Kadir Amilcar Gonzalez Carrion

**Caracterização das alterações histopatológicas e da resposta imune
celular em lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea no
Panamá**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Marcia Dalastra
Laurenti

**São Paulo
2020**

Kadir Amilcar Gonzalez Carrion

**Caracterização das alterações histopatológicas e da resposta imune
celular em lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea no
Panamá**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Marcia Dalastra
Laurenti

**São Paulo
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gonzalez Carrion, Kadir Amilcar
Caracterização das alterações histopatológicas e da
resposta imune celular em lesões de pele de
pacientes com leishmaniose cutânea no Panamá / Kadir
Amilcar Gonzalez Carrion. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Marcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Leishmania
3.Imunidade celular 4.Citocinas 5.Inflamassomos
6.Panamá

USP/FM/DBD-187/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho à minha esposa María D. Chen que sempre esteve me apoiando e dando força nos momentos difíceis e esperou pacientemente meu retorno à casa junto com a Holly; e para meus pais Martin e Noemi, obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Eu quero agradecer a Deus por me permitir chegar onde estou agora e estar sempre comigo me dando força e sabedoria.

À minha família, minha esposa María D. Chen que me deu todo seu apoio, amor e compreensão; a meus pais Martín González e Noemí Carrión que me deram seu apoio em minhas escolhas; ao meu irmão Josué González que me deu sua força para seguir adiante e todos meus amigos que não vejo há muito tempo por causa da distância.

A meus amigos do Gorgas, aos Drs. Azael Saldaña e José Calzada, que eu considero meus primeiros mentores na área científica, por me orientar na escolha deste projeto e por todo seu apoio através de todos estes anos desde o começo de minha vida profissional. À Aracelis Miranda, Salomón Puga, Dr. Hector Paz, Vanesa Pineda e para todo o pessoal do Departamento de Parasitologia que me ajudaram direta ou indiretamente com o desenvolvimento do projeto.

Ao pessoal do HST, Dr. Rosendo Diaz, Victor Garcia e os demais colaboradores que ajudaram na fase inicial do projeto.

À minha excelente e querida orientadora, a Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, que eu considero como minha segunda mãe, por todo seu apoio incondicional, sem ela não teria finalizado este trabalho. Tudo o que eu sei agora é por você. Mil agradecimentos.

Aos professores do programa, Dr. Carlos E. Corbett, Dra. Áurea Ferreira, Dr. Luiz Felipe Domingues Passero, Dra. Cláudia Gomes, Dra. Vânia da Matta por todos seus conselhos, ajuda e conhecimento dado durante este tempo. Uma parte de vocês está em mim.

Ao pessoal do LIM-50, Lia Negrão, por seu carinho e ajuda ao longo de todos estes anos, você me ajudou muito para aprender o português e com a parte administrativa da universidade; Thaíse Tomokane por sua amizade e ajuda no laboratório na parte experimental e estatística que me facilitaram a vida; aos colegas do laboratório: Wilfredo, Eduardo, Juliana, Gabriela, Jéssica, Adriana, TB, Karen, Edson e em especial à Carmen e Gaby que me ajudaram muito com a realização dos experimentos e com as dicas de como sobreviver em São Paulo.

À FM-USP, Douglas Bartholomeu, Igor Tolgyesi, Gisele Souza pelo apoio no alojamento e parte administrativa. Muito obrigado.

Às instituições, Hospital Santo Tomás (HST) e o Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) por seu apoio na parte administrativa. Às instituições FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo N° 2014/51404-9, N° 2014/50315-0 e N° 2017/03141-5), IFARHU-SENACYT, CNPq, SNI-SENACYT pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Mil agradecimentos a todos.

Normalização adotada

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos Gerais e Epidemiológicos	2
1.2. Agente Etiológico	4
1.3. Vetor	6
1.4. Reservatórios	7
1.5. Ciclo Biológico.....	9
1.6. Patogenia	11
1.7. Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	11
1.7.1. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL).....	12
1.7.2. Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD)	13
1.7.3. Leishmaniose Mucosa (LM)	13
1.7.4. Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB)	14
1.8. Formas Clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana no Panamá	14
1.9. Diagnóstico Laboratorial da LC no Panamá	15
1.10. Imunidade	17
1.10.1. Imunidade Inata	17
1.10.2. Imunidade Adaptativa	20
1.11. Inflamassoma	26
1.12. Histopatologia da Leishmaniose Cutânea Localizada no Panamá.	27
1.13. Imunidade da Leishmaniose Cutânea por <i>L. (V.) panamensis</i>	28
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Casuística	36

3.2.	Coleta de amostras	38
3.3.	Diagnóstico laboratorial	38
3.3.1.	Imunológico: Teste de Montenegro (IDRM)	38
3.3.2.	Parasitológico: esfregaço e cultura	39
3.4.	Diagnóstico Molecular:	39
3.4.1.	Coleta de amostras e extração de ADN	39
3.4.2.	PCR diagnóstico para <i>Leishmania</i>	40
3.4.3.	PCR Hsp-70	40
3.4.4.	Caracterização de <i>Leishmania</i>	41
3.5.	Análise histopatológica	41
3.6.	Análise Imuno-histoquímica	42
3.6.1.	Análise quantitativa morfométrica das células imunomarcadas	48
3.7.	Análise estatística	48
4.	CAPÍTULO I: ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E	
	DIAGNÓSTICO.....	50
4.1.	Resultados	51
4.1.1.	Aspectos clínicos e epidemiológicos	51
4.1.2.	Diagnóstico laboratorial	52
4.1.2.1.	Diagnóstico imunológico, parasitológico e molecular	53
4.1.2.2.	Diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico	53
4.1.2.3.	Análise da sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos	55
4.2.	Discussão.....	56
5.	CAPÍTULO II: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	58
5.1.	Resultados	59
5.2.	Discussão.....	63
6.	CAPÍTULO III: RESPOSTA IMUNE CELULAR	69
6.1.	Resultados	70
6.1.1.	Análise da resposta imune inflamatória e anti-inflamatória	70
6.1.2.	Análise da Resposta Imune Regulatória	79
6.1.3.	Análise da resposta imune inflamatória Th17	83
6.1.4.	Caraterização do inflamassoma	87
6.2.	Discussão.....	91

7. CONCLUSÃO.....	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9. APÊNDICES	118
9.1. Apêndice I	119
9.2. Apêndice 2.....	121
9.3. Apêndice 3.....	123
9.4. Apêndice 4.....	124
9.5. Apêndice 5.....	125
9.6. Apêndice 6.....	126
9.7. Apêndice 7.....	135

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
μ	micro
%	por cento
°C	graus Celsius
Nº	número
M	mol por litro
mM	milimolar
mm ²	milímetro quadrado
km ²	quilômetro quadrado
mm	milímetro
cm	centímetro
μm	micrômetro
mL	mililitros
μL	microlitros
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Célula dendrítica
CR1	Receptor de complemento 1
CR3	Receptor de complemento 3
CTLA4	Antígeno leucocitário T citotóxico 4
C3b	Fragmento hemoliticamente ativo do complemento
iC3b	Fragmento hemoliticamente inativo do complemento
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FoxP-3	Fator de transcrição forkhead box P3
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos
Gp-63	glicoproteína 63
HE	Hematoxilina- eosina
HP	Histopatologia
HSP-70	<i>Heat shock protein 70</i> (proteína de choque térmico de 70 quilodaltons)
IFN	Interferon
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas de los Estudios de la Salud
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica

IL	Interleucina
kDa	Unidade de massa molecular em quilodalton
(<i>L.</i>)	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LIM50	Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween-20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RoR	Fator de transcrição do receptor órfão relacionado ao retinóide
r_s	Coefficiente de correlação de Spearman
SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	T auxiliar (do inglês: T helper)

TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR2	Receptor tipo 2 do fator de necrose tumoral
T _{reg}	Célula T regulatória
(V.)	<i>Viannia</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa da República do Panamá mostrando distribuição geográfica e intensidade de casos de leishmaniose cutânea no Panamá. Fonte: Departamento de Epidemiologia do Ministério da Saúde do Panamá, OPS, 2018. ----- 3
- Figura 2** - Chave taxonômica de *Leishmania* spp. Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010. ----- 5
- Figura 3** - Flebotomíneo (*Lutzomyia panamensis*). Fonte: Foto do Sr. Roberto Rojas, ICGES, Panamá). ----- 7
- Figura 4** - Alguns dos reservatórios de *Leishmania* encontrados no Panamá. A. *Proechimys semispinosus*, B. *Bradypus variegatus*, C. *Choloepus hoffmanni*, D. *Saguinus geoffroyi*, E. *Aotus trivirgatus* e F. *Didelphis marsupialis*. Fonte: Fotos do Dr. Azael Saldaña, ICGES, Panamá. ----- 8
- Figura 5** - Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de NIH, 2010. ----- 9
- Figura 6** - Lesão característica de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) em pacientes panamenhos. Fonte: Foto do Dr. José Calzada, ICGES, Panamá. ----- 13
- Figura 7** - Esquema de trabalho para coleta e processamento das amostras a partir de lesão cutânea em pacientes panamenhos com LCL. ----- 37
- Figura 8** - Mapa da República do Panamá mostrando a distribuição geográfica das amostras coletadas e a intensidade de casos de LCL no Panamá. Fonte: Departamento de Epidemiologia do Ministério da Saúde do Panamá, 2013. ----- 52

Figura 9 - Caracterização de *Leishmania (V.) panamensis* por PCR/RFLP-HSP70 com a enzima Bcc1. 1. Marcador Molecular de 100 pb. 2. Cepa de referência de *Leishmania (V.) guyanensis*. 3. Cepa de referência de *Leishmania (V.) panamensis*. 4,5,6: Amostras de pacientes com LCL do Panamá.-----53

Figura 10 - Testes moleculares de PCR *Viannia* e Hsp-70. **A:** PCR subgênero *Viannia* (primers LV-B1) que amplifica a região de 750pb do minicírculo das espécies de *Leishmania Viannia*. MM: Marcador molecular de 100pb. CP: Cepa referência de *L. (V.) panamensis*. CN: Controle negativo. **B:** PCR Hsp-70 (*Heat-shock protein 70* genes: primers F25-R1310) que amplifica na região conservada de *Leishmania* sp. de 1422 pb. MM: Marcador molecular de 1kb. CP1: Cepa referência de *L. (V.) panamensis*. CP2: Cepa referência de *L. (V.) guyanensis*. CP3: Cepa referência de *L. (V.) braziliensis*. CN: Controle negativo.-----53

Figura 11 - Cortes histológicos de lesão de pele de pacientes acometidos por LCL evidenciando formas amastigotas de *Leishmania* (setas vermelhas) por HP empregando coloração de hematoxilina-eosina (A) e por imuno-histoquímica corado com DAB (B).-----54

Figura 12 - Corte histológico mostrando formas amastigotas de *Leishmania* dentro dos vacúolos de macrófagos na derme de pacientes afetados por LCL causada por *L. (V.) panamensis* (setas vermelhas). (Coloração com hematoxilina e eosina). -----61

Figura 13 - Seção histológica de parafina da lesão cutânea de paciente afetados por LCL causada por *L. (V.) panamensis* mostrando: A - acantose (seta

preta), B - espongiosis (seta amarela) e exocitose linfocitocítica (seta azul). -----61

Figura 14 - Cortes histológicos mostrando os padrões inflamatórios observados em lesões cutâneas causadas por *Leishmania (V.) panamensis*. A - Padrão inflamatório linfocitocítico intenso e difuso. B - Padrão inflamatório linfoplasmocítico intenso. C - Padrão inflamatório granulomatoso. D - Presença de células gigantes multinucleadas observadas na reação granulomatosa (coloração com Hematoxilina-Eosina). -----61

Figura 15 - Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células CD3+ (A), células CD4+ (B), células CD8+ (C), células CD20+ (D), células CD11c+ (E) e células CD1a+ (F) por imuno-histoquímica. -----72

Figura 16 - Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células CD68+ (A), células iNOS+ (B), células CD56+ (C), células IFN- γ + (D), células IL-13+ (E) e células Granzima B+ (F) por imuno-histoquímica. ---73

Figura 17 - Gráfico em box-plot mostrando os valores da média, mediana, quartis, máximo e mínimo do número de células positivas por milímetro quadrado do marcador IFN- γ em biópsias com presença de granuloma (preto) e ausência de granuloma (vermelho). **p < 0,01 diferença significativa entre a densidade de células positivas de biópsias com presença de granuloma e não granuloma.-----74

Figura 18 - Gráfico em box plot mostrando a média, mediana e quartis da densidade de células imunomarcadas em corte histológico de pele de paciente com LCL causada por *L. (V.) panamensis*. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05, ns: sem diferença significativa entre os grupos celulares.-----75

Figura 19 - Gráfico de correlação entre os marcadores CD4+ e CD8+ com CD3+.

