). O tratamento *in vivo* com TGF- β em animais resistentes à infecção por *Leishmania* favorece a infecção, mudando o padrão de resposta imune, com o aumento RNA mensageiro (RNAm) para IL-10. Por sua vez, animais susceptíveis, quando tratados com anticorpos monoclonais anti-TGF- β , tornam-se protegidos, apresentando um aumento na expressão de RNAm para IFN- γ nas células dos linfonodos drenantes da lesão (Han et al., 2012; Barral-Netto; Barral, 1994).

A interleucina-10 (IL-10) é outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência da *Leishmania* nessas células. Segundo Couper et al., (2008), IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, capaz de reduzir o dano causado pela resposta imune do tipo Th1; por ser capaz de inibir a atividade das células NK e dos macrófagos, tem potencial para determinar a persistência parasitária no hospedeiro. Esse efeito imunoregulatório ocorre através da inibição da síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) e diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II que resulta na inibição da função dessas células como apresentadoras de antígeno (de Waal Malefyt et al., 1991a; de Waal Malefyt et al., 1991b). Outro efeito importante é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação do macrófago (Bogdan et al., 1990). Células Treg Foxp3⁺, citocinas e outros fatores, incluindo a saliva de flebotomíneos, podem modular, *in vitro*, a expressão de IL-10 (Norsworthy et al., 2004). IL-10 pode provir de uma grande gama de células como TCD4⁺Th1, Células B, Células NK, Células T CD8⁺, dentre outras (Kaye; Scott, 2011).

Figura 8 - Resposta imune do hospedeiro vertebrado frente à infecção por *Leishmania* sp. Após inoculação do parasita, as células apresentadoras de antígenos (APC), processam o antígeno e apresentam para células da imunidade inespecífica, nesta fase participam elementos celulares e humorais. Nos linfonodos regionais, estas células apresentam o antígeno processado, via MHC-II, para os linfócitos T, que podem resultar em uma resposta T CD4⁺Th1, com perfil de resistência ou T CD4⁺Th2, com perfil de suscetibilidade à infecção, de acordo com citocinas sintetizadas localmente; T CD4 pode se diferenciar também em células Treg e Th17 com produção de citocinas específicas para cada subpopulação. A apresentação de antígenos através do MHC-I promove a estimulação dos linfócitos T CD8, que modulam a resposta, promovendo controle e resolução da infecção.

Embora o padrão de resposta imunológica esteja bem estabelecido na LTA, existem ainda muitos aspectos a serem esclarecidos no que diz respeito à imunopatologia da doença causada por espécies do subgênero *Viannia*. Diante disto, o presente trabalho visa fornecer subsídios para uma melhor compreensão da imunopatogênese dessa importante endemia que

acomete várias regiões do Brasil, em particular a pré-Amazônia Maranhense.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o padrão imunopatológico do sítio de lesão de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *Leishmania (Viannia)* sp, no Estado do Maranhão, Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar, através da análise histológica e imunoistoquímica, o padrão inflamatório no sítio de lesão dos pacientes com LTA;
- Avaliar a densidade de Células de Langerhans, células dendríticas dérmicas, macrófagos ativados e não ativados, células TCD4⁺, TCD8⁺, T regulatórias e a expressão de citocinas IL-10, TGF- β e IFN- γ , no sítio de lesão da doença;
- Avaliar a densidade das células imunomarcadas CD1a⁺, Fator XIIIa, CD68⁺, lisozima⁺, T CD4⁺, TCD8⁺, IFN- γ ⁺, TGF- β ⁺ e IL-10⁺ em lesão cutânea de LTA de acordo com a espécie de parasita infectante.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram coletadas 22 biópsias de lesões de cutâneas de pacientes com LTA, oriundos do município de Buriticupu, região pré-amazônica no Estado do Maranhão, atendidos em uma unidade municipal de saúde conveniada com a Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Posteriormente, essas biópsias foram enviadas ao Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM50), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), para avaliação histopatológica e imunoistoquímica.

Esses pacientes foram incluídos neste estudo a partir de resultados clínicos e laboratoriais positivos para *Leishmania*.

Nos exames clínicos foram coletados dados sobre a identidade do paciente, (nome, idade, sexo e residência) e história natural da doença; como, local onde foi infectado, tempo provável de incubação, tempo de evolução da doença, característica morfológica, número e localização das lesões cutâneas e mucosas.

Os exames laboratoriais realizados foram parasitológico direto em esfregaço de exsudato de lesão cutânea e/ou de mucosa corado por Giemsa; imunológico, reação intradérmica de Montenegro (Silveira et al., 1991) e exames histopatológicos.

Os indivíduos com diagnóstico positivo receberam tratamento específico para a doença. A participação desses pacientes foi feita mediante informação de cada procedimento realizado e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para eventual inclusão na pesquisa; além disso, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq nº0485/08).

Foram excluídos pacientes grávidas, pacientes que já estiverem sob regime de tratamento específico e aqueles que recusaram participar do projeto.

3.2. Coleta de Biópsias

O procedimento de coleta das biópsias de lesões cutâneas dos pacientes foi realizado após anestesia local com xilocaína a 2%, e retirada com auxílio de “*punch*” de 2 ou 4 mm. Neste estudo, os fragmentos das biópsias foram usados para os seguintes fins: a) Isolamento e caracterização do parasita; b) Análise histopatológica e imunoistoquímica.

3.3. Identificação dos parasitas isolados dos pacientes

A técnica de identificação de parasitas consistiu em triturar o fragmento em solução salina estéril a 0,9%, a suspensão foi inoculada,

intradermicamente, em dois “hamsters” (*Mesocricetus auratus*) e também semeada em meio de cultura Difco B45 (Walton et al., 1977). A identificação foi baseada no estudo morfológico de amastigotas e promastigotas; no comportamento dos parasitas em infecção experimental na pele do hamster e em meio de cultura; na comparação dos perfis eletroforéticos de isoenzimas de cada parasita isolado com os perfis das cepas de referência das espécies de *Leishmania* conhecidas da região amazônica do Brasil (Miles et al., 1979; Lainson et al., 1982) e pelo teste de imunofluorescência direta utilizando anticorpos monoclonais específicos contra estas espécies de *Leishmania* (Shaw et al., 1989; Hanham et al., 1991).

Nessas amostras, a identificação dos parasitas foi realizada pela reação de PCR. O alvo utilizado foi o gene da enzima Glicose 6 Fosfato Desidrogenase (G6PD), que é capaz de identificar organismos do subgênero *Viannia* e dentre eles, diferenciar a espécie *L. (V.) braziliensis*. O DNA das biópsias foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e então submetido a reação de PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram LVF e ISVC, que amplificaram um fragmento específico de membros do subgênero *Viannia*. Em seguida foi realizado um Semi-Nested PCR, utilizando os oligonucleotídeos ISVC e ISVB para a identificação de organismos pertencentes a espécies *L.(V.) braziliensis* (Lima et al., dados não publicados).

3.4. Análise Histopatológica

Para análise histopatológica, foi retirado de cada biópsia um fragmento para ser fixado em solução formalina neutra (10%, pH 7,2) para posterior desidratação e diafanização, após este processo foram feitos cortes histológicos de 4 µm de espessura para serem corados pela hematoxilina-eosina (H&E) e Giemsa, visando avaliar as alterações histopatológicas das lesões cutâneas da LTA (Silveira et al., 2004; Silveira et al., 2005).

3.5. Análise Imunoistoquímica

O estudo da resposta imune celular das lesões foi realizado com base na análise imunoistoquímica, utilizando-se marcadores celulares CD1a, Fator XIIIa, CD68, anti-lisozima, CD4, CD8, Foxp3, anti- IFN- γ , TGF- β e IL-10 apresentando atividade imunoreativa para células de Langerhans (CL), células dendríticas dérmicas (CDd), macrófagos inativos, macrófagos em atividade produtora de lisozima, linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, Treg Foxp3⁺, IFN γ , TGF- β e IL-10, respectivamente.

Dos fragmentos de biópsia, processados pelas técnicas usuais de histologia, foram obtidos 2 cortes de 4µm coletados em lâminas previamente tratadas com organo-silano (Sigma).

Para a realização da técnica, todos os cortes foram submetidos a desparafinização em xilol quente a 56°C por 10 minutos, através de três banhos de 1 minuto no xilol à temperatura ambiente, seguidos de dois banhos de 1 minuto em álcool 70%, 95% e 99%. Por último, foi realizado banho rápido em água destilada. Em todas as lâminas, um dos cortes foi padronizado como controle negativo, no qual foi adicionado apenas PBS com 1% de BSA.