A. Correlação positiva entre CD3+ e CD8+ ($p < 0,001$). B. Correlação positiva entre CD3+ e CD4+ ($p < 0,001$). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----77

Figura 20 - Gráfico de correlação entre os marcadores CD68+ e iNOS+ ($p < 0,001$).

Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----77

Figura 21 - Gráfico de correlação entre os marcadores CD3+, CD4+ e CD56+ com

INF- γ +. A. Correlação positiva entre CD8+ e INF- γ + ($p = 0,001$). B. Correlação positiva entre CD4+ e INF- γ + ($p < 0,001$). C. Correlação positiva entre CD3+ e INF- γ + ($p < 0,001$). D. Correlação positiva entre CD56+ e INF- γ + ($p < 0,001$). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----78

Figura 22 - Gráfico mostrando correlação entre os marcadores CD4+, CD8+ e IL-

10+. A. Correlação positiva e moderada entre os marcadores CD8+ e IL-10+ ($p < 0,001$); B. Correlação positiva e moderada entre os marcadores CD4+ e IL-10+ ($p < 0,001$). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----79

Figura 23 - Gráfico mostrando correlação positiva entre os marcadores CD8+,

Granzima B+, CD4+ e IL-13. A. Correlação positiva e moderada entre os marcadores CD8+ e Granzima B+ ($p < 0,0001$). B. Correlação positiva e moderada entre os marcadores CD4+ e IL-13+ ($p < 0,0001$). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----79

Figura 24 - Corte histológico de lesão de pele de paciente com LCL mostrando células CD4+ (A), células FoxP3+ (B), células IL-10+ (C) e células TGF-β+ (D). Seta vermelha indica célula imunomarcada. -----80

Figura 25 - Gráfico em box-plot mostrando as médias, medianas e quartis das densidades dos marcadores CD4+, FoxP3+, IL-10+ e TGF-β+ em cortes histológicos de pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis*. ****p < 0,0001; ns: sem diferença significativa. -----81

Figura 26 - Gráfico de correlação dos marcadores CD4+, FoxP3+ e IL-10+. A. Correlação positiva entre CD4+ e FoxP3+ (p<0,001); B. Correlação positiva entre FoxP3+ e IL-10+ (p<0,001); C. Não correlação entre FoxP3+ e TGF-β+ (p>0,05). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----82

Figura 27 - Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células CD4+(A), células RoRyt+ (B), células IL-17+, (C), células IL-23+ (D), células IL-6+ (E) e células TGF-β+ (F). Seta vermelha indica célula imunomarcada. -----83

Figura 28 - Gráfico Box Plot mostrando as comparações das médias, medianas e quartis das densidades dos marcadores CD4+, RoRyt+, IL-17+, IL-6+, TGF-β+ e IL-23+ em cortes histológicos de pele de pacientes com leishmanioses cutânea localizada causada por *L. (V.) panamensis*. ****p < 0,0001; ns: sem diferença significativa. -----85

Figura 29 - Gráfico de correlação dos marcadores CD4+, RoRyt+, IL-17+, IL-6+, TGF-β+ e IL-23+. A. Correlação positiva entre RoRyt+ e CD4+ (p<0,0001); B. Correlação positiva entre RoRyt+ e IL-17+ (p=0,01); C. Correlação positiva entre RoRyt+ e IL-6+ (p=0,002); D. Correlação

positiva entre RoR γ t+ e TGF- β + (p=0,02); E. Correlação positiva entre IL-17+ e IL-23+ (p:0,006); F. Correlação positiva entre TGF- β + e IL-6+ (p<0,001). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----86

Figura 30 - Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células IL-1 β + (A), células IL-18+ (B) e células Caspase-1+ (C). Seta vermelha indica célula imunomarcada. -----87

Figura 31 - Gráfico Box Plot mostrando as comparações das médias, medianas e quartis das densidades dos marcadores IL-1 β +, IL-18+ e Caspase-1+ em cortes histológicos de pele de pacientes com leishmanioses cutânea localizada causada por *L. (V.) panamensis*. ****p<0,0001; ** p<0,01. ----88

Figura 32 - Gráfico de correlação dos marcadores IL-1 β +, IL-18+ e Caspase-1+. A. Correlação positiva entre IL-1 β + e Caspase-1+ (p<0,0001); B. Correlação positiva entre IL-18+ e Caspase-1+ (p < 0,0001); C. Correlação positiva entre IL-18+ e IL-1 β + (p = 0,003). Valor de “r” é o coeficiente de correlação de Spearman, e “p” é o Valor p. -----90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros utilizados nas reações de imuno-histoquímica. -----	46
Tabela 2: Sensibilidade e especificidade da IDRM, esfregaço, cultura, PCR <i>Viannia</i> , PCR HSP-70, histopatologia (HP) e imuno-histoquímica (IHQ). -----	55
Tabela 3: Achados histopatológicos observados na epiderme de amostras de tecido cutâneo de pacientes com LCL causada por <i>Leishmania (V.) panamensis</i> no Panamá. -----	62
Tabela 4: Achados histopatológicos observados na derme de pacientes com LCL causada por <i>Leishmania (V.) panamensis</i> no Panamá. -----	62
Tabela 5: Comparação entre as densidades celulares dos diferentes marcadores utilizados para avaliar a resposta imune Th1 e Th2 em pele de pacientes com LCL causada por <i>L. (V.) panamensis</i> e pele saudável, empregada como controle. -----	71
Tabela 6: Comparação entre as densidades celulares dos marcadores utilizados para avaliar a resposta imune T-regulatória na pele de pacientes com LCL causada por <i>L. (V.) panamensis</i> e as densidades celulares dos mesmos marcadores na pele sadia. -----	81
Tabela 7: Comparação entre as densidades celulares dos marcadores utilizados para avaliar a resposta imune Th17 na pele de pacientes com LCL causada por <i>L. (V.) panamensis</i> e as densidades celulares dos marcadores na pele sadia. -----	84
Tabela 8: Comparação entre as densidades celulares dos marcadores utilizados para avaliar o inflamassoma na pele de pacientes com LCL causada por <i>L. (V.)</i> <i>panamensis</i> e as densidades celulares dos marcadores na pele sadia. -----	88

RESUMO

Gonzalez Carrion KA. *Caracterização das alterações histopatológicas e da resposta imune celular em lesões cutâneas de pacientes com leishmaniose cutânea no Panamá* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A leishmaniose é considerada uma doença espectral com múltiplas características clínicas e imunopatológicas em humanos, dependendo das características imunogenéticas do hospedeiro e espécie de parasito. No Panamá, a espécie mais prevalente do parasito é a *Leishmania (Viannia) panamensis*, causadora da Leishmaniose Cutânea (LC), zoonose mais prevalente no país. O pouco conhecimento sobre a patogênese da doença causada por essa espécie, além do aumento da incidência de casos humanos observados em muitas regiões da América, nos levou a estudar os aspectos imunopatológicos da lesão cutânea causada por esta espécie do parasito no Panamá. Desta forma, o principal objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta imune celular, inflamatória e regulatória e os aspectos histopatológicos das lesões de pele na LC em pacientes panamenhos (n=46) utilizando cortes histológicos corados pela HE e processados por imuno-histoquímica (IHQ). A infecção por *L. (V.) panamensis* foi comprovada pelo isolamento e caracterização dos parasitos por HSP70-RFLP. A imuno-histoquímica mostrou ser uma ferramenta complementar para o diagnóstico, melhorando a sensibilidade da análise histopatológica para o encontro de formas amastigotas do parasito. As alterações histopatológicas observadas foram caracterizadas por uma reação inflamatória moderada na derme com predomínio focal com padrões de apresentação linfo-histiocitária, linfo-plasmocitária e granulomatosa; e presença de úlceras, acantose, exocitose e espongiose na epiderme, concordando com os padrões histopatológicos observados pelas espécies causadoras de da forma localizada de LC do subgênero *Viannia*. A resposta imune celular foi caracterizada pelo predomínio de células T produtoras de IFN- γ e IL-10 (CD4 e CD8) e IL-13 (CD4). A participação de CD8 pode estar relacionado ao dano tecidual devido à produção de granzima B. Além disso, observamos a participação de resposta imune celular Th17 e de marcadores que caracterizam a presença do inflamassoma, os quais podem contribuir com a eliminação do parasito, porém sua contribuição para a manutenção do processo inflamatório não pode ser descartada. Resposta T-regulatória associada principalmente à produção de IL-10, controlando a resposta inflamatória exacerbada, também esteve presente. Estes resultados mostram uma resposta imune celular mista nas lesões cutâneas localizadas causadas por *L. panamensis*. Os resultados obtidos contribuem no conhecimento da patogenia da infecção humana causada por *L. (V.) panamensis* e podem auxiliar em futuros estudos sobre esquemas terapêuticos e desenvolvimento de vacinas, contribuindo para os programas de controle dessa importante doença negligenciada.

Descritores: Leishmaniose cutânea; Leishmania; Imunidade celular; Citocinas; Inflamassomos; Panamá.

ABSTRACT

Gonzalez Carrion KA. *Characterization of histopathological changes and cellular immune response in cutaneous lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Panama* [thesis]. São Paulo:” Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Leishmaniasis is considered a spectral disease with multiple clinical and immunopathological characteristics in humans, depending on the host's immunogenic characteristics and parasite species. In Panama, the most prevalent species of the parasite is *Leishmania (Viannia) panamensis*, which causes Cutaneous Leishmaniasis (LC), the most prevalent zoonosis in the country. The few knowledges about the pathogenesis of the disease caused by this species, in addition to the increased incidence of human cases observed in many regions of America, led us to study the immunopathological aspects of the skin lesion caused by this species of the parasite in Panama. Thus, the main objective of this study was to characterize the cellular, inflammatory and regulatory immune response and the histopathological aspects of skin lesions in LC in Panamanian patients (n = 46) using histological sections stained by HE and processed by immunohistochemistry (IHC). Infection with *L. (V.) panamensis* was confirmed by the isolation and characterization of the parasites by HSP70-RFLP. Immunohistochemistry has proved to be a complementary tool for diagnosis, improving the sensitivity of histopathological analysis to find amastigote forms of the parasite. The histopathological changes observed were characterized by a moderate inflammatory reaction in the dermis with focal predominance with patterns of presentation lympho-histiocytic, lymphoplasmacytic and granulomatous; and presence of ulcers, acanthosis, exocytosis and spongiosis in the epidermis, in agreement with the histopathological patterns observed by the species causing the localized form of LC of the subgenus *Viannia*. The cellular immune response was characterized by the predominance of T cells producing IFN- γ and IL-10 (CD4 and CD8) and IL-13 (CD4). The participation of CD8 may be related to tissue damage due to the production of granzyme B. In addition, we observed the participation of Th17 cellular immune response and markers that characterize the presence of the inflammasome, which can contribute to the elimination of the parasite, however its contribution to the maintenance of the inflammatory process cannot be ruled out. T-regulatory response mainly associated with the production of IL-10, controlling the exacerbated inflammatory response, was also present. These results show a mixed cellular immune response in the localized skin lesions caused by *L. (V.) panamensis*. The results obtained contribute to the knowledge of the pathogenesis of human infection caused by *L. (V.) panamensis* and can assist in future studies on therapeutic schemes and development of vaccines, contributing to the control programs of this important neglected disease.