3.5.1. Anti-CD68 (clone KP1/ Dako Cytomation M0814)

A pesquisa de macrófagos não ativados (CD68⁺) foi realizada através da recuperação antigênica com solução de TRIS-citrato (pH 7,2) em banho-maria a 99°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes a 3%, por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite desnatado (Molico[®], Nestlé) a 6% por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD68 humano (clone KP1/Dako Cytomation, Estados Unidos, diluição 1:400 em PBS com 1% de BSA), “*overnight*” a temperatura de 4°C. Após 3 lavagens (3 minutos cada) com tampão PBS com 0,05% de Tween 20 (pH 7,2), foi adicionado o anticorpo pós-primário polivalente biotilado (Dako Cytomation, K0690) por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako Cytomation, K0690) também por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween 20 (3 vezes por 3

minutos cada), foi feita a revelação com solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemicals, St. Louis, Estados Unidos), por 5 minutos a temperatura ambiente.

3.5.2. Anti-Lisozima (A0099/Dako Cytomation)

Para a identificação de macrófagos ativados imunoreativos, iniciou-se a reação com a recuperação antigênica utilizando-se solução de TRIS-citrato (pH 7,2) em banho-maria a 99°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes a 3%, por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 6% por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de coelho anti-Lisozima humana (Dako Cytomation, CA, Estados Unidos, diluição 1:1600, em PBS com 1% de BSA), “overnight” a temperatura de 4°C. Após 3 lavagens (3 minutos cada) com tampão PBS com 0,05% de Tween 20 (pH 7,2), foi adicionado o anticorpo pós-primário polivalente biotilado (Dako Cytomation, K0690) por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako Cytomation, K0690) também por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween 20 (3 vezes por 3 minutos cada), foi feita a revelação com solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemicals, St. Louis, Estados Unidos), por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.3. *Anti-CD1a (clone 010/Dako Cytomation)*

Para a detecção de células de Langerhans na epiderme, procedeu-se a reação de imunoistoquímica com a recuperação antigênica utilizando solução de TRIS-citrato (pH 7,2) em banho-maria a 99°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes a 3%, por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 6% por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD1a humano (clone 010/Dako Cytomation, diluição 1:20 em PBS com 1% de BSA), “*overnight*” a temperatura de 4°C. Após 3 lavagens (3 minutos cada) com tampão PBS com 0,05% de Tween 20 (pH 7,2), foi adicionado o anticorpo pós-primário Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) também por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween 20 (3 vezes por 3 minutos cada), foi feita a revelação com DAB líquido (DAB, Novocastra, Reino Unido), por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.4. *Anti-Fator XIIIa (CM 357-Biocare Medical, clone E980.1)*

Para recuperação antigênica, foi realizado banho-maria (99°C) em solução de citrato (10 mm/pH 6,0) por 40 minutos. Após isso, foi feita

lavagem em água corrente, água destilada e PBS com Tween (3 vezes por 3 minutos cada). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 10 volumes por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite Molico® a 6% por 20 minutos. Lavagem com PBS com 0,05% de Tween 20 (3 vezes por 3 minutos cada). Os cortes foram incubados após adição do anticorpo monoclonal de camundongo anti-Fator XIIIa humano (CM 357-BIOCARE MEDICAL, clone E980.1, diluição 1:50 em PBS com 1% de BSA) “overnight” a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-Tween 20 (3 minutos cada), as lâminas foram incubadas com anticorpo pós-primário Novolink por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo Novolink por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween (3 vezes de 3 minutos cada), foi feita a revelação com DAB solúvel (Sigma, D8001) por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.5. Anti-CD4+ (OPD4/Dako Cytomation)

Para a realização da análise de células T CD4⁺ nestes pacientes, a etapa da recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor (95°C) por 50 minutos em tampão citrato (10 mM/ pH 6,0) e 20 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes a 3%, diluído em solução constituída de 50% de tampão TBS e 50% de metanol, por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 6% por 20 minutos. Em

seguida, foi realizada a lavagem com TBS com 0,05% de Tween 20 (3 vezes por 3 minutos cada). Os cortes foram incubados “*overnight*” a 4°C, após adição dos anticorpos monoclonal de camundongo anti - CD4 humano (OPD4/Dako Cytomation, CA, Estados Unidos, diluição 1:400 em PBS com 1% de BSA). Em seguida, após 3 lavagens com TBS (3 minutos cada), as lâminas foram incubadas com anticorpo pós-primário Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo Novolink (Novocastra, Reino Unido) TBS (3 vezes por 3 minutos cada), foi feita a revelação com DAB líquido (DAB, Novocastra, Reino Unido), por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.6. Anti-CD8+ (CD8/144 Dako Cytomation)

Para a detecção da população de células T CD8⁺, a etapa da recuperação antigênica foi realizada em banho-maria (99°C) por 40 minutos em tampão TRIS-EDTA (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 9,0). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes a 3%, por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 6% por 20 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem com PBS com 0,05% de Tween 20 (3 vezes por 3 minutos cada). Os cortes foram incubados “*overnight*” a 4°C, após adição do anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD8 humano (CD8/144 Dako Cytomation, CA, Estados Unidos, diluição de 1:100 em PBS com 1% de BSA). Em

seguida, após 3 lavagens com PBS - Tween (3 minutos cada), as lâminas foram incubadas com anticorpo pós-primário Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) também por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween (3 vezes por 3 minutos cada), foi feita a revelação com DAB líquido (DAB, Novocastra, Reino Unido), por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.7. Anti-Foxp3 (H-190, Santa Cruz)

A pesquisa de linfócitos que expressavam Foxp3 foi realizada, iniciando-se a reação de imunoistoquímica pela recuperação antigênica, realizada banho-maria à 99°C em solução de citrato (10 mm/pH 6,0) por 40 minutos. Após isso, foi feita lavagem em água corrente, água destilada e PBS com 0,05% de Tween 20 (3 vezes por 3 minutos cada). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 10 volumes por 5 minutos (4 vezes), seguido de bloqueio com leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 6% por 20 minutos. Lavagem com PBS-Tween (3 vezes por 3 minutos cada). Os cortes foram incubados após adição do anticorpo policlonal de coelho anti-Foxp3 humano (H-190, SC-28705, CA, Estados Unidos, diluição 1:600 em PBS com 1% de BSA) “overnight” a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-Tween (3 minutos cada), as lâminas foram incubadas com anticorpo pós-primário Novolink por 40 minutos, a 37°C, seguido do

complexo Novolink por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween (3 vezes por 3 minutos cada), foi feita a revelação com DAB líquido (DAB, Novocastra, Reino Unido) por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.8. Anti- IL-10+ (MAB 217/ROD)

Para a detecção de células que expressavam IL-10 na derme, a reação de imunoistoquímica se iniciou como referido nos protocolos acima, apenas com as particularidades que seguem:

Foi realizada incubação com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-IL-10 humana (MAB 217, R&D, MN, Estados Unidos, diluição 1:100 em PBS com 1% de BSA), “*overnight*” a 4°C. Em seguida, após 3 lavagens com PBS-Tween (3 minutos cada), as lâminas foram incubadas com anticorpo pós-primário Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) por 40 minutos, a 37°C, seguido do complexo Novolink (Novocastra, Reino Unido, RE7260-K) também por 40 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS-Tween (3 vezes por 3 minutos), foi feita a revelação com DAB solúvel (Sigma, D8001), por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.9. Anti-TGFβ-1 (Sc-146/Santa Cruz)

Para a análise da expressão de TGFβ-1 nestes pacientes, a recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão Pascal (126°C)

por 1 minuto em tampão citrato (10 mM/ pH 6,0) e 20 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 10 minutos em peróxido de hidrogênio (2 vezes) seguido de 3 lavagens em PBS com 0,05% de Tween 20 (3 minutos cada) e bloqueio da avidina e biotina endógena com *Avidin and Biotin Blocking kit* (Vector, Estados Unidos) por 10 minutos cada. Foi adicionado o anticorpo primário policlonal de coelho anti-TGF β -1 humano (Sc-146, CA, Estados Unidos, diluição 1:1000 em PBS com 1% de BSA), "*overnight*" a 4°C. A amplificação e visualização da reação foram feitas com sistema Novolink Max polímero (Novocastra RE7260-K). Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS - Tween (3 vezes por 3 minutos), foi realizada a revelação com DAB solúvel (Sigma, D8001) por 5 minutos à temperatura ambiente.