Descriptors: Leishmaniasis, cutaneous; Leishmania; Immunity cellular; Cytokines; Inflammasome; Panamá.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais e Epidemiológicos

A Leishmaniose é uma doença que afeta o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. São causadas por um protozoário digenético pertencente à família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, sendo que a infecção do hospedeiro vertebrado ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, infectadas pelo protozoário (AREND, 2009; LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON, 1998; ROSS, 1903).

A gravidade da doença varia desde lesões cutâneas benignas, até lesões mucocutâneas graves ou infecções viscerais que podem ocasionar a morte do paciente, se não for tratada adequadamente. Essa ampla gama de manifestações clínicas depende, em grande parte, da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e principalmente da resposta imune desencadeada pelo hospedeiro (GALLEGO et al., 2011; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD, 2019; RAMÍREZ et al., 2012).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é uma doença parasitária negligenciada com uma estimativa mundial de 12 milhões de pessoas infectadas em 102 países tropicais e subtropicais. Na América Central, cerca de 20.000 novos casos de LC são relatados anualmente, causando um grande impacto financeiro para os sistemas de saúde pública (GOTO; LINDOSO, 2010; MIRANDA et al., 2012; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD, 2019; WHO, 2017).

No Panamá, a LC é uma das zoonoses parasitárias mais prevalentes, e um grande problema de saúde, com uma estimativa de 3.000 novos casos por ano, sendo provável que este número seja subestimado em cerca de 50% (SAMUDIO et al., 2009).

A distribuição da ocorrência de LC acontece, principalmente, nas regiões das províncias de Bocas del Toro, Panamá, Coclé, Colón, Darién e Veraguas (DUTARI; LOAIZA, 2014; VALDERRAMA; TAVARES; ANDRADE FILHO, 2011) (Figura 1).

Esta infecção está concentrada entre a população marginalizada do Panamá, um fator que leva ao aumento da desigualdade e limita as oportunidades de desenvolvimento humano no país (VÁSQUEZ et al., 1998).

Como agravante, devido ao tropismo linfático da *Leishmania (Viannia) panamensis*, agente causal em quase a totalidade dos casos no país, ocasionalmente, se observa a forma mucocutânea, que pode causar mutilações e ser fatal na ausência de tratamento (OPAS/OMS, 2013).

Figura 1: Mapa da República do Panamá mostrando distribuição geográfica e intensidade de casos de leishmaniose cutânea no Panamá. Fonte: Departamento de Epidemiologia do Ministério da Saúde do Panamá, OPS, 2018.

1.2. Agente Etiológico

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Estes parasitos infectam diferentes hospedeiros vertebrados, entre animais silvestres e domésticos, e acidentalmente, o homem; assim como hospedeiros invertebrados (insetos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo) (AKHOUNDI et al., 2016; GRIMALDI et al., 1989; ISAZA et al., 1996; LAINSON; SHAW, 1987).

De acordo com a classificação taxonômica de Lainson e Shaw, baseado no desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado, o gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: subgênero *Leishmania*, no qual os parasitos apresentam comportamento suprapilárico, com desenvolvimento na porção anterior do trato digestivo; e subgênero *Viannia*, no qual os parasitos apresentam comportamento peripilárico, com desenvolvimento inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, com posterior migração para as porções anteriores (Figura 2) (KAMHAWI, 2006; LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON, 2010). Recentemente, foi descrita uma revisão da chave taxonômica destes parasitos, separando o gênero *Leishmania* em dois clados: *Euleishmania* e *Paraleishmania*. O clado *Euleishmania* contem os subgêneros *Viannia*, *Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Mundinia* (Figura 2) (AKHOUNDI et al., 2016; KLATT et al., 2019).

No Novo Mundo, dentro do subgênero *Leishmania*, destacam-se cinco espécies de importância clínica: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *L. (L.) infantum chagasi*, *Leishmania (L.) pifanoi* e *Leishmania (L.) venezuelensis*; e dentro do subgênero *Viannia*, destacam-se oito espécies de importância clínica *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.)*

peruviana, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *shaw*i, *Leishmania* (V.) *lindenbergi* e *Leishmania* (V.) *naiffi*. *L.* (V.) *colombiensis*, atualmente, está classificada dentro do clado de *Paraleishmania* (AKHOUNDI et al., 2016; KLATT et al., 2019; LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON, 1998). No Panamá, a *L.* (V.) *panamensis* é a espécie mais difundida e responsável pela maioria dos casos humanos no país, tendo o seu genoma completo recentemente sequenciado (CHRISTENSEN et al., 1983; LLANES et al., 2015; SAMUDIO et al., 2009). Sua ocorrência também tem sido registrada na Costa Rica, Honduras, Nicarágua, Venezuela, Colômbia e Equador (LAINSON, 2010).

Outras três espécies do parasito foram isoladas de hospedeiros vertebrados silvestres como *L. aristidesi*, *L. hertigi* e *L. naiffi*. Por exemplo, *L. aristidesi* foi isolado de *Oryzomys capito*, *Agouti paca*, *Marmosa robinsoni* e *Proechimys semispinosus*; e *L. hertigi* de *Coendou rothschildi*; e *L. naiffi* foi isolado a partir de pools de *Lu. trapidoi* e *Lu. gomezi* (AZPURUA et al., 2010; CHRISTENSEN et al., 1983; HERRER, 1971).

Figura 1: Chave taxonômica de *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010 e de Klatt et al., 2019.

Dentro do tubo digestório do inseto vetor, são descritas pelo menos cinco formas distintas do parasito do gênero *Leishmania*: as formas promastigotas procíclicas,

nectomonas, haptomonas, paramastigotas e, finalmente, as formas promastigotas metacíclicas. Mas, as principais formas de importância clínica e diagnóstica são a forma promastigota metacíclica, encontrada no tubo digestivo do vetor; e a forma amastigota, observada dentro das células do Sistema Fagocitário Mononuclear do hospedeiro vertebrado (BATES, 1994; GITHURE et al., 1990; KAMHAWI, 2006; MUSKUS; VILLA, 2002).

A forma promastigota metacíclica é alongada e apresenta na porção anterior um flagelo livre. O núcleo, que pode ser ovoide ou esférico, localiza-se na região central da célula e o cinetoplasto situa-se entre a extremidade da região anterior da célula e o núcleo. O tamanho pode variar mesmo dentro da mesma espécie, podendo medir entre 16,0 - 40,0 $\times$ 1,5- 3,0 μm , incluindo o flagelo, que por sua vez, comumente é maior que o corpo do parasito. A promastigota metacíclica é a forma infectiva presente no vetor e pode ser isolada em meio de cultura para o diagnóstico (LAINSON; SHAW, 1987; MIRANDA et al., 2009; MUSKUS; VILLA, 2002).

A forma amastigota é esférica ou ovoide. No citoplasma, é possível observar o núcleo, ovoide ou esférico, e o cinetoplasto, pequeno bastão próximo ao núcleo. Não possui flagelo aparente, mas apresenta uma pequena invaginação da membrana. O tamanho pode variar dependendo da espécie, podendo medir entre 1,5 - 3,0 $\times$ 3,0 - 6,5 μm . É a forma presente no hospedeiro vertebrado que tem alta capacidade de sobrevivência intracelular, visualizada no diagnóstico direto da infecção (LAINSON; SHAW, 1987; MUSKUS; VILLA, 2002).

1.1. Vetor

Os vetores da LTA são dípteros da família Psychodidae, conhecidos como flebotomíneos (Figura 3). Apresentam comportamento noturno ou crepuscular. Para que haja a oviposição, a fêmea precisa de uma dieta sanguínea e são as que transmitem o parasito (CHRISTENSEN et al., 1983; DUTARI; LOAIZA, 2014; LAINSON; SHAW, 1987).

Figura 2: Flebotomíneo (*Lutzomyia panamensis*: *Psychodopygus panamensis*). Fonte: Foto do Sr. Roberto Rojas, ICGES, Panamá).

No Panamá, a *Leishmania* (V.) *panamensis* é transmitida por várias espécies de *Lutzomyia* ao longo do país. *Lutzomyia trapidoi* e *Lu. panamensis* são os vetores comprovados de *L. (V.) panamensis* no Panamá e na Colômbia, bem como outros vetores suspeitos, como *Lu. gomezi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. sanguinaria* e *Lu. carrerai thula*, os quais são espécies muito abundantes e altamente antropófilas no país. Dentre estes, *Lu. gomezi* é considerado um importante vetor de LC no Panamá, porque se alimenta regularmente em seres humanos. (CHRISTENSEN et al., 1983; DUTARI; LOAIZA, 2014; HOWARD; CHRISTENSEN, 1980; MIRANDA et al., 2009).

1.2. Reservatórios

Os reservatórios são hospedeiros mamíferos com alimentação dinâmica, isto é, animais capazes de servir como fonte de agentes patogênicos para vetores e / ou novos hospedeiros (CALZADA et al., 2015; HOWARD; CHRISTENSEN, 1980).

No Panamá, foi descrito como hospedeiro mamífero para o parasito *Leishmania*, a preguiça, *Choloepus hoffmanni*, como reservatório mais importante (GONZÁLEZ et al., 2015; HOWARD; CHRISTENSEN, 1980; LAINSON, 2010) (Figura 4); porém, outras preguiças como *Bradypus infuscatus* e *B. griséus*; animais arborícolas, como *Bassaricyon gabbi*, *Nasua* e *Potos flavus* (*Procyonidae*); macacos, *Aotus trivirgatus* e *Saguinus geoffroyi*; e roedores terrestres, *Heteromys* sp. também mostraram sua importância como reservatórios silvestres. O homem e os animais domésticos, geralmente tornam-se hospedeiros acidentais, apresentando a forma cutânea da doença (CALZADA et al., 2015; DUTARI; LOAIZA, 2014; LAINSON, 2010). Outros animais, incluindo *Didelphis marsupialis* (gambá) e *Proechimys semispinosus* (rato espinhoso), podem servir de reservatórios secundários, mas seu papel epidemiológico ainda não foi totalmente investigado (CHRISTENSEN et al., 1983; DUTARI; LOAIZA, 2014).

Figura 3: Alguns dos reservatórios de *Leishmania* encontrados no Panamá. **A.** *Proechimys semispinosus*, **B.** *Bradypus variegatus*, **C.** *Choloepus hoffmanni*, **D.** *Saguinus geoffroyi*, **E.** *Aotus trivirgatus* e **F.** *Didelphis marsupialis*. Fonte: Fotos do Dr. Azael Saldaña, ICGES, Panamá.

1.5. Ciclo Biológico

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* é composto por duas fases: uma nos hospedeiros invertebrados, na qual haverá a multiplicação das formas promastigotas por divisão binária no tubo digestório das fêmeas dos flebotomíneos; e outra fase, nos hospedeiros vertebrados, na qual as formas amastigotas vivem e se multiplicam, também por divisão binária, no interior de células do Sistema Fagocítico Mononuclear, mais especificamente em vacúolos parasitóforos de macrófagos (Figura 5) (ADLER, 1964; LAWYER et al., 1987).

Figura 5: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de NIH, 2010.

A infecção do flebotomíneo se dá ao realizar o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, este adquire as formas amastigotas que irão se replicar e se diferenciar em formas promastigotas. Estas formas se multiplicam ainda no sangue ingerido, que está envolvido em uma matriz peritrófica, que é secretada pelas células do estômago do inseto

vetor. Depois da digestão do sangue, essa matriz se rompe, liberando as formas promastigotas que então irão colonizar distintas regiões do tubo digestório do inseto vetor, dependendo da espécie da *Leishmania* (KAMHAWI, 2006; MUSKUS; VILLA, 2002; WALTERS, 1993).

Com o aumento do número de promastigotas, estas formas migram para a parte anterior do tubo digestório, culminando em uma obstrução que dificultará a ingestão de sangue pelo inseto. Desta forma, ao realizar novo repasto sanguíneo, após o esforço para ingerir o sangue, os músculos responsáveis pela sucção relaxam e causam regurgitação do material aspirado, juntamente com parasitos presentes no tubo digestório do inseto. Assim, ocorre a inoculação de formas infectantes no novo hospedeiro (KAMHAWI, 2006; MUSKUS; VILLA, 2002). No momento da inoculação, acredita-se que no hospedeiro vertebrado haja uma eliminação da maioria dos parasitos através da ação lítica do complemento e pela ação de neutrófilos e eosinófilos. Ainda assim, algumas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos da pele, e quando dentro dos vacúolos parasitóforos, transformam-se em amastigotas. No interior destas células, o parasito realiza inúmeras divisões binárias, aumentando a pressão intracitoplasmática do macrófago, rompendo a célula. Quando as formas amastigotas são liberadas no meio extracelular, novos macrófagos fagocitam os parasitos, iniciando uma reação inflamatória que será responsável pela manutenção do parasito. O ciclo reinicia quando um vetor saudável realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado (ADLER, 1964; KAMHAWI, 2006; LAURENTI, 2010; WALTERS, 1993).

1.6. Patogenia

A infecção por *Leishmania* depende de uma interação complexa entre o parasito, o hospedeiro, o ambiente e as espécies de insetos vetores, além da dose infectante e a via de inoculação (TORRES; BARROETA, 1999). Ou seja, a patogenia da leishmaniose depende do perfil imunológico do homem (associado à resposta imune celular), à virulência da espécie de *Leishmania* infectante e fatores inerentes ao vetor. Como *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório, para iniciar e estabelecer a infecção no hospedeiro depende da capacidade para ativar e/ou infectar macrófagos que vão servir como células hospedeiras, uma vez dentro delas, estes parasitos sobreviverão e se multiplicarão com sucesso (LAURENTI, 2010; TORRES; BARROETA, 1999). A entrada do parasito na célula hospedeira, assim como o estabelecimento da infecção e o desenvolvimento da doença, são processos dinâmicos que envolvem uma série de interações cruciais para determinar o êxito da infecção, tais como: eventos iniciais responsáveis para o estabelecimento da infecção (interação *Leishmania*-macrófago e *Leishmania*-saliva do vetor-macrófago) e eventos responsáveis pelo estabelecimento da doença (interação *Leishmania*-células dendríticas / células de Langerhans-linfócitos T); dos quais resultaram as diferentes formas clínicas da leishmaniose (LAURENTI, 2010; SILVEIRA et al., 2009).

1.7. Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A infecção por protozoários do gênero *Leishmania* em seres humanos causa um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde formas cutânea e mucocutânea até a forma visceral da doença (LAINSON, RALPH; SHAW, 1987; LAINSON R., 1998;

MCMAHON-PRATT; GRIMALDI; TESH, 1989; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Também existem formas assintomáticas da infecção por *Leishmania* (MCMAHON-PRATT; GRIMALDI; TESH, 1989). Existem quatro principais formas clínicas de leishmaniose com envolvimento cutâneo: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada borderline (LCDB) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; YUIL et al., 2012). Estas formas clínicas da LTA dependem da espécie do parasito, bem como de sua virulência e tropismo, da quantidade de parasitos inoculados, do vetor, e também da constituição genética e a condição imunológica do hospedeiro (MIRANDA et al., 2012; ROGERS et al., 2002).

1.7.1. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

A LCL manifesta-se com uma ou múltiplas pápulas que aumentam de tamanho e regularmente ulceram (Figura 6). As lesões estão localizadas principalmente nas extremidades inferiores e superiores e levam entre 3 e 18 meses para curar em mais de 90% dos casos e comumente apresentam poucos parasitos. O teste de Montenegro mostra-se positivo, reflexo de uma resposta imune celular efetiva contra o parasita, o que leva em muitos casos à cura espontânea das lesões e uma boa resposta ao tratamento (DACRUZ et al., 2002; THORNBURGH, 1952; YUIL et al., 2012). As espécies causadoras de LCL podem ser, tanto do subgênero *Leishmania*, quanto do subgênero *Viannia*. Entre as principais espécies estão: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(L.) mexicana* e *L.(L.) amazonensis* (LAINSON, 2010).

Figura 6: Lesão característica de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) em pacientes panamenhos. Fonte: Foto do Dr. José Calzada, ICGES, Panamá.

1.7.2. Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD)

A LCAD é uma forma relativamente rara de leishmaniose cutânea do Novo Mundo, causada por parasitos do subgênero *Leishmania* (SILVEIRA et al., 2004). Caracteriza-se com a presença de lesões nodulares disseminadas em todo o corpo e ricas em formas amastigotas do parasito. Estes pacientes apresentam um teste negativo de Montenegro e uma falha frequente para responder ao tratamento convencional com antimonial pentavalente (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; YUIL et al., 2012). Os principais agentes causadores são *L. (L.) pifanoi*, *L.(L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* (LAINSON, 1998).

1.7.3. Leishmaniose Mucosa (LM)

A LM é caracterizada por inflamação granulomatosa da mucosa do nariz, cavidade oral e faringe, levando à destruição do septo nasal e do palato. As lesões mucosas podem aparecer simultaneamente com um quadro clínico de LCL. No entanto,

na maioria das vezes, as lesões mucosas aparecem anos após a lesão cutânea (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; YUIL et al., 2012).

Tem sido descrito na literatura que a doença mucosa resulta de uma infecção cutânea antiga, prolongada e não tratada (cura espontânea) por *L. (V.) braziliensis*. Este parasito é reconhecido como o agente etiológico mais importante da LM no Novo Mundo descrito por Lainson 1983, Grimaldi et al., 1987, 1989 e Lainson & Shaw, 1998; porém outras espécies como: *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) peruviana* também podem causar LM (LAINSON, 2010; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

1.7.4. Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB)

A LCDB é caracterizada por numerosas lesões, ulceradas e pequenas, em diversas regiões do corpo, devido a múltiplas picadas ou disseminação hematogênica. A disseminação linfática também é comum, e, portanto, os linfonodos podem estar aumentados (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Os principais agentes causais são as espécies de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (LAINSON, 2010).

1.8. Formas Clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana no Panamá

No Panamá, são descritas duas formas clínicas principais de leishmaniose: LCL e LM. A LCL é a mais comum (95% dos casos) causada principalmente por *L. (V.) panamensis* (VÁSQUEZ et al., 1998). As lesões produzidas por esta espécie podem evoluir para a forma clínica mucosa (aproximadamente 5%) que apresenta um pior prognóstico devido ao caráter deformante de suas lesões e à duração do tratamento (MIRANDA et al., 2012; SAMUDIO et al., 2009; YUIL et al., 2012). Até o momento, não foram descritos casos

de leishmaniose visceral (LV), apesar da presença do vetor e reservatórios silvestres em algumas áreas do país (VALDERRAMA; TAVARES; ANDRADE FILHO, 2011).

1.9. Diagnóstico Laboratorial da LC no Panamá

Leishmaniose cutânea (LC) é uma das zoonoses parasitárias mais frequentes no Panamá. Aproximadamente 3.000 casos são registrados anualmente e estima-se a existência de um número muito semelhante sem diagnóstico comprovado (OPAS/OMS, 2013; SAMUDIO et al., 2009). O tratamento é complicado e, geralmente, associado a efeitos adversos, portanto, é necessário confirmar o diagnóstico antes de se iniciar a terapia (VON STEBUT, 2007). O diagnóstico de LC nem sempre é fácil, deve ser acompanhado de análises clínico-epidemiológicas e exames laboratoriais (MARKLE; MAKHOUL, 2004). Na ausência de vacinas e medidas preventivas eficazes, os métodos diagnósticos desempenham um papel importante no controle e no tratamento adequado dessa infecção.

Entre os testes disponíveis para o diagnóstico de LC estão: os parasitológicos, imunológicos, moleculares, histopatológicos e imunopatológicos (RÍOS, 2010). Atualmente, no Panamá, são realizados os testes de tipo parasitológico (esfregaço, cultura), imunológicos (IDRM: reação intradérmica de Montenegro) e histopatologia (coloração com hematoxilina-eosina, Giemsa) para o diagnóstico de LC nas instituições de saúde no país. Mas nem todos realizam esses testes, nas áreas de difícil acesso, que possuem um microscópio e pessoal treinado, o diagnóstico é feito apenas pelo esfregaço. Testes moleculares, como PCR (Reação em cadeia da polimerase), são utilizados somente no *Instituto Conmemorativo Gorgas de los Estudios de la Salud*, que é o centro de referência para o diagnóstico de leishmaniose no Panamá. Além disso, em instituições de

pesquisa, utiliza-se PCR Hsp-70, que permite a caracterização de espécies através do uso de enzimas de restrição (RFLP) (MONTALVO et al., 2010).

Os métodos parasitológicos convencionais para o diagnóstico de LC (esfregaço e cultura *in vitro*) apresentam várias limitações, por exemplo, apresentam baixa sensibilidade diagnóstica e exigem treinamento adequado para seu desempenho; porém, são altamente específicos. O esfregaço do raspado da lesão corado pelo Giemsa não precisa de equipe especializada para sua realização, diferente da cultura em meio bifásico que requer um laboratório com equipe treinada.

A IDRM é um exame indireto, apenas avalia a exposição a parasitos de *Leishmania* e não pode discriminar entre infecção ativa, inativa ou passada. Já, a PCR mostrou ser uma ferramenta muito mais eficiente que os testes convencionais, passando a ser considerada um critério padrão para o diagnóstico (LÓPEZ-FUERTES et al., 2010; REITHINGER; DUJARDIN, 2007), com uma sensibilidade de até 100% (BARRIO et al., 2007). Mas, não é rotineiramente realizada em centros de saúde e hospitais nacionais, devido à falta de equipe especializada e infraestrutura necessária.

Em relação à histopatologia, é geralmente um dos testes com menor sensibilidade diagnóstica (45%) (XAVIER et al., 2006) e é difícil identificar as amastigotas de *Leishmania* nos cortes histológicos. Já a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) demonstra ser uma ferramenta valiosa para complementar o diagnóstico de leishmaniose e estudar a resposta imune celular desenvolvida durante a infecção. A sensibilidade varia de 59% a 80%, melhorando a sensibilidade diagnóstica da histopatologia.

No Panamá, esses testes ainda não são empregados rotineiramente no diagnóstico de LC, sendo necessário implementar os testes imuno-histoquímicos como ferramenta para auxiliar, não só no diagnóstico da LC, mas também no estudo da resposta

imune dos pacientes e, assim, desenvolver novas estratégias para o controle e tratamento dessa doença.