3.5.10. *Anti- IFN- γ + (MAB 285/R&D)*

Para detecção das células que expressavam IFN- γ ⁺ foi seguido protocolo semelhante ao acima referido com as seguintes variações:

Foi realizada a incubação com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-IFN- γ humana (MAB 285, R&D, MN, Estados Unidos, diluição 1:20 em PBS com 1% de BSA), "*overnight*" a 4°C. A amplificação e visualização da reação foram feitas com sistema Novolink Max polímero (Novocastra RE7260-K). Após lavagem com PBS - Tween (3 vezes por 3

minutos), foi realizada a revelação com diaminobenzidina (DAB) solúvel (D8001-Sigma) por 5 minutos à temperatura ambiente.

Para finalização da metodologia, todas as amostras foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavagem em água corrente e água destilada, seguida de montagem das lâminas com resina e lamínula.

3.6. Análise quantitativa das células

Para contagem das populações de células imunomarcadas foi utilizado sistema de análise de imagem (Zeiss) composto por microscópio AxionVision (Zeiss) acoplado a um Pentium IV, com software Axioskop 2 Plus (Zeiss, San Diego, CA, Estados Unidos). As células foram quantificadas entre cinco a dez campos das biópsias em objetiva de 40×. As células com coloração pardo-acastanhadas foram consideradas imunoreativas. A média do número de células marcadas por campo foi calculada e em seguida determinou-se a densidade da população celular a partir da relação da média das células marcadas pela área (μm^2) quantificada, que foi apresentada em mm^2 .

3.7. Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada, inicialmente, pela descrição das variáveis do estudo. Os resultados foram apresentados em tabelas de frequências para as variáveis qualitativas.

No que tange aos marcadores imunológicos, os resultados dessa avaliação foram armazenados em banco de dados Access e analisados no programa STATA versão 11.0. Foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão. Após verificação de não normalidade, pelo teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, empregou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação das medianas dos marcadores imunológicos (Kirkwood; Sterne, 2003). Em caso de diferença com significância estatística entre os grupos, utilizou-se o teste não paramétrico de Dunn para identificação do(s) grupo(s) distinto(s) dos demais (Neter et al., 1996). Em seguida foram realizados testes de correlação de Spearman entre os valores dos marcadores imunológicos. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos clínico-epidemiológicos dos pacientes

Das 22 biópsias dos pacientes com LTA analisadas, 16 eram de indivíduos do sexo masculino (72,7%) e seis do sexo feminino (27,3%), a idade dos pacientes foi em média de 31,8 anos, variando entre 15 e 62 anos.

A análise das variáveis clínicas mostrou que a maioria dos pacientes apresentava lesão do tipo ulcerada (68,2%) e até duas lesões (81,8) por indivíduo, sendo que apenas um paciente apresentou 25 lesões na forma cutânea/nodular. Foi observado que a maioria dos pacientes apresentava lesão do tipo ulcerada (68,2%) e até duas lesões (68,2%) por indivíduo, sendo que apenas um paciente apresentou 25 lesões. A análise do tempo de evolução da doença demonstrou que 27,3% dos pacientes encontravam-se na fase aguda da doença (≤ 2 meses), enquanto que a maioria dos pacientes (72, 8%) na fase crônica da infecção (> 2 meses). Outro dado importante observado foi a positividade de 100% para a intradermorreação de Montenegro para todos os casos ($n = 20$) nos quais foram realizados essa reação.

A caracterização das espécies causadoras da doença por eletroforese e PCR mostrou que 100% dos indivíduos apresentaram infecção causada pelo subgênero *Viannia*. Sendo que deste universo amostral 31,8% dos indivíduos apresentaram infecção por *L. (V.) braziliensis* (Gomes et al.,

submetido à publicação). A Tabela 1 sumariza os dados dos pacientes acima referidos.

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes com LTA, oriundos do Estado do Maranhão

VARIÁVEIS	n	%
Tipo de lesão		
Cutânea não especificada	2	9
Cutânea nodular	1	4,6
Cutânea ulcerada	18	81,8
Infiltrativa	1	4,6
Número de lesões		
1	10	45,5
2	5	22,7
3	3	13,6
4	2	9,1
5	1	4,6
25	1	4,6
Espécie		
<i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i>	7	31,8
<i>Leishmania</i> (V.) sp.	15	68,2
Tempo de evolução		
≤ 2 meses	6	27,30%
> 2 meses	16	72,8%

4.2. Análise histopatológica das lesões cutâneas de LTA

A análise histopatológica das 22 biópsias, coradas por H&E, da pele dos pacientes com LTA, provenientes do Estado do Maranhão, demonstrou a presença de macrófagos contendo formas arredondadas intracitoplasmáticas sugestivas de *Leishmania* na maioria dos casos analisados (90,9%).

O padrão histopatológico das lesões foi semelhante em todos os casos, caracterizado pela presença de dermoepidermite crônica com acantose irregular do epitélio e hiperplasia pseudoepiteliomatosa; e na região da derme observou-se um intenso infiltrado inflamatório composto de macrófagos, linfócitos e plasmócitos e formação de granuloma. No que se refere à formação de granuloma, os pacientes mostraram grande variedade de respostas, apresentando desde esboço granulomatoso até a presença de granulomas epitelioides bem formados (Figura 9), circunscrito por fibrose. Focos de necrose foram observados em 27% dos casos, sendo que 5 biópsias eram de pacientes em fase crônica da doença, e uma em fase aguda, não sendo este achado dependente da espécie de *Leishmania*.

Figura 9 - Análise histopatológica de lesão de pele de pacientes com LTA do Maranhão. (A) Infiltrado inflamatório mononuclear (H&E 400×). (B) Granuloma epitelióide (H&E 400×). (C) Granulomas com células gigantes (H&E 200×). (D) Foco de necrose e fibrose (H&E 200×)

4.3. Análise imunopatológica da lesão

Na análise imunoistoquímica das biópsias de pacientes com LTA foi possível observar em todos os casos analisados a presença células dendríticas (CD1a⁺ e fator XIIIa⁺) e de macrófagos não ativados (CD68⁺) e ativados (lisozima⁺) (Figura 10), linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células T regulatórias (Foxp3⁺), além de células que expressavam as citocinas IL-10, TFG-β e IFN-γ (Figura 11).

Figura 10 - Análise imunoistoquímica de biópsias de pele de pacientes com LTA do Maranhão. (A) Células de Langerhans (CD1a⁺), (B) Células dendríticas da derme (fator XIIIa⁺), (C) Macrófagos não ativados (CD68⁺) e (D) Macrófagos ativados (Lisozima⁺)

Figura 11 - Análise imunoistoquímica de biópsias de pele de pacientes com LTA do Maranhão. (A) Linfócitos T CD4 (CD4⁺), (B) Linfócitos TCD8 (CD8⁺), (C) Células T regulatórias (Foxp3⁺), (D) Células produtoras de IFN γ (IFN- γ ⁺), (E) Células produtoras de TGF- β (TGF- β ⁺) e (F) Células produtoras de IL-10 (IL-10⁺).

4.4. Densidade Celular dos Marcadores Imunológicos

A tabela 2 apresenta a análise descritiva das densidades de células imunomarcadas das biópsias de pacientes com LTA de células dendríticas (CD1a⁺ e fator XIIIa⁺), macrófagos (lisozima⁺ e CD68⁺) linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células T regulatórias (Foxp3⁺) e células IL-10⁺, TFG-β⁺ e IFN-γ⁺. Como controle, foram utilizados cortes histológicos de pele normal que apresentaram densidades de células imunomarcadas significativamente inferiores para todos os marcadores quando comparadas as dos 22 casos.

Tabela 2 - Densidade celular dos marcadores imunológicos dos pacientes com LTA, oriundos do Estado do Maranhão

MARCADORES IMUNOLÓGICOS	média (dp)	mediana (mín-máx)
CD1a	310,4 (125,3)	276,8 (90,5 - 553,6)
CD4	1267,6 (788,2)	1146,6 (342,2 - 3591,2)
CD8	2374,1 (796,1)	2377,9 (615,6 - 3753,5)
CD68	3458,9 (1167,3)	3317,4 (2001,1 - 6741,3)
LISOZIMA	4824,0 (1351,7)	4565,4 (2847,7 - 7664,5)
FATOR XIIIa	633,6 (154,3)	713 (371 - 784)
Foxp3	301,3 (160,8)	233,5 (109 - 548)
TGF-β	404,9 (151,6)	357 (226 - 825)
IL10	679,1 (119,7)	647,5 (475 - 941)
IFN-γ	231,3 (96,9)	185 (122 - 403)

Quando se analisou, dentro do universo amostral, a presença de macrófagos imunomarcados, foi observada a predominância de macrófagos ativados (4824,0 /mm²) quando comparados aos macrófagos não ativados

(3458,9 /mm²), mostrando uma diferença significativa ($p = 0,0005$), como demonstrado na figura 12.

Figura 12 - Densidade de macrófagos não ativados (CD68⁺) e ativados (lisozima⁺) em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil. *Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Quando se avaliou a presença de células dendríticas nas lesões desses pacientes, observou-se uma densidade de células dendríticas dérmicas (fator XIIIa⁺) na derme de 633,6 /mm², enquanto que a densidade de células de Langerhans (CD1a⁺) se mostrou inferior (310,4 /mm²) na epiderme ($p = 0,0002$), como apresentado na figura 13.

Figura 13 - Densidade de Células Dendríticas (CD1a⁺ e Fator XIIIa⁺) em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil. *Indica diferença estatisticamente significativa entre as células imunomarcadas ($p < 0,05$)

Comparativamente, foi verificada, no sítio da lesão, uma população predominante de linfócitos T CD8⁺ (2374,1 /mm²), seguida de linfócitos CD4⁺ (1267,6 /mm²); a densidade de células Treg apresentou a menor densidade (301,3 /mm²) das populações linfocitárias ($p < 0,0001$) (Figura 14).

Figura 14 - Densidade dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e Treg em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil. *Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A figura 15 mostra que no sítio da infecção cutânea houve uma predominância de células produtoras de IL-10 (679,1 /mm²), seguido por TGF- β (404,9 /mm²) e IFN- γ (231,3 /mm²) ($p < 0,0001$).

Figura 15 - Densidade de células produtoras das citocinas TGF- β^+ , IL-10⁺ e IFN- γ^+ em biópsias de pele de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, Brasil. *Indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os marcadores analisados.

4.5. Análise de correlação entre os marcadores imunológicos

Foi realizada a análise da correlação entre os marcadores imunológicos, através do teste de correlação de Spearman. Nesta análise, foi verificada uma correlação positiva entre a densidade de células produtoras de TGF- β com linfócitos T CD8⁺ ($r_s = 0,666$, $p = 0,009$) e células dendríticas (fator XIIIa⁺) ($r_s = 0,900$, $p = 0,037$). Também foi possível observar uma correlação negativa entre a densidade de células que expressaram IFN- γ com células TGF- β^+ ($r_s = -0,900$, $p = 0,037$).

4.6. Análise da densidade celular de acordo com espécie de *Leishmania* causadora da LTA

Na análise da densidade das células imunomarcadas levando-se em consideração a espécie de *Leishmania*, observou-se que as maiores densidades de células Treg Fox P3⁺ ($p = 0,003$) e células IL-10⁺ ($p = 0,017$) e INF- γ ⁺ ($p = 0,034$) foram apresentadas pelos pacientes infectados com *L. (Viannia) sp* (Tabela 3).

Tabela 3 - Densidade celular dos marcadores imunológicos em lesão de pacientes com LTA dos pacientes com LTA oriundos do Estado do Maranhão, de acordo com a espécie infectante.

RESPOSTA IMUNOLÓGICA	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>		<i>L. (Viannia) sp</i>		p-valor
	Média (dp)	Mediana (mín-máx)	Média (dp)	Mediana (mín-máx)	
CD1a	305,2 (128,5)	259,7 (18302 - 553,6)	313,0 (128,5)	314,8 (90,5 - 531,1)	0,654
CD4	1563,7 (1135,7)	1600,5 (342,2 - 3591,2)	1129,4 (561,1)	1136,7 (398,7 - 2098,2)	0,549
CD8	2250,2 (918,4)	2378,9 (615,6 - 3753,5)	2431,9 (760,2)	2376,8 (1059,0 - 3704,9)	0,916
CD68	3269,6 (841,9)	3317,4 (2216,2 - 4648,2)	3553,6 (1319,2)	3195,8 (2001,1 - 6741,3)	0,881
Lisozima	4598,5 (1772,5)	3761,9 (2847,7 - 7664,5)	4929,3 (1164,8)	4652,9 (3268,2 - 7288,0)	0,418
Fator XIIIa	771,5 (17,7)	771,5 (759 - 784)	578,4 (149,5)	575 (371 - 729)	0,145
Foxp3	160,5 (39,0)	169 (109 - 195)	357,6 (156,6)	332,5 (169 - 548)	0,003
TGF-β	428,2 (113,9)	411,5 (323 - 567)	395,5 (168,9)	357 (228 - 825)	0,480
IL-10	565,0 (64,7)	578 (475 - 629)	724,8 (105,8)	735 (597 - 941)	0,017
IFN-γ	155,0 (28,9)	167 (122 - 176)	288,5 (89,8)	283 (185 - 403)	0,034

Ao se comparar as densidades de populações celulares de acordo com a espécie causadora de LTA, foi verificado que não houve diferenças significativas entre as populações macrofágicas (ativadas e não ativadas), células dendríticas e linfócitos T CD4 e CD8 (Figura 16). No entanto, observa-se uma tendência a uma maior densidade ($p > 0,05$) de células T CD4⁺ nos indivíduos cuja espécie causadora de LTA era *L. (V.) braziliensis*.

Figura 16 - Densidade de macrófagos não ativados e ativados (CD68⁺ e Lisozima⁺) (A e B), células dendríticas (CD1a⁺ e fator XIIIa⁺) (C e D) e Linfócito T (CD4⁺ e CD8⁺) (E e F) em lesão de pacientes com LTA, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil.

Por outro lado, os pacientes infectados por *L. (Viannia) sp* apresentaram densidade de células Treg significativamente maiores (357,6 /mm²) quando comparada a de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* (160,5 /mm², $p = 0,003$), como mostrado na figura 17.

Figura 17 - Densidade de células Foxp3+, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil. *Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Em relação às citocinas, foi possível observar que os dois grupos *L. (V.) braziliensis* e *L.(V.) sp* apresentaram densidades semelhantes de células produtoras de TGF- β (Figura 18). Contudo, nos grupos infectados por *L. (Viannia) sp*, foram detectadas densidades significativamente maiores de células IL-10⁺ ($p = 0,017$) e IFN- γ ⁺ ($p = 0,034$), quando comparadas ao grupo de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* (Figura 19).

Figura 18 - Densidade de células produtoras de TGF- β em biópsias de pele de pacientes, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil

Figura 19 - Densidade de células produtoras de IL-10 e IFN- γ em biópsias de pele de pacientes, de acordo com a espécie de parasita, no Estado do Maranhão, Brasil. *Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

4.7. Análise da densidade celular de acordo com tempo de evolução da LTA

No que tange ao tempo de evolução da doença, não foi observada diferença com significância estatística ($p > 0,05$) nos marcadores imunológicos de pacientes com a doença na fase aguda quando comparados aos de fase crônica da infecção (Tabela 4).

Tabela 4 - Densidade Celular dos marcadores imunológicos, de acordo com o tempo de evolução da doença, dos pacientes com LTA oriundos do Estado do Maranhão

RESPOSTA IMUNOLÓGICA	≤ 2 meses		> 2 meses		p-valor
	Média (dp)	Mediana (mín-máx)	Média (dp)	Mediana (mín-máx)	
CD1a	248,1 (106,9)	276,8 (90,5 - 352,8)	335,4 (126,5)	358,8 (182,2 - 553,6)	0,186
CD4	1085,8 (512,9)	1002,4 (602,3 - 1702,3)	1335,7 (874,0)	1146,6 (342,1 - 3591,2)	0,685
CD8	2542,6 (970,7)	2531,6 (1342,0 - 3753,5)	2310,9 (746,7)	2377,8 (615,6 - 3704,8)	0,883
CD68	3170,1 (959,0)	3015,7 (2222,3 - 4696,6)	3574,5 (1252,2)	3317,4 (2001,1 - 6741,3)	0,586
Lisozima	4644,0 (1524,2)	4101,3 (3268,2 - 7288,0)	4891,5 (1328,8)	4736,9 (2847,7 - 7664,5)	0,606
Fator XIIIa	619,7 (215,9)	729 (371 - 759)	644 (127,4)	644 (504 - 784)	> 0,999
Foxp3	336 (183,5)	345 (109 - 539)	282 (155,0)	195 (152 - 548)	0,549
TGF- β	361 (127,1)	356 (226 - 567)	429,2 (165,5)	366 (287 - 825)	0,463
IL-10	686,8 (93,3)	706 (575 - 778)	674,9 (137,4)	642 (475 - 941)	0,842
IFN-g	200,7 (87,6)	185 (122 - 295)	254,2 (109,8)	223,5 (167 - 403)	0,724

Como observado na figura 20, o tempo de evolução da lesão não determinou alterações significativas nas densidades de macrófagos ativados (Figura 20A) e não ativados (Figura 20B).