1.10. Imunidade

A resposta imune nas leishmanioses é bastante complexa, alguns casos podem evoluir para cura espontânea e, outros, podem evoluir para uma resposta exacerbada à infecção, que pode caracterizar um quadro de resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção pelo parasito. O desenvolvimento de uma resposta imune protetora para agentes patogênicos intracelulares requer uma ação coordenada de células de imunidade inata e adaptativa, que ativam-se após a infecção por *Leishmania* spp. (ANTONELLI et al., 2004; MUTISO et al., 2013).

1.10.1. Imunidade Inata

A resposta imune inata contra parasitos do gênero *Leishmania* é mediada por elementos humorais como proteínas do sistema de complemento e citocinas, e elementos celulares como as células “*natural killer*” (NK), e os fagócitos mononucleares e polimorfonucleares (MUTISO et al., 2013). Na ocasião do repasto sanguíneo, por um vetor infectado, formas promastigotas são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado, desencadeando uma resposta inflamatória inespecífica com participação de componentes séricos e celulares. Uma vez que o parasito persista, e ultrapasse essa primeira etapa da infecção, uma resposta imune celular específica será desencadeada, podendo culminar em resistência ou susceptibilidade à infecção (LAURENTI, 2010; MUTISO et al., 2013).

Com a inoculação das formas promastigotas na pele, o sistema complemento é ativado pela via clássica ou alternativa, exercendo sua atividade lítica (DOMÍNGUEZ; TORAÑO, 1999). Entretanto, também foi evidenciado um papel antagônico do complemento, onde este pode favorecer a sobrevivência intracelular do parasito, já que componentes da membrana do protozoário, o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa (gp63), fosforilam e inativam componentes do sistema complemento como o C3, C5 e C9, inibindo a ação lítica e a formação com complexo de ataque à membrana (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; LAURENTI, 2010). Essa inibição do complemento ocorre através da rápida conversão de C3b para C3bi, que age como opsonina, promovendo a ligação com receptores do complemento tipo 3 (CR3) nos macrófagos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998). Quando estes receptores de membrana são utilizados para adesão e internalização do parasito, um baixo metabolismo oxidativo é desencadeado, constituindo assim, um mecanismo essencial de escape e sobrevivência do parasito (WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983). Ainda assim, o papel protetor do sistema complemento continua sendo importante para eliminação de parasitos, pois camundongos depletados de complemento apresentaram menor resposta inflamatória e alto parasitismo (LAURENTI et al., 2004).

No que se refere aos elementos celulares participantes da resposta inflamatória inicial, os neutrófilos são extremamente importantes para a fagocitose do parasito e lise do parasita favorecendo o controle da infecção (LAURENTI et al., 1996). Entretanto, recentemente, foi postulada uma nova teoria para o papel dos neutrófilos na interação com os parasitos, denominada “Cavalo de Tróia” (VAN ZANDBERGEN et al., 2004; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH; LASKAY, 2007). Foi evidenciado que formas promastigotas conseguem invadir ativamente neutrófilos que foram recrutados para o local da picada, e permanecem viáveis dentro destas células. Desta forma, os neutrófilos

seriam células hospedeiras temporárias, permitindo uma entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, que fagocitam os neutrófilos apoptóticos infectados e não têm seus mecanismos microbicidas ativados (ROGERS et al., 2009).

Apesar do macrófago ser a célula hospedeira definitiva do parasito, uma das principais defesas do hospedeiro ainda são os mecanismos microbicidas do macrófago, cuja função é matar o parasito. Com a ligação do parasito ao macrófago, um fenômeno oxidativo celular é desencadeado, culminado na formação de metabólitos tóxicos de oxigênio, superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), responsáveis pela ação leishmanicida do macrófago (ROSEN et al., 1995). Além desta resposta oxidativa, o macrófago possui outros mecanismos microbicidas, como a produção de óxido nítrico (NO), formado a partir da reação do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular (O_2) (LIEW et al., 1990; MONCADA et al., 2017).

Outros tipos de células, incluindo mastócitos, células “*natural killer*” (NK) e células dendríticas, também estão envolvidas no estabelecimento da leishmaniose. As células NK, representam uma das primeiras linhas de defesa da resposta imune após a invasão por *Leishmania* sp., cuja função é lisar os macrófagos infectados. Além disso, têm um papel como importante fonte de IFN- γ , que ativa macrófagos a produzir óxido nítrico sintetase induzível para gerar óxido nítrico, molécula tóxica para o parasito e que leva à sua lise (BELOSEVIC et al., 1989; LAURENTI, 2010; LIEKE et al., 2011; MUTISO et al., 2013). Porém, foi demonstrado recentemente, que embora as células NK produzam IFN- γ na fase inicial da infecção, o que ajuda ainda na geração da resposta imune celular do tipo Th1, elas não são essenciais para gerar resistência do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania* (BANERJEE et al., 2016).

1.10.2. Imunidade Adaptativa

Com a persistência do parasito no hospedeiro, haverá uma ativação específica da resposta imunológica, com expansão clonal de vários tipos celulares, como linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺. A resposta imune na leishmaniose tem sido caracterizada, principalmente, pela expansão de células T CD4⁺, que podem produzir citocinas do perfil Th1 ou Th2 (HEINZEL et al., 1989; LOCKSLEY et al., 1987; REIS et al., 2007). As células T *helper* (Th) constituem um braço importante do sistema imune adaptativo porque coordenam a defesa contra patógenos específicos através da produção de citocinas com funções efetoras que medeiam diferentes tipos de inflamação do tecido (BETTELLI et al., 2008). Além das células Th1 e Th2, também tem sido descrita a presença de outros subtipos de células Th como as células Th17 e as células T regulatórias (T_{reg}) (BANERJEE et al., 2016; BELKAID, 2007; BELKAID, 2009; LAURENTI, 2010).

Dependendo do estado de ativação e o meio de citocinas, as células dendríticas (CDs) auxiliam na polarização de células T nativas para um fenótipo Th1, Th2, Th17 ou T_{reg}. A polarização da resposta imune mediada pelas células T depende principalmente das citocinas e dos sinais coestimulatórios fornecidos pelas CDs, durante a apresentação do antígeno nos linfonodos regionais. O controle de uma infecção por *Leishmania* e a progressão da doença correspondente tem sido associada com geração de respostas de CD4⁺Th1 e CD4⁺Th2, respectivamente. No entanto, esse paradigma Th1 *versus* Th2 não é uniformemente aplicável às diferentes formas de leishmaniose. Outras células T, tais como as células Th17 e células T_{reg} têm importantes papéis na progressão ou controle da doença, dependendo da espécie de *Leishmania*, bem como das características genéticas do hospedeiro (BANERJEE et al., 2016; BELKAID, 2009; LAURENTI, 2010; SILVEIRA et al., 2008).

As células dendríticas (CDs) cutâneas são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), e exibem propriedades migratórias, que conectam a pele aos linfonodos regionais. Estas células podem ser subdivididas em diferentes subtipos, entre eles: as células de Langerhans (CLs) e as células dendríticas dérmicas (CDd) (VALLADEAU; SAELAND, 2005).

Durante a migração, da pele aos linfonodos, as CLs maturam e adquirem potentes propriedades imunoestimulatórias. Após o processamento de antígenos na pele, elas apresentam estes antígenos às células T imaturas através de moléculas MHC-II. Com o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, elas promovem a sinais para ativação e diferenciação das células T, iniciando uma resposta imune específica para combater os parasitos presentes na pele (IGYARTO; KAPLAN, 2010).

Uma vez que ocorre a apresentação de antígenos nos linfonodos regionais pelas células apresentadoras de antígeno, estas induzem a diferenciação e ativação das células da imunidade adaptativa como as células Th1 ou Th2. As células Th1 se diferenciam a partir das células Th0 na presença de IL-12, cuja principal fonte no linfonodo são as células dendríticas (MAURER, 2009). E as células Th2 são diferenciadas a partir das Th0 quando no microambiente do linfonodo tem a presença principalmente de IL-10, que pode ser produzida por células dendríticas e macrófagos. A indução de Th1 ou Th2 pelas células dendríticas depende das diferenças genéticas do hospedeiro e o ambiente que está presente na periferia no momento do encontro das células dendríticas com o antígeno (MAURER; DONDJI; VON STEBUT, 2009).

A resposta imune celular do tipo Th1 tem sido associada com o controle da infecção, e a presença de citocinas como: IL-2, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-12, que leva à ativação de macrófagos com a produção de óxido nítrico e,

consequentemente, à morte dos parasitos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; SALAIZA-SUAZO et al., 1999). Os linfócitos TCD4⁺ do tipo Th1 e os linfócitos TCD8⁺ secretam IFN- γ que ativa os macrófagos. A IL-12 é essencial para estimular este tipo de resposta, é produzida por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Também é capaz de induzir a produção de IFN- γ nas células NK. Já a resposta do tipo Th2, está associada à persistência da infecção, com produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e o fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), com capacidade reguladora e inibidora. Por um lado estimula a imunidade humoral, e por outro, inibe a função de IFN- γ e consequentemente inibe a ativação dos macrófagos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998), contribuindo assim, para a sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos. Além disso, podemos ter também a ativação dos linfócitos B, com produção de anticorpos, principalmente IgG, que não são capazes de neutralizar o parasito intracelular, e que está relacionado ao estabelecimento da doença (KAYE, 2011; MUTISO et al., 2013; TRIPATHI, 2007).

Em qualquer uma das formas clínicas de leishmaniose, a resposta imune é dependente de células T, e acredita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (BACELLAR et al., 2002). A resistência estaria relacionada com a secreção de IFN- γ , que induz a ativação de macrófagos, culminando na produção de NO que tem a capacidade de destruir parasitos intracelulares (BOGDAN, 2001). Entretanto, recentemente, foi postulado um papel ambíguo para o IFN- γ . Se este estiver em sinergia com as citocinas do tipo Th1 (IL-12 ou TNF- α), o efeito será de proteção, já que haverá a ativação de macrófagos, com consequente eliminação dos parasitos. Mas, na ausência desta sinergia, poderá haver estímulo da replicação de formas amastigotas do parasito, revelando uma inusitada

capacidade do parasito de utilizar mecanismos de defesa do hospedeiro em benefício próprio (QI et al., 2004).

O papel das células TCD8⁺ está relacionado com o estabelecimento e manutenção da imunidade contra a infecção e também com a eliminação do parasito, já que participam diretamente da produção de IFN- γ (HERATH; KROPF; MULLER, 2003); mas podem ter também um papel importante na exacerbação da lesão cutânea, uma vez que a atividade citotóxica das células TCD8⁺ promove o agravamento da doença e está relacionado com o desenvolvimento das formas de leishmaniose mucosas e disseminadas (BRODSKYN et al., 1997; DA SILVA SANTOS, 2014; MACHADO et al., 2002). Por exemplo, o recrutamento de TCD8⁺ que expressam a serina associada ao grânulo protease granzima B está correlacionada com a progressão da lesão em pacientes infectados com *L. braziliensis* (FARIA et al., 2009). Além disto, tem sido descrito que as células TCD8⁺ também são capazes de produzir IL-10. Análise *in vitro* em PBMC de indivíduos saudáveis e pacientes com LCL em resposta à estimulação de *Leishmania guyanensis* demonstrou que a IL-10 foi produzida pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺ de ambos os grupos quando o TGF- β foi neutralizado. O papel exato das células TCD8⁺ produtoras de IL-10 na infecção com *Leishmania* ainda não está claro e deve ser investigado (BOURREAU et al., 2007).