Figura 20 - Densidade de macrófagos: (A) Ativados (Lisozima⁺) e (B) Não ativados (CD68⁺), em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.

A análise das densidades de células de Langerhans, CD1a⁺ e fator XIIIa⁺, também não demonstrou diferenças significativas entre os grupos em fase aguda e crônica da doença (Figura 21A e B).

Figura 21 - Densidade de células dendríticas: (A) Células de Langerhans (CD1a⁺) e (B) Células Dendríticas da Derme (fator XIIIa⁺), em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.

Do mesmo modo, não foi possível encontrar diferenças significativas nas densidades dos linfócitos T CD4 (Figura 22A), CD8 (Figura 22B) e T regulatórias (Figura 22C), levando-se em consideração o tempo de evolução da doença.

Figura 22 - Densidade de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e Células Treg Foxp3⁺ em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.

As densidades das células produtoras de TGF- β (figura 23A), IL-10 (figura 23B) e IFN- γ (figura 23C) também não mostraram diferenças significativas nos diferentes tempos de evolução da doença.

Figura 23 - Densidade de células produtoras de citocinas (TGF- β , IL-10 e IFN- γ) em lesões cutâneas de pacientes com LTA, de acordo com tempo de evolução, no Estado do Maranhão, Brasil.

4.8. Análise comparativa entre marcadores imunológicos *versus* aspectos histológicos.

Foi realizada a comparação entre as densidades dos marcadores imunológicos e os aspectos histopatológicos das lesões dos pacientes deste estudo. Para tal análise, foram considerados os seguintes parâmetros histológicos: ausência, presença e tipo de granuloma, ausência e presença de necrose, ausência e presença de parasitismo e infiltrado inflamatório mononuclear.

A análise comparativa entre os marcadores imunológicos e os diferentes parâmetros histológicos não demonstraram diferenças significativas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A patogênese da LTA é dependente de vários fatores, tais como o perfil imunogenético do hospedeiro, o tipo de antígeno reconhecido pelas células T, características do vetor, o sítio de inoculação do parasita e o tamanho do inóculo, que podem resultar tanto na resolução da doença, como na evolução da infecção (Rogers et al., 2002, Reis et al., 2009). Essa evolução é dependente principalmente da resposta imune celular do hospedeiro e da virulência da espécie de parasita envolvida na infecção, que resulta em um amplo espectro de formas clínicas da doença no indivíduo parasitado, variando de formas polares, como a leishmaniose mucocutânea e anérgica difusa, as formas cutâneo-localizadas, que inclusive em alguns casos pode até mesmo ocorrer a resolução espontânea da lesão (Silveira et al., 2004; Silveira et al., 2008).

Em doenças inflamatórias, a análise imunopatológica vem sendo objeto importante de estudo, pois auxilia não somente no entendimento da patogênese da doença e os mecanismos associados às diferentes manifestações clínicas, como a evolução, resolução e muitas vezes as recidivas de inúmeras infecções que acometem o indivíduo. Essa avaliação direta da lesão, ou seja, *in situ*, possibilita também determinar interações celulares e os mediadores presentes no sítio inflamatório, com maior acurácia nos resultados. Na LTA, a análise do padrão histopatológico no sítio de lesão, pode caracterizar o perfil de resposta imunológica, determinando a suscetibilidade ou resistência do paciente à doença, bem

como o espectro clínico que o indivíduo apresenta (Convit et al., 1993; Follador et al., 2002).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o padrão imunopatológico do sítio de lesões cutâneas de pacientes com LTA causada por espécies do subgênero *Viannia*.

A análise histopatológica das biópsias de pele dos pacientes infectados com *Leishmania* (*Viannia*) sp. apresentou baixo parasitismo e intenso infiltrado inflamatório mononuclear representado por linfócitos, macrófagos, plasmócitos, fibrose e presença de focos de necrose em seis amostras e granulomas do tipo bem formado e em esboço, alguns casos continham células gigantes. Alterações epidérmicas clássicas foram observadas, como hiperplasia pseudoepiteliomatosa com acantose irregular. Estudos prévios demonstraram que amostras analisadas de pacientes infectados por espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, também apresentaram características histopatológicas similares às encontradas neste trabalho (Silveira et al., 1990, 2004; Gutierrez et al., 1991; Bittencourt; Barral, 1991). De acordo com esses autores a presença de granulomas bem organizados e de células gigantes são fatores relacionados à eliminação dos parasitas. Similarmente, a presença de linfócitos na lesão é um fator essencial para modulação da resposta leishmanicida dos macrófagos. A presença de necrose tecidual em algumas biópsias pode estar correlacionada ao infiltrado inflamatório associado à fibrose encontrada na pele dos pacientes com LTA (Moura et al., 2005). Possivelmente a

associação de fatores celulares e teciduais pode estar relacionado ao parasitismo baixo encontrado na pele dos casos de LTA no Maranhão.

A presença de plasmócitos encontrada no sítio da lesão, é uma importante informação para o diagnóstico da LTA, mesmo na ausência de granulomas e amastigotas (Duarte; Rochael, 2006). Durante o processo inflamatório, a diferenciação dos plasmócitos no sítio da lesão pode resultar do processo inflamatório induzido pelo parasita. Neste sentido, Wanasen et al., 2008, demonstraram em camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*, que a expansão clonal de células B, associado aos títulos altos de anticorpos, resulta em ativação das APCs, e consequente recrutamento das células T CD4⁺ e injúria tecidual. Nas amostras analisadas, a presença de plasmócitos conjuntamente com macrófagos e células dendríticas deve estar associada à interação entre imunidade inata e adquirida, promovendo a lesão.

Na análise histopatológica, quando os aspectos morfológicos foram analisados separadamente, tanto em relação à espécie infectante quanto ao tempo de evolução da doença, foi verificado que não houve diferenças significativas nos dois parâmetros. Estudo prévio (Morgado et al., 2008) mostrou que pacientes com LTA, causada por *L. (V.) braziliensis*, apresentaram padrão imunopatológico similares tanto em lesões recentes quanto cicatriciais. Assim a manutenção da inflamação nos casos de LTA analisados, pode estar associada diretamente com a presença de formas sugestivas de amastigotas encontradas na maioria dos casos.

O papel dos macrófagos no controle da LTA é crucial, uma vez que quando ativados, exercem atividade leishmanicida, via expressão de enzimas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, na presença de IFN- γ de origem linfocitária, levando a morte intracelular do parasita (Salaizo-Suazo et al., 1999). Nos casos estudados, houve maior densidade de macrófagos ativados (Lisozima⁺) em comparação aos não ativados (CD68⁺). Em concordância com estes resultados, estudos experimentais em camundongos infectados com *L. major* compararam a ativação de macrófagos em linhagens murinas resistentes e susceptíveis à infecção. Neste caso, os níveis de ativação macrofágica foram superiores nas linhagens murinas resistentes quando comparadas aos das susceptíveis, resultando em um prognóstico melhor da doença (Liew et al., 1991). Em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* foi verificado que a presença destas células ativadas estava associada à cura da lesão, sugerindo um papel essencial do macrófago no controle da infecção. Assim, as maiores densidades de macrófagos ativados na lesão em pacientes com LTA, observados neste estudo, se correlacionou à eliminação do patógeno se correlacionou à eliminação do patógeno, e evolução benéfica da doença ou cicatrização da lesão. Contudo, a presença de macrófagos não ativados no sítio da lesão pode estar associada à persistência parasitária e manutenção da inflamação, como previamente sugerido (Bogdan et al., 1996).

Ao se comparar as densidades de macrófagos ativados e não ativados em relação a espécie infectante e ao tempo de evolução não foi possível encontrar diferenças significantes na densidade destas células.

Na LTA, as células dendríticas também desempenham um papel importante na imunopatologia da doença, uma vez que interagem com componentes da imunidade adquirida, sendo as células de Langerhans (CD1a⁺), as células apresentadoras de antígeno e as células dendríticas da derme (fator XIIIa⁺), importantes na patogenia da doença pois podem fagocitar e albergar os parasitas intracelularmente (Moll et al., 1993, Nogueira et al., 2008). Recentemente, demonstrado por Silveira et al., (2008), que casos de LTA causado por *L. (V.) braziliensis* apresentavam densidades mais baixas de células CD1a⁺ e crescente aumento em direção ao polo hiporreativo da doença (LCAD e LCDB), sugerindo um papel supressor desta população de células dendríticas no desenvolvimento da resposta imunológica. Dentro desse contexto, o papel das CL na regulação da resposta imune tem sido questionado em trabalhos recentes (Moreno 2007, Ritter; Osterloh, 2007). Por outro lado, o acúmulo das células dendríticas dérmicas (fator XIIIa⁺), em condições inflamatórias, como já descrito em outros trabalhos de pacientes com LTA, sugerindo a participação destas células em diferentes mecanismos imunopatológicos, tais como de célula hospedeira, apresentadora de antígenos e efetora (Duarte; Rochael, 2006; Sotto et al., 2010). Evidências experimentais também demonstraram o papel das células dendríticas dérmicas em um melhor prognóstico em infecções causadas por *L. (V.) braziliensis* com melhor prognóstico (Carvalho et al., 2012). Assim, dentre as populações de células dendríticas, as CDd que expressam fator XIIIa, parecem ser as principais moduladoras da resposta imune na LTA. Quando se levou em

consideração a espécie de parasita infectante e tempo de evolução, entre essas populações celulares não foram observadas diferenças significativas.

A análise dos linfócitos T, nas biópsias dos pacientes deste estudo, demonstrou maior densidade da subpopulação T CD8+, que correspondeu a aproximadamente uma vez e meia superior a de T CD4+. Silveira et al., (2004), observaram também, densidades maiores de TCD8⁺ em comparação a TCD4⁺ nas diferentes formas clínicas da LTA, causadas por *L.(V.) braziliensis*. Esses linfócitos são classicamente reconhecidos por sua ação citotóxica, e seu aumento na lesão está associado à eliminação de células infectadas por *Leishmania* sp. Além disso, podem auxiliar na modulação da atividade de células TCD4⁺, promovendo a produção local de IFN- γ e ativação macrofágica, com consequente controle da infecção (Da-Cruz et al., 1994; Hernandez-Ruiz et al., 2006)

Ao se avaliar a densidade da população T CD8+ em relação a espécies infectante e o tempo de evolução não se observou diferenças significativas.

As células Treg “naturais” (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) são outra subpopulação linfocitária descrita na literatura como fundamental na resposta imune a antígenos parasitários. Em relação à densidade de células Treg (Foxp3⁺), foi observado que esta foi menor em relação aos linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. Em relação ao controle de pele normal, essa população celular apresentou valores bem superiores nas lesões dos pacientes com LTA (dados não mostrados). Esses achados corroboram com resultados

obtidos por Campanelli et al., (2006), que observou na análise de lesões de pele de pacientes com LTA, causadas por *L. (V.) braziliensis*, densidade baixas dessas no corte histológico. Em relação ao tempo de evolução da doença, a densidade de Treg (Foxp3⁺) não mostrou diferenças significativas. De Boer et al., (2007), ao observar uma variação desse tipo celular em outras doenças inflamatórias tentou correlacionar com tempo de evolução da doença, contudo, similarmente aos nossos achados, não encontrou associação entre essas variáveis. Contudo, em relação à espécie infectante foi possível observar densidades maiores em pacientes infectados por *L. (Viannia)* sp quando comparados aos infectados por *L. (V.) braziliensis* ($p = 0,003$). As células T regulatórias são componentes importantes para evitar injúrias patológicas causadas por uma resposta inflamatória exacerbada (Aseffa et al., 2002 Belkaid et al., 2006, Carneiro et al., 2009). É reconhecido que espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* induzem uma resposta inflamatória intensa na LTA, por esta razão tornam-se necessários mecanismos moduladores de tal resposta (Campanelli et al., 2006). É possível que, a presença destas células no sítio de lesão, mesmo em baixas densidades, seja responsável pelo controle dessa resposta inflamatória exacerbada.

As células Treg clássicas são capazes de produzir IL-10 e TGF- β , que tem potencial para inibir mecanismos efetores da resposta imune excessiva (Askenasy; Kaminitz; Yarkoni, 2008). Estudos prévios utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) shawi* mostraram que havia uma expressão baixa de IFN- γ associada à expressão alta tanto de IL-10,

como TGF- β , ambas citocinas inibitórias produzidas por células Treg e relacionadas à supressão da resposta imune (Passero et al., 2009; Belkaid et al., 2002, Kane; Mosser, 2001). Portanto, altas densidades de células produtoras de IL-10 e TGF- β podem estar associadas ao controle ou inibição de mecanismos efetores da resposta imune nos pacientes com LCL do nosso estudo.

Comparativamente, foi possível observar uma densidade maior de células que expressam IL-10, seguida de TGF- β e IFN- γ nas lesões. Estes dados sugerem que ambos os mecanismos de controle imunológico são importantes no controle da infecção por espécies do subgênero *Viannia*. De fato, poucos pacientes apresentavam extensiva destruição tecidual na análise histopatológica das biópsias. Quando estas mesmas populações celulares foram analisadas em relação ao tempo de evolução da doença foram observados resultados similares. Porém, pacientes infectados com *L. (Viannia) sp.* apresentaram maiores densidades de células produtoras de IFN- γ e IL-10 quando comparados a aqueles infectados por *L. (V.) braziliensis*. Esta diferença na imunopatologia da lesão se correlaciona, provavelmente, à competência das espécies infectantes. Além disso, estudos experimentais mostraram a coexistência de ambas as citocinas durante o processo de infecção, equilibrando a resposta imune, controlando a infecção, favorecendo o controle da infecção e a persistência parasitária (Anderson et al., 2008).

A importância da produção local dessas citocinas, embora com funções antagônicas, ocorre via modulação da resposta imune local. Neste sentido, em pacientes com LTA, causada por *L. (V.) braziliensis* a presença de IFN- γ , produzidas pelas células T, é essencial para ativação de macrófagos, em contrapartida, a presença de TGF- β e IL-10, sintetizadas pelas Treg, promovem uma supressão da resposta inflamatória, conseqüentemente, auxiliam na inibição da função macrofágica. Esse balanço de citocinas possibilita o equilíbrio da resposta imune, podendo controlar a infecção e promover a persistência parasitária (Katara et al., 2011).

A análise de correlação mostrou uma correlação positiva entre células produtoras de TGF- β com as células TCD8⁺ e células dendríticas dérmicas (fator XIIIa⁺). Estes dados sugerem que o aumento de populações celulares potencialmente lesivas ao parasita (T CD8 e fator XIIIa) deve levar a mecanismos supressores mediados por TGF- β (Yamasaki et al., 2007). O TGF- β produzido pelas células imunomarcadas também deve inibir a produção de IFN- γ produzido por populações linfocitárias (Shull et al., 1992), uma vez que foi observada uma correlação negativa entre células produtoras de TGF- β e IFN- γ .

Assim, as biópsias analisadas neste estudo, de pacientes com LTA, causadas por *L. (Viannia)* sp. apresentaram uma resposta imunopatológica caracterizada pela presença de densidades altas de macrófagos ativados e células dendríticas dérmicas. Por sua vez, tais populações devem ativar

populações linfocitárias, uma vez que, houve predominância dos linfócitos T CD8, que são classicamente reconhecidos por sua capacidade citotóxica. Além disso, as populações de linfócitos T CD4 do subtipo Th1 devem ser estimuladas, uma vez que foram detectadas populações produtoras de IFN- γ . Por outro lado, mesmo com a evidência de um baixo parasitismo, foi mantida uma resposta inflamatória e a persistência da lesão, sugerindo que as populações de células T regulatórias e mecanismos associados à regulação imunológica (TGF- β e IL-10) possam ter um efeito direto na imunopatologia da LTA.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A análise histopatológica das biópsias de pele dos pacientes infectados com *Leishmania (Viannia)* sp apresentou baixo parasitismo e intenso infiltrado inflamatório representado, principalmente, por linfócitos, macrófagos, plasmócitos, presença de fibrose e focos de necrose e granulomas do tipo bem formado e em esboço, com presença de células gigantes. Alterações epidérmicas clássicas foram observadas, como hiperplasia pseudoepiteliomatosa com acantose irregular.

A análise da expressão de células imunológicas apresentou uma densidade maior de células dendríticas da derme em relação as células de Langerhans e de macrófagos ativados quando se comparou a de macrófagos não ativados. A análise de linfócitos T demonstrou uma maior densidade de células T CD8⁺, seguida de TCD4⁺ e T regulatórias, resultado semelhante foi observado para células produtoras de citocinas, que apresentaram uma densidade maior de IL-10⁺, seguida de TGF-β⁺ e IFN-γ⁺ no sítio de lesão.