Cada microambiente requer um conjunto específico de elementos reguladores que são, constantemente, mantidos para manter a homeostase local. As células T_{reg} contribuem para a manutenção deste equilíbrio e estabelecimento da resposta imune controlada. As células T_{reg} limitam a magnitude das respostas efetoras, o que pode resultar na incapacidade de controlar adequadamente a infecção. Contudo, as células T_{reg} também ajudam a limitar os danos teciduais causados por uma resposta imune exacerbada contra microrganismos patogênicos (BELKAID; TARBELL, 2009).

Vários tipos de células T_{reg} foram descritas com base em sua origem, maturação e mecanismo de ação, assim dois subtipos principais tem sido identificados: células T regulatórias $FoxP3^+$ naturais ($CD4^+CD25^+$), que se desenvolvem no timo; e as células T regulatórias induzíveis ($CD4^+CD25^-$), que se desenvolvem na periferia a partir das células $TCD4^+$ convencionais após a exposição a sinais como citocinas, drogas imunossupressoras ou células apresentadoras de antígenos (APCs) expostas a produtos microbianos (BELKAID, 2007; BELKAID; TARBELL, 2009). As populações de células T regulatórias induzíveis incluem: as células T regulatórias 1 (TR1: que secretam IL-10), T helper 3 (Th3: que secretam TGF- β), e as células T regulatórias $FoxP3^+$ convertidas (BELKAID, 2007; CARNEIRO et al., 2009). As células T_{reg} naturais são classicamente definidas pela expressão de CD25, também expressam CTLA-4, GITR e $FoxP3$. Atualmente, $FoxP3$ é considerado o melhor marcador para células $CD4^+CD25^+ T_{reg}$ (BELKAID, 2007; CARNEIRO et al., 2009).

A citocina TGF- β é capaz de modular a expressão de $FoxP3$ por células T_{reg} , sendo capaz de transformar células T periféricas $CD4^+CD25^-$ em $CD4^+CD25^+$. As células T_{reg} são ativadas na presença de citocinas como IL-10 e TGF- β , as quais afetam a atividade de células T citotóxicas e células apresentadoras de antígenos; e podem inibir a proliferação e produção de citocinas Th1 por células efectoras, prevenindo a eficiente eliminação do parasito (ARAUJO et al., 2018; BELKAID, 2009).

IL-10 é uma citocina chave produzida por várias células efectoras como as células T_{reg} e as células Th2. É uma citocina imuno-reguladora, essencial em limitar a resposta imune, correlacionada com a supressão da resposta proliferativa de células T induzida por antígenos, tem a capacidade de inibir a ativação das células apresentadoras de antígeno e indiretamente diminui a intensidade da resposta imune. Esta citocina

impede a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ , contribuindo assim à sobrevivência do parasito (BELKAID; TARBELL, 2009; MAURER; DONDJI; VON STEBUT, 2009).

Outro tipo celular descrito e que pode estar presente no processo inflamatório causado pela infecção de *Leishmania*, são as células Th17. As células Th17 (CD4⁺-RoR γ t⁺-IL17⁺) são a principal fonte de produção de IL-17 no hospedeiro. Elas também podem produzir IL-21 e IL-22. Embora, na LTA a maior parte de IL-17 é produzida por células CD4⁺ RoR γ t⁺, aproximadamente 30% da produção de IL-17 poderia estar sendo secretado também por outros tipos celulares, como: células TCD8, T γ δ , NK e monócitos (BELKAID; TARBELL, 2009).

A diferenciação das células Th17 começa após a exposição a citocinas derivadas de células apresentadoras de antígeno, tais como IL-6, TGF- β e IL-21. O efeito combinado da sinalização de IL-6 e TGF- β leva à expressão do fator de transcrição do receptor órfão relacionado ao retinóide (ROR γ t e ROR α) resultando na iniciação da diferenciação de Th17 (PANDEY; SUNDAR; PRAJAPATI, 2016). Também temos a IL-23 que é necessária para a diferenciação e manutenção completa da população de células Th17 efectoras (BANERJEE et al., 2016). Em outras palavras, a diferenciação clássica das células Th17 é iniciada pelas ações combinadas de IL-6 e TGF- β ; a amplificação da resposta Th17 é conduzida por produção de IL-21 pelas células Th17 e a estabilização/manutenção do fenótipo Th17 é feita por IL-23 (BETTELLI et al., 2006, 2008; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006). Além disto, recentemente foi demonstrado que o TGF- β juntamente com IL-1 β , IL-6 ou IL-21 promove a diferenciação das células Th17 em humanos (MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008; YANG et al., 2008).

Tem sido descrito que IL-17, pertencente à família de citocinas pró-inflamatórias, desempenha um papel importante na depuração intracelular de patógenos.

Em geral, IL-17 é responsável para o recrutamento eficiente de neutrófilos no sítio da inflamação (MAURER; DONDJI; VON STEBUT, 2009). As células Th17 têm como função primária a eliminação de microrganismos que não são adequadamente destruídos pelas células Th1 ou Th2 (BANERJEE et al., 2016; BETTELLI et al., 2008), porém, pode ter um papel ambíguo. Por exemplo, nas lesões cutâneas induzidas por *Leishmania major*, a IL-17 produzida por células Th17 está associada a exacerbação a doença, sugerindo um papel na patogênese. No entanto, um papel protetor para IL-17 é indicado pela expansão de células produtoras de IL-17 em imunidade induzida por vacina (BANERJEE et al., 2016). Em outro estudo feito em camundongos, foi demonstrado o papel protetor da IL-17 que juntamente com o IFN- γ pode ser importante para a melhora da infecção causada por espécies do subgênero *Viannia* (CASTILHO et al., 2010).

1.11. Inflamassoma

Recentemente, foi descrito o inflamassoma que são complexos multiméricos de proteínas reunidos no citoplasma de células imunes inatas em resposta a moléculas microbianas ou sinais de estresse. Os inflamassomas facilitam a indução de respostas inflamatórias, induzindo a secreção de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β e IL-18, guiando a célula hospedeira para piroptose que é uma forma programada específica de morte celular inflamatória (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). Esses processos favorecem o início de processos inflamatórios nos tecidos infectados ou danificados, que podem contribuir para a eliminação de patógenos, indução de imunidade adaptativa e retorno à homeostase tecidual (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). O inflamassoma é composto de um sensor, o adaptador e uma caspase inflamatória. A molécula sensor determina a especificidade do inflamassoma e geralmente formam parte da família dos

receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NOD-like receptor: NLR) (CUNHA; ZAMBONI, 2013; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). O adaptador é uma proteína (ASC) que ativa e induz a clivagem da Caspase-1 (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Das caspases inflamatórias, a Caspase-1 é a mais estudada e sua atividade catalítica é fortemente regulada pela autoativação dependente de sinal do inflamassoma que media o processamento de citocinas dependente de Caspase-1, como IL-1 β (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Tem sido descrito um papel ambíguo do inflamassoma na resposta imune contra a *Leishmania* sp. Em um estudo experimental, a infecção murina por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* mostrou a produção de IL-1 β derivada da ativação do inflamassoma NLRP-3 que leva à resistência do hospedeiro à infecção pela produção de óxido nítrico (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Porém, em outro estudo, a ativação do inflamossoma NLRP-3 e a produção de IL-1 β levou ao aumento da patologia na infecção murina por *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2018).

1.12. Histopatologia da Leishmaniose Cutânea Localizada no Panamá.

Na literatura, foram descritos dois padrões histológicos nas lesões cutâneas de pacientes com LC relacionadas à infecção por *Leishmania Viannia*. O primeiro é uma reação inflamatória crônica não específica caracterizada por um infiltrado difuso de linfócitos, células plasmáticas, macrófagos, granulócitos e debris celulares. E o segundo, uma reação granulomatosa que contém os achados histopatológicos encontrados em uma reação inflamatória crônica, mas associada à presença de células epitelioides e à formação de granulomas frequentemente associados a células gigantes. Casos com vasculite,

neurite e necrose também foram observados. Em lesões cicatrizadas, pode-se encontrar fibrose dérmica e infiltrados perivasculares discretos (SCHUBACH et al., 2001).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) no Panamá é causada principalmente por parasitas do gênero *Leishmania* (*Viannia*), cuja manifestação clínica mais comum é a presença de lesões ulceradas na pele (CHRISTENSEN et al., 1983; YUIL et al., 2012). Há apenas um relato detalhado descrevendo as alterações histopatológicas na lesão cutânea de pacientes com LCL em Panamá (THORNBURGH; JOHNSON; ELTON, 1952). Eles mostraram um padrão histológico bastante constante e distinto, apresentado em biópsias de úlceras cutâneas na LC, como: hiperplasia epitelial, granulomas pouco definidos, inflamação crônica intensa das papilas dérmicas, localização de células inflamatórias sobre glândulas sudoríparas na periferia da lesão, que diferenciaram a leishmaniose da maioria das úlceras cutâneas causadas por outros agentes infecciosos como fungos e bactérias (THORNBURGH; JOHNSON; ELTON, 1952).

1.13. Imunidade da Leishmaniose Cutânea por *L. (V.) panamensis*.

A resposta imune na LCL humana causada pela infecção de *L. (V.) panamensis* é marcada por uma resposta imune mista de citocinas Th1 e Th2, com produção concomitante de IFN- γ , IL-13, IL-10 e TNF- α . Apesar da grande importância para a saúde pública e dos esforços constantes de pesquisadores da área, o entendimento da resposta imune frente à infecção por organismos do subgênero *Viannia* ainda é limitado (CASTILHO et al., 2010). A infecção humana causada pela *L. (V.) panamensis* é pobremente estudada (VEZZOLI et al., 2010). Há poucos relatos na literatura (PALMA; SARAVIA, 1997; RESTREPO et al., 1996; RODRIGUEZ-PINTO et al., 2012) quando comparado com outros parasitos do mesmo subgênero e a maioria deles é referente a

estudo *in vitro* ou infecção experimental (CASTILHO et al., 2010; GALLEG0 et al., 2011; GOTO et al., 1995; RAMÍREZ et al., 2012; ROJAS et al., 1993). Goto e colaboradores, demonstraram a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *L. (V.) panamensis*. A linhagem de camundongos C57BL/6 foi resistente e apresentou lesão auto limitante no coxim plantar traseiro; já as linhagens BALB/c e DBA/2J foram suscetíveis e mostraram um aumento no tamanho da lesão no coxim plantar que começou no dia 20 pós-infecção e progrediu com o tempo de evolução da infecção; e a linhagem CBA/HJ mostrou-se de resistência intermediária. Em contraste com outras leishmanioses cutâneas conhecidas em camundongos, a lesão em camundongos infectados com *L. (V.) panamensis* foi restrita ao local de inoculação na pele (GOTO et al., 1995).

Outro estudo desenvolvido em modelo de camundongo BALB/c com infecção por *L. (V.) panamensis* foi capaz de reproduzir doença crônica, com infecção persistente e lesões clinicamente evidentes por mais de um ano. A resposta imune do camundongo se assemelha à que se encontra em pacientes infectados com *L. (V.) panamensis* com lesões crônicas e recorrentes, apresentando uma mistura na resposta imune celular Th1/Th2 com a presença de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-13. A utilização de camundongos imunodeficientes, mostrou o papel crítico para IL-13 e/ou IL-4R α na determinação da susceptibilidade à infecção crônica. Com a indução de cura nos camundongos imunodeficientes, observou-se um aumento de IFN- γ e IL-17, concomitantes ao controle e eliminação de parasitos. Foi observado aumento de células TCD4⁺ (mas não TCD8⁺) produtoras de IFN- γ . Estes resultados sugerem que IL-13 representa um alvo importante para o controle da doença na infecção por *L. (V.) panamensis* (CASTILHO et al., 2010). Os autores também observaram a produção de IL-10, IL-13 e IFN- γ , tanto na fase aguda,

quanto na fase crônica, de acordo com o observado na infecção humana. Notavelmente, os níveis de IL-4 eram baixos até na infecção tardia (CASTILHO et al., 2010).

Recentemente, a resposta T_{reg} foi investigada no modelo de camundongo BALB/c infectado com *L. (V.) panamensis*. Os autores avaliaram a hipótese de que a funcionalidade das células T_{reg} poderia contribuir para o controle da patogênese. Desta forma, a depleção de células T_{reg} resultou em lesões maiores, aumento da carga parasitária e maior produção de IL-17 e IFN- γ , sem alteração nos níveis de IL-10 e IL-13. Isso indicou que uma resposta inflamatória aumentada era compatível com exacerbação da doença e que as células T_{reg} eram importantes na regulação da patologia da doença (EHRlich et al., 2014).

Durante a evolução de doenças infecciosas, as células T_{reg} podem prevenir a erradicação do patógeno, mas também podem limitar a inflamação e danos nos tecidos. Rodriguez-Pinto e colaboradores (2012) avaliaram o papel das células T_{reg} na leishmaniose cutânea crônica. Em indivíduos com lesões crônicas, a participação de células T_{reg} de sangue periférico e de lesão de pele era maior em comparação com os indivíduos infectados que não desenvolvem doença crônica, porém sua capacidade de controlar a resposta inflamatória na infecção por *Leishmania* foi inferior. No entanto, a cura de lesões crônicas no final do tratamento foi acompanhada por um aumento do número e a capacidade das células T_{reg} para inibir a função de células T efectoras que medeiam a resposta inflamatória. Diferentes subtipos de células T_{reg} , definidos pela expressão de marcadores moleculares, foram identificados durante a doença crônica e cura, apoiando a participação de células T_{reg} distintas no desenvolvimento da doença e controle da inflamação durante a resposta de cura (RODRIGUEZ-PINTO et al., 2012).

Até o momento, na literatura não tem sido descrito estudos desenvolvidos com pacientes infectados por *L. (V.) panamensis* do Panamá; a grande maioria dos trabalhos

são de estudos feitos na Colômbia (GALLEGO et al., 2011; PALMA; SARAVIA, 1997; RESTREPO et al., 1996; RODRIGUEZ-PINTO; SARAVIA; MCMAHON-PRATT, 2014). Palma e colaboradores (1997) descreveram os aspectos histopatológicos encontrados em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) panamensis* na Colômbia. O infiltrado dérmico e alterações histopatológicas foram caracterizados utilizando anticorpos monoclonais e o método de imuno-peroxidase indireta. Análises de regressão múltipla para estabelecer associações entre tipo de lesão (úlcera, nódulo ou pápula), os dados da resposta imune (teste de Montenegro, os títulos do teste de imunofluorescência indireta, blastogênese de linfócitos), e as populações de células específicas demonstraram correlações estatisticamente significativas entre linfócitos TCD4⁺ e macrófagos. Linfócitos CD8⁺ foram associados com plasmócitos, assim como a presença de amastigotas (PALMA; SARAVIA, 1997).

Em outro estudo desenvolvido na Colômbia com pacientes de LC causada principalmente por *L. (V.) panamensis*, mostrou que a razão entre as células TCD4⁺ e as células TCD8⁺ foi de $0,80 \pm 0,06$. A maioria das células T no granuloma expressava o receptor alfa beta em células T (TCR), enquanto que apenas alguns expressaram o receptor gama delta em células T. Os resultados mostraram que os pacientes com LC por *L. (V.) panamensis* possuíam os sinais de ativação e acessórios apropriados de células imuno-competentes para desencadear a fase efetora da resposta imune e eliminar o parasito (RESTREPO et al., 1996).

Ainda há muito por conhecer no que se refere à infecção pelo parasito *L. (V.) panamensis* no Panamá, portanto, este estudo foi desenhado com o objetivo de avaliar a resposta imunológica e histopatológica, assim como também de complementar o diagnóstico clínico, com o uso de testes imuno-histoquímicos no Panamá. Na medida que o conhecimento sobre a interação parasito-hospedeiro na infecção por *L. (V.) panamensis*

seja ampliado, novas medidas de controle podem ser propostas, assim como novas estratégias de tratamento possam ser implantadas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar as alterações imuno-histopatológicas das lesões de pele causada por *Leishmania (V.) panamensis* em pacientes com leishmaniose cutânea no Panamá.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o uso da imuno-histoquímica como teste complementar para o diagnóstico histopatológico da Leishmanioses Cutânea no Panamá.
- Caracterizar a resposta histopatológica de lesões cutâneas causadas pela *Leishmania (V.) panamensis* em biópsias de pacientes com a forma cutânea da infecção.
- Avaliar por imuno-histoquímica o padrão da resposta celular, inflamatória e regulatória, em lesões de pele causadas por *Leishmania (V.) panamensis* em pacientes com leishmaniose cutânea.
- Correlacionar os achados da resposta imune celular com as alterações histopatológicas, o parasitismo tecidual e os dados epidemiológicos observados em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (V.) panamensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

A seleção das amostras foi não probabilística, chamada tipo intencional. Foram analisadas 46 raspados de lesão de pele e biópsias cutâneas de pacientes atendidos na Clínica de Medicina Tropical do Instituto Conmemorativo Gorgas para Estudios de la Salud (ICGES) com lesões suspeitas de LC. A coleta das amostras foi realizada de janeiro de 2012 a dezembro de 2012. Todos os pacientes eram adultos e aceitaram, livre e voluntariamente, participar do estudo. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Bioética em Pesquisa do ICGES (Panamá) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Brasil), Protocolo 141/13 (Anexo 4,5). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e concordaram em participar voluntariamente do estudo (Anexo 2,3). O Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) de elaboração própria, feito no Instituto Conmemorativo Gorgas para Estudios de la Salud com a cepa de referência de *Leishmania (V.) panamensis* (MHOM/PA/98/WR2306) foi aplicado em todos os pacientes (DE VASQUEZ; CHRISTENSEN; PETERSEN, 1999; SAMUDIO et al., 2009).

As amostras foram colhidas sob anestesia local e assepsia (MIRANDA et al., 2012), e foram divididas em dois grupos: amostras de raspados de lesões cutâneas analisadas por testes convencionais e moleculares no ICGES, Panamá; e as amostras de biópsia de lesões cutâneas que foram analisadas por histopatologia (Laboratório de Patologia do Hospital Santo Tomás, Panamá) e imuno-histoquímica (Laboratório de Patologia da Universidade de São Paulo, Brasil, LIM-50-HC-FMUSP) (Figura 7). Após

o diagnóstico de LC, todos os pacientes receberam tratamento adequado de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde do Panamá para o controle de leishmaniose.

Figura 7: Esquema de trabalho para coleta e processamento das amostras a partir de lesão cutânea em pacientes panamenhos com LCL.

3.2. Coleta de amostras

Amostras de raspado de lesões cutâneas: para obter as amostras de lesões cutâneas, a área que envolve a lesão foi limpa com sabão líquido cirúrgico, depois com álcool 70% e com uma lanceta estéril, a borda da lesão foi raspada. Anestésico local de epinefrina com lidocaína injetável foi aplicado no tecido subcutâneo, em um volume não superior a 3 mL, com uma agulha hipodérmica #22. Posteriormente, a área foi raspada com a ponta de uma lâmina de bisturi estéril (MIRANDA et al., 2012) e as amostras coletadas foram analisadas por testes convencionais e moleculares.

Amostras de biópsia cutânea: para obter as amostras de biópsia das lesões cutâneas, a área que envolve a lesão foi limpa com sabão líquido cirúrgico e com álcool 70%. Enquanto a lesão ainda estava sob o efeito do anestésico, a biópsia foi coletada da borda com um punch de 4 mm de diâmetro e fixadas em 10% de formalina tamponada no prazo máximo de 48 horas, incluídas em parafina e processados para estudo histopatológico e imuno-histoquímico.

3.3. Diagnóstico laboratorial

3.3.1. Imunológico: Teste de Montenegro (IDRM)

Para realização do teste de Montenegro foi utilizada uma solução preparada com 10^6 formas promastigotas de *Leishmania (V.) panamensis* (MHOM/PA/98/WR2306) oriundas de cultura e lisadas (protocolo de rotina utilizado no laboratório de parasitologia do ICGES, Panamá). Esta solução foi injetada na região supraescapular do paciente com auxílio de uma seringa de insulina, em um volume de 0,1 mL por via intradérmica. A área

de induração no ponto de inoculação foi avaliada após 48 horas, sendo um tamanho igual ou superior a 5 mm considerada como critério de positividade da reação (CHRISTENSEN et al., 1999; MIRANDA et al., 2009).

3.3.2. Parasitológico: esfregaço e cultura

Para o exame direto, os raspados das lesões foram utilizados para confecção de 4 esfregaços, sendo 2 por lâmina. Após secagem, os esfregaços foram corados com Giemsa para a observação direta em microscópio de luz e pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*. Para o isolamento e a cultura do parasito, o material do raspado da lesão foi colocado em solução salina estéril com antibióticos, penicilina 100U e estreptomicina 0,1 mg a 10% como meio de transporte e posteriormente, cultivado em duplicata, em condições estéreis, no meio de Senekjie de duas fases com Schneider e em meio especial M-199 com glutamina e Sal de Hank. Os tubos de cultura foram incubados a 26°C e foram revisados em busca de formas promastigotas de *Leishmania* até o máximo de quatro semanas (MIRANDA et al., 2009, 2012).

3.4. Diagnóstico Molecular

3.4.1. Coleta de amostras e extração de ADN

Para a análise molecular, o raspado da lesão de pele foi colocado em tubos de 1,5 mL contendo 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0). A extração de ADN das amostras em tampão TE foi realizada usando o Qiagen QIamp® DNA Blood Mini Kit de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, CA, EUA). O ADN de

Leishmania isolados de cultura foi purificado usando o Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

3.4.2. PCR diagnóstico para *Leishmania*

Os primers B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e LV (5'-ATTTTGAACGGGGTTTCTG-3') foram utilizados para amplificar especificamente todo o mini círculo de 750-pb de *Leishmania (Viannia)* sp. (SAMUDIO et al., 2009; VERGEL; WALKER; SARAVIA, 2005). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,6 µmol/L de cada primer e 5 µL de ADN extraído do tampão TE.

3.4.3. PCR Hsp-70

A PCR foi realizada com os oligonucleotídeos F25 (5'-GGACGCCGGCACGATTKCT-3') e R1310 (5'-CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC-3'), que amplificam um produto de 1286 pb da proteína de choque térmico de genes repetidos 70 (hsp70) já descrito anteriormente (MONTALVO et al., 2012). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 25 µL de Go Taq Green Master Mix 2X (Promega), 0,6 µmol/L de cada primer e 5 µL de ADN das amostras clínicas e 1 ng das cepas de referência [*L. (V.) panamensis* MHOM/PA/98/WR2306, *L. (V.) guyanensis* MHOM/BR/1975/M4147, *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 e *L. (V.) peruviana* MHOM/PE/05/WR 2771]. O ciclo térmico foi realizado no Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler.

3.4.4. Caracterização de *Leishmania*

Amostras das culturas positivas para *Leishmania* sp. foram caracterizadas por PCR Hsp-70/RFLP usando as enzimas HaeIII e posteriormente por BccI ou RsaI para observar os padrões de diferenciação das espécies de *Leishmania* descritas na literatura (MONTALVO et al., 2010).