Em relação à espécie infectante, os casos analisados apresentaram valores maiores de células Treg (Foxp3⁺) e células produtoras de IL-10 e IFN-γ em pacientes infectados por *L. (Viannia)* sp.

A análise do tempo de evolução da doença não demonstrou diferenças significativas entre as densidades entre essas populações celulares analisadas nas lesões cutâneas.

Entre os marcadores detectados no sítio de lesão houve correlação positiva entre células produtoras de $\text{TGF-}\beta^+$ com as células TC8^+ e dendríticas dérmicas (fator XIIIa^+), e negativa com as células produtoras de $\text{IFN-}\gamma^+$.

O perfil imunológico apresentado por esses pacientes sugere que embora exista uma tentativa de controle da infecção e eliminação do parasita; a presença de uma resposta regulatória promove a manutenção do processo inflamatório e persistência parasitária no sítio de infecção.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP

7.2. ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores ou iguais a 18 anos de idade

PROJETO: "INTERAÇÃO DA CÉLULA DE LANGERHANS COM A RESPOSTA IMUNE CD4/CD8 NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA, COM ÊNFASE A ESPÉCIE DE *Leishmania* NA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA"

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (> ou = a 18 anos)

Coordenadora: Profª Drª Mônica Gama E-mail: mgama@elo.com.br Fone: 3227-7460
End: Av Castelo Branco, 605 – São Francisco São Luís/MA CEP: 65.076-090
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa/HU-UFMA: Wildoberto Batista Gurgel
End. do Comitê: R. Barão de Itapary, 227 Centro; Fone: 32191233

Prezado(a) Sr(a), estamos desenvolvendo uma pesquisa que tem o objetivo de identificar algumas características dos agentes que causam a leishmaniose tegumentar em nosso Estado – com isso, poderemos utilizar alguns recursos para o diagnóstico e tratamento mais rápidos e adequados a nossa realidade. Gostaríamos de contar com a sua participação. Você precisará responder algumas perguntas sobre a doença e serão coletados alguns exames que já fazem parte da rotina de avaliação e acompanhamento de casos com leishmaniose tegumentar – esfregaço da ferida, biópsia e um pouco de sangue para vermos alterações causadas pelo agente. Esses exames não trazem riscos maiores e não interferem na evolução da doença. A sua participação não terá nenhum custo. Não terá nenhum problema se quiser se retirar da pesquisa e não haverá nenhuma interferência no atendimento. O(a) senhor(a) poderá deixar de responder a qualquer pergunta que possa causar constrangimento. Agradecemos muito a sua colaboração.

Eu, _____, concordo em participar na pesquisa acima mencionada. Fui esclarecido(a) e entendi as explicações que me foram dadas; darei as informações solicitadas permitindo a coleta dos exames. Durante o desenvolvimento da pesquisa, poderei tirar qualquer dúvida. Não haverá nenhum risco ou desconforto. Poderei desistir de continuar na pesquisa a qualquer momento. Não serão divulgados os dados de identificação pessoal. Não haverá nenhum custo decorrente dessa participação na pesquisa.

O (a) Sr(a) poderá entrar em contato com o comitê de ética para pedir esclarecimentos ou fazer denúncias se necessário.

Local e data _____

Assinatura e carimbo do
Pesquisador responsável

Assinatura do participante
ou Responsável

7.3. ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos de idade

PROJETO: "INTERAÇÃO DA CÉLULA DE LANGERHANS COM A RESPOSTA IMUNE CD4/CD8 NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA, COM ÊNFASE A ESPÉCIE DE *Leishmania* NA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA"

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (menores de 18 anos)

Coordenadora: Profª Drª Mônica Gama E-mail: mgama@elo.com.br Fone: 3227-7460
End: Av Castelo Branco, 605 – São Francisco São Luis\MA CEP: 65.076-090
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa/HU-UFMA: Wildoberto Batista Gurgel
End. do Comitê: R. Barão de Itapary, 227 Centro; Fone: 32191233

Prezado(a) Sr(a), estamos desenvolvendo uma pesquisa que tem o objetivo de identificar algumas características dos agentes que causam a leishmaniose tegumentar em nosso Estado – com isso, poderemos utilizar alguns recursos para o diagnóstico e tratamento mais rápidos e adequados a nossa realidade. Gostaríamos de contar com a participação do(a) seu (sua) filho(a). Você precisará responder algumas perguntas sobre a doença e serão coletados alguns exames que já fazem parte da rotina de avaliação e acompanhamento de casos com leishmaniose tegumentar – esfregaço da ferida, biópsia e um pouco de sangue para vermos alterações causadas pelo agente. Esses exames não trazem riscos maiores e não interferem na evolução da doença. A sua participação não terá nenhum custo. Não terá nenhum problema se quiser se retirar da pesquisa e não haverá nenhuma interferência no atendimento. O(a) senhor(a) poderá deixar de responder a qualquer pergunta que possa causar constrangimento. Agradecemos muito a sua colaboração.

Eu, _____, permito a participação do(a) menor _____ sob minha responsabilidade na pesquisa acima mencionada. Fui esclarecido(a) e entendi as explicações que me foram dadas; darei as informações solicitadas permitindo a coleta dos exames. Durante o desenvolvimento da pesquisa, poderei tirar qualquer dúvida. Não haverá nenhum risco ou desconforto. Poderei desistir de continuar na pesquisa a qualquer momento. Não serão divulgados os dados de identificação pessoal. Não haverá nenhum custo decorrente dessa participação na pesquisa.

O (a) Sr(a) poderá entrar em contato com o comitê de ética para pedir esclarecimentos ou fazer denúncias se necessário.

Local e data _____

Assinatura e carimbo do
Pesquisador responsável

Assinatura do participante
ou Responsável

7.4. ANEXO D - Ficha Epidemiológica

PROJETO: "INTERAÇÃO DA CÉLULA DE LANGERHANS COM A RESPOSTA IMUNE CD4/CD8 NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA, COM ÊNFASE A ESPÉCIE DE *Leishmania* NA IMUNOPATOGÊNESE DA DOENÇA"

FICHA PROTOCOLO

IDENTIFICAÇÃO:

NOME: _____ SEXO: () MASC. () FEM.

IDADE: _____

Ocupação: _____

RESIDÊNCIA ATUAL /TEMPO DE MORADIA: _____

ÁREA ENDÊMICA () sim () não

RESIDÊNCIA ANTERIOR /TEMPO DE MORADIA: _____

ÁREA ENDÊMICA () sim () não

CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA

TEMPO DE DOENÇA _____

PROVÁVEL LOCAL DA INFECÇÃO _____

TEMPO PROVÁVEL DE INCUBAÇÃO _____

TEMPO DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA _____

CARACTERÍSTICAS DA(S) LESÃO(ÕES) _____

NÚMERO _____

LOCALIZAÇÃO _____

CARACTERÍSTICAS

EXAMES LABORATORIAIS

Parasitológico direto em esfregaço de exsudato de lesão _____

Reação intradérmica de Montenegro _____

Histopatológico de lesões _____

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, et al., Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 2004; 113: 963-972.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999; 112Pt 18: 2993-3002.

Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98(7):861-70.

Anderson CF, Lira R, Kamhawi S, Belkaid Y, Wynn TA, Sacks D. IL-10 and TGF- β control the establishment of persistence and transmissible infections produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2008; 180 (6): 4090-4097.

Aseffa A, Gummy A, Launois P, Mac-Donald HR, Louis JA, Tacchini-Corrier F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol.* 2002; 169:3232

Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev.* 2008; 7(5):370-5.

Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD41 regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev.* 2005; 4:491-496.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, et al., Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 1992; 257: 545-48.

Barral-Netto M, Barral A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27(1):1-9.

Belkaid Y, Blank RB, Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev.* 2006; 212:287-300

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420(6915):502-7.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo*

Cruz. 1991; 86(1):51-6. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz.*1991; 86(3):following 378.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Rev. Immunol.* 2003, 3: 253-257.

Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8: 517-525.

Bogdan C, Moll H, Solbach W, Röllinghoff M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol.* 1990; 20: 1131-35.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000; 73:17-26.

Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D, Mitolo V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins *Parasitol.* 2001; 43 Suppl 1:1-6.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana In: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2^a ed, Brasília, 2010.

BRASIL. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação - Maranhão. In: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 2009.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MSF, Mortara RA, Brodskyn CI, Gonçalves HS, Belkaid Y, Barral - Neto M, Barral A. 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 (9): 1313-1322.

Carneiro FP, Magalhães AV, Couto MJAA, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, Sampaio RNR. Foxp3 expression in lesion of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009, 31, 646-651.

Carvalho AK, Silveira FT, Passero LF, Gomes CM, Corbett CE, Laurenti MD. *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunol.* 2012; 34(8-9):395-403.

Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, Deng Z, Yao Z, Tsun A, Li B. Foxp3 and ROR γ t: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 2011; 1(5):536-42.

Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87(4):444-8.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman Z N. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol.* 2007; 89195.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 2008; 180:5771-7.

Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *BrazJ Med Biol Res.* 1998; 31: 139-142.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62(6):2614-8.

de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wal AC et al., Immunohistochemical Analysis of Regulatory T Cell Markers Foxp3 and GITR on CD4⁺CD25⁺T Cells in Normal Skin and Inflammatory Dermatoses. *J Histochem Cytochem.* 2007; 55 (9): 891-898.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991a; 1;174(5):1209-20.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991b; 1,174(4): 915-24.

Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srinivasan S.. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$ inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J Immunol*. 1990; 145:940-4.

Duarte ML, Rochaël MC. Histopathological and immunohistochemical profile of the American cutaneous leishmaniasis with emphasis on FXIIIa+ dermal dendrocytes. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(6):541-8.

Floch, H. *Leishmania tropica guyanensis* n.sp. agent de la leishmaniose tégumentaire des Guyanes et de l'Amérique Centrale. *Archives de l'Institut Pasteur Guyane Française et du Territoire de l'Inini*. 1954;(328) 1-4.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002; 1;34(11):E54-8.

Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, El Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol*. 1999; 91: 314-320.

Garg R, Trudel N, Tremblay MJ. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends Parasitol*. 2007; 23(7):317-24.

Groux, H. Type 1 Tregulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*. 2003; 75:8S.

Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45: 281-89.

Han G, Li F, Singh TP, Wolf P, Wang XJ. The pro-inflammatory role of TGFβ1: a paradox? *Int J Biol Sci*. 2012; 8(2):228-35.

Hanham CA, Zhao P, Shaw JJ, Lainson R. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991; 85: 220-226.

Hernández-Ruiz J, Becker I. CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. *Salud Publica Mex.* 2006; 48(5):430-9.

Inf Imm. 2005; 73 (9): 5827-5834.

Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 2005; 174: 7147-53.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1285.

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001; 166: 1141-47.

Katara GK, Ansari NA, Verma S, Ramesh V, Salotra P. Foxp3 and IL-10 expression correlates with parasite burden in lesional tissues of post kala

azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(5):e1171.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9:604-15.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential Medical Statistics. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2003.

Lainson R, Braga RR, De Souza AA, Pôvoa MM, Ishikawa EA, Silveira FT. *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989; 64(3):200-7.

Lainson R, Shaw JJ, Miles MA, Pôvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVII enzymic characterization of a *Leishmania* from the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Edentata), from Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982; 76: 611-612.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga R, Ishikawa EAI. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 435-443.

Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1989; 64(1):3-9.

Lainson R, Shaw JJ. Taxonomy of the New World *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972; 66(6):943-4.

Lainson R; Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Biology and epidemiology (eds: Peters W & Killick-Kendrick R). *Academic Press Inc.* 1987 (1)1-120.

Laurenti MD, Orn A, Sinhorini IL, Corbett CE. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(3):427-34

Lemos MP, Esquivel F, Scott P, Laufer TM. MHC class II expression restricted to CD8+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *J Exp Med.* 2004; 199(5):725-30.

Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, Salter M, Moncada S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol.* 1991; 21(10):2489-94.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick NA, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Rev Inst Med Trop*. 1986; 28: 253-262.

Mauël J, Corradin SB, Buchmüller Rouiller Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. *Res Immunol*. 1991; 142(7):577-80; discussion 593-4.

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 (2): 201-210.

Miles MA, Póvoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979; 74: 243-252.

Moll H, Flohé S, Röllinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immuno*. 1995; 25(3):693-9.

Moll H. Experimental cutaneous leishmaniasis: Langerhans cells internalize *Leishmania major* and induce an antigen-specific T-cell response. *Adv Exp Med Biol*. 1993; 329: 587-92.

Moraes MA, Silveira FT. Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.1994; 36(5):459-63.

Moreno J. Changing views on Langerhans cell functions in Leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2007; 23(3):86-8

Morgado FN, Schubach A, Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Conceição-Silva F Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis?. *Br J Dermatol*. 2008;158(1):50-8.

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.

Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, J. Noronha A, Barral A, Brodskyn C, Oliveira AI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing, 1996.

Nogueira MF, Sotto MN, Cucé LC. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008; 50(5):283-6.

Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. *Infect Immun*. 2004; 72(3):1240-7.

Organização Mundial da Saúde (World Health Organization) 2006. http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html

Passero LF, Marques C, Vale-Gato I, Corbett CE, Laurenti MD, Santos-Gomes G. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitol Int*. 2010; 59(2):159-65.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1981; 127: 1438-43.

Reed SG. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbes Infect*. 1999; 1 (15): 1313-1325.

Reis LC, Brito ME, Souza MA, Medeiros AC, Silva CJ, Luna CF, Pereira VR. Cellular immune response profile in patients with american tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Anal.* 2009; 23 (1): 63-69.

Ritter U, Osterloh A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2007 Mar;196(1):51-9

Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Medl Bull.* 2006; 75-76: 115-130.

Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 19;209(1):1-7

Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the l-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* 2009; 5(8):e100055.

Ross, R. Further notes on Leishman's bodies. *Br Med J.* 1903; 2 (2239): 1401.

Rostami MN, Keshavarz H, Edalat R, Sarrafnejad A, Shahrestani T, Mahboudi F, Khamesipour A. CD8⁺T Cells as a Source of IFN- γ production in Human Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(10): e845.

Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo RP, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, Pérez-Montfort R, Domínguez JD, Velasco-Castrejón O, Crippa M, Becker I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health*. 1999; 4: 801-811.

Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 783-784.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al., Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-B1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992; 359: 693-99.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania* (Viannia) lindenbergi n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002; (1):43-50.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 525-34.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (3) 239-251.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009; 31 (8) 423-31.

Silveira FT, Lainson R, Gomes C M.C. , Laurenti M D, Corbett C E.P. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102 (11), 1075 - 1080.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, De Souza AA, Ishikawa EA, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991; 85(6):735-8.

Silveira FT, Moraes MA, Lainson R, Shaw JJ. [Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Histopathological aspects of the developmental behavior of the cutaneous lesion induced in *Cebus apella* (Primates: Cebidae) by *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *L.* (*V.*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1990; 32(6):387-94.

Silveira FT, Moraes MAP, Shaw JJ, Lainson R. Pathology and pathogenesis of cutaneous leishmaniasis of man in the Amazon Region of Brazil caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Acta Parasitol Turcica*. 1997; 21 (1): 97-98.

Silveira FT, Müller SR, Souza AA, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CE Review of the pathogenesis of the American tegumentary Leishmaniasis in Amazon, with emphasis to the disease due to *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. *Rev. Para. Med*. 2008; 22 (1): 9-20.

Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* sp.n., a new parasite from the state of Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987; 82: 289-292.

Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*. 2003; 49 (1): 55-60.

Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol.* 2008; 180(7):4355-60.

Sotto MN, Halpern I, Kauffman MR, Pagliari C. Factor XIIIa+ dermal dendrocyte parasitism in American tegumentary leishmaniasis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2010; 32(1):15-8.

Strehl B, Seifert U, Krüger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev.* 2005; 207:19-30.

Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 51 (2): 229-242.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1988; 334, 260-262.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004; 173(11):6521-5.

Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). *Bras Med.* 1911; 25:411

von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med*. 1998; 188(8):1547-52.

Walton BC, Shaw JJ, Lainson R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol*. 1977; 63: 118-1119.

Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol*. 2008; 38(3-4):417-29.

Weiner, HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and TR1 and TH3 regulatory cells. *Nat. Immunol*. 2001; 2:671.

Xavier MB, Silveira FT, Demachki S, Ferreira MM, do Nascimento JL. American tegumentary leishmaniasis: a quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between *L. (L.) amazonensis* and *Viannia* subgenus. 2005; 95(1):67-73.

Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3⁻ precursors. *Blood*. 2007; 110 (13): 4293-4302.

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(9):2517-25.