3.5. Análise histopatológica

Todas as amostras de biópsia de pele de pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea foram fixadas em formalina tamponada 10% por um período não superior a 48 horas e processadas pelas técnicas usuais de microscopia no Laboratório de Patologia do Hospital Santo Tomas, cidade do Panamá. Todas as amostras de tecido foram desidratadas, embebidas em parafina, cortadas em secções de 4-5 µm de espessura e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes histológicos das lesões de pele foram caracterizados microscopicamente com base nas alterações histológicas encontradas na epiderme e na derme. Ao mesmo tempo, foi avaliada a intensidade e distribuição da reação inflamatória na derme, os diferentes tipos de células presentes no infiltrado inflamatório, a formação de granuloma e a carga parasitária. Foi realizada uma análise histopatológica comparativa e semi-quantitativa dos cortes corados com HE, atribuindo-se cruzes de acordo com a intensidade dos diferentes processos caracterizados, onde: (-) negativo, (+) discreto, (++) moderado e (+++) intenso (RIDLEY; RIDLEY, 1983).

3.6. Análise Imuno-histoquímica

Com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória e regulatória *in situ*, foi feita a reação de imuno-histoquímica empregando-se os seguintes marcadores: anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD68, anti-CD11c, anti-CD1a, anti-IL-6, anti-IL23, anti-RoR γ t, anti-IL-1 β , anti-IL-13, anti-GranzimaB, anti-IL-18 e anti-Caspase-1; e anticorpos policlonais anti- CD3, anti-FoxP3, anti-TGF- β 1, anti-IL-10, anti-IL-17, anti-IFN- γ , anti-iNOS e anti-CD20. Soro hiperimmune de camundongo cronicamente infectado por *Leishmania (L.) amazonensis* produzido no LIM-50-HC-FMUSP foi utilizado para confirmar e quantificar o parasitismo tecidual.

Cortes histológicos parafinados em lâminas previamente tratadas com organossilano foram desparafinizados em xilol a temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de duas passagens em xilol e posterior hidratação em duas passagens de álcool absoluto, duas passagens em álcool 95% e uma passagem em álcool 70% e finalmente duas passagens em água destilada, seguindo-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ 3% (10 volumes) por 10 minutos em temperatura ambiente para CD4, 6 incubações de 4 minutos em temperatura ambiente para CD3, CD8, CD68, iNOS e anti-*Leishmania*, 10 incubações de 3 minutos em temperatura ambiente para CD56, CD20, CD11c, CD1a, IL-10, IL-6, IL-23, RoR γ t, IL-17, FoxP3, TGF- β 1, IL-13, GranzimaB, IL-1 β , IL-18, Caspase-1 e IFN- γ . A recuperação antigênica foi realizada com o tampão citrato 10 mM pH 6,0 para os marcadores anti-*Leishmania*, CD3, CD68, iNOS, CD56, CD20, CD1a, CD11c, IL-10, IL-6, IL-23, RoR γ t, FoxP3, TGF- β 1, IL-13, GranzimaB, IL-1 β , Caspase1 e IFN- γ por 30 minutos em banho-Maria à 96°C-99 °C, deixando resfriar lentamente até 45°C-50°C. Para os marcadores CD4 e IL-17 foi utilizado o tampão EDTA 1 mM pH 8,0, e para os marcadores CD8 e IL-18 o tampão Tris 10 mM / EDTA 1 mM

pH 9,0 por 30 minutos em banho-maria à 96°C-99 °C, deixando resfriar lentamente até 55°C.

Posteriormente, iniciou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com solução de leite desnatado a 6% (Molico® - Nestlé) em TBS (solução salina tamponada com Tris 0,05M pH 7,6) por 60 minutos a 37°C para CD4 e 40 minutos a 37°C para IL-18; solução de leite desnatado a 6% em PBS por 60 minutos a 37°C para o marcador CD8; 45 minutos a 37°C para CD1a, CD56, FoxP3, IL-13, GranzimaB, IL-1 β , Caspase-1; 40 minutos a 37°C para CD3, anti-*Leishmania*, iNOS, CD56, CD20, CD11c e por 30 minutos a 37°C para IL-10, IL-17, IL-6, IL-23, RoR γ t, TGF- β 1 e IFN- γ .

Depois, seguiu-se com a incubação com os anticorpos primários anti-IFN- γ (policlonal, (H-145): SC-8308, Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1/10; anti-CD1a (monoclonal, (O10): sc-18885, Dako Cytomation) na diluição de 1/25; anti-CD3 (A 0452, Dako Cytomation), anti-CD4 (monoclonal, NC-L-CD4-1F6, Novocastra), anti-CD8 (monoclonal, NC-L-CD8-295, Novocastra) e anti-CD68 (monoclonal, ab955, ABCAM) na diluição de 1/50; anti-CD56 (monoclonal, BCL-L-CD56-504, Novocastra), anti-IL6 (monoclonal, (1): SC-130326, Santa Cruz Biotechnology), anti-FoxP3 (policlonal, (H:190): SC-28705, Santa Cruz Biotechnology) e anti-IL-13 (monoclonal, 08018-3H7, Sigma-Aldrich) na diluição de 1/100; anti-CD11c (monoclonal, ab52632, ABCAM), anti-IL-17 (policlonal, (H-132): SC-7927, Santa Cruz Biotechnology), anti-TGF- β 1 (policlonal, (V): SC-146, Santa Cruz Biotechnology) e anti-Granzima B (monoclonal, N-terminal, 310215, Sigma-Aldrich) na diluição de 1/200; anti-IL-1 β (monoclonal, AB2105, ABCAM) na diluição 1/300; anti-Caspase-1 (monoclonal, G6231-3D2, Sigma-Aldrich) na diluição de 1/500; anti-*Leishmania* (soro hiperimune de camundongo, LIM-50/HCFMUSP) na diluição 1/1000, anti-iNOS (Policlonal, (N20):SC-651, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD20 (Policlonal, (C-20): SC-7733, Santa Cruz

Biotechnology) e anti-IL-10 (policlonal, ab34843, ABCAM) na diluição de 1/1000; anti-IL-18 (policlonal, ab68435, ABCAM) na diluição de 1/1500; anti- RoRyt (monoclonal, MABF81, 6F3.1, Sigma-Aldrich) na diluição de 1/2000; anti-IL-23 (monoclonal, (C-3)sc-271279, Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1/2500.

O tempo de incubação para os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-*Leishmania*, anti-CD68, anti-iNOS, anti-FoxP3, anti-CD56, anti-CD20 e anti-CD1a, IL-13, IL-1 β e Caspase-1 foi por 18 horas a 4°C. Para os anticorpos anti-IL-10, anti-TGF- β 1, anti-IL-6, anti-IL-23 e anti-IFN- γ foi de 1 hora a 37°C. Para anti-IL-17, o tempo foi de 90 minutos a 37°C e para anti-CD11c, GranzimaB, anti-IL-18 e anti- RoRyt foi de 1 hora a 37°C e depois 18 horas a 4°C. Como controle negativo da reação, foi utilizada solução contendo o diluente PBS-BSA com a omissão do anticorpo primário.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas através de 3 incubações de 5 minutos com TBS para os marcadores CD4, IL-13, Caspase-1, IL-1 β , IL-18, GranzimaB e 3 incubações de 5 minutos com PBS-T (solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween 20) para os demais marcadores.

Para finalização da reação, foi utilizado o kit LSAB (K0690 – DakoCytomation) para anti-*Leishmania*, onde incubou-se o anticorpo secundário biotinilado por 40 minutos a 37°C. Foram realizadas novamente, três lavagens com PBS-T por 4 minutos, seguindo incubação com o complexo estreptoavidina peroxidase por 40 minutos a 37°C. Foram realizadas três incubações com PBS-T por 4 minutos para lavagem.

Para todos os demais marcadores o kit de revelação foi o Novolink (RE7280-K – Leica), incubando-se o reagente pós-primário por 60 minutos a 37°C para os marcadores CD3, CD4, CD8, CD68, iNOS, FoxP3, CD56, CD20, CD1a, CD11c, IL-13, IL-18, GranzimaB, IL-1 β , RoRyt e Caspase1. Para os marcadores IL-10, IL-17, IL-6, IL-23, TGF- β 1 e IFN- γ o tempo de incubação com o reagente pós-primário foi de 30 minutos a

37°C. Para lavagem foram realizadas três incubações com TBS por 5 minutos para o marcador CD4, IL-13, IL-18, GranzimaB, IL-1 β e Caspase-1; e três incubações de 5 minutos com PBS-T para os demais marcadores. Seguiu-se com a incubação do Polímero por 45 minutos a 37°C e posteriormente a mesma lavagem como descrita anteriormente.

O substrato cromogênico, DAB+H₂O₂ (diaminobenzidina com peróxido de hidrogênio – K3468 - DakoCytomation) foi adicionado ao tecido por 5 minutos a temperatura ambiente. Lavou-se com água corrente e em seguida, passou-se água destilada. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 3 minutos, então lavou-se com água corrente e água destilada e efetuou-se a desidratação dos cortes, por passagens consecutivas em duas cubas com álcool 70%, duas cubas com álcool 95%, duas cubas com álcool absoluto e duas cubas com xilol e então foram montadas com resina.

Uma síntese dos parâmetros empregados nas reações de imuno-histoquímica, estão apresentados na Tabela 1.

Cortes histológicos de pele normal (n=10) foram empregados nas reações de imuno-histoquímica para os diferentes marcadores com o objetivo de comparar a pele sadia com as lesões de pele dos pacientes com leishmaniose cutânea.

Tabela 1: Parâmetros utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Recuperação antigênica	Anticorpo primário (diluição)	Sistema de revelação
Anti-<i>Leishmania</i> (Soro hiperimune de camundongo, LIM50/HCFMUSP)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:1000, 15-18 horas 4°C	LSAB
Anti- CD3 (policlonal, A 0452)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:50, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-CD4 (Monoclonal, NCL- LCD4-IF6, Novocastra)	Tampão EDTA 1 mM pH: 8,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:50, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-CD8 (Monoclonal, NCL-L- CD8-295, Novocastra)	Tampão Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH: 9,0 (Banho Maria 96- 99°C) x 30 minutos	1:50, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-CD20 (Policlonal, (C-20): SC-7733, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:1000, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-CD56 (Monoclonal, BCL-L- CD56-504, Novocastra)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:100, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti- CD68 (Monoclonal, ab955, ABCAM)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:50, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-iNOS (Policlonal, (N20):SC-651, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:1000, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-IFN-γ (policlonal, (H-145): SC-8308, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:10, 1 hora x 37°C	Novolink
Anti-FoxP3 (Policlonal, (H-190): SC-28705. Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:100, 1 hora x 37°C e 15-18 horas 4°C	Novolink

Anticorpo	Recuperação antigênica	Anticorpo primário (diluição)	Sistema de revelação
Anti- CD1a (monoclonal, (O10):SC-18885, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:25, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-CD11c (monoclonal, ab52632, ABCAM)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:200, 1 hora x 37°C e 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-IL-10 (Policlonal, ab34843, ABCAM)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1/1000, 1 hora x 37°C	Novolink
Anti-TGF-β1 (Policlonal, (V): SC- 146, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:200, 1 hora x 37°C	Novolink
Anti-IL-17 (Policlonal) (H-132): SC-7927, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão EDTA 1 mM pH: 8,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:200, 1 hora e 30 minutos x 37°C	Novolink
Anti-IL-6 (Monoclonal, (1): SC- 130326, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:100, 1 hora x 37°C	Novolink
Anti- IL-23 (monoclonal, (C-3) SC- 271279, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:2500, 1 hora x 37°C	Novolink
Anti- RoRyt (monoclonal, MABF81, 6F3.1Sigma-Aldrich)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:2000, 1 hora x 37°C e 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-IL-1β (monoclonal, ab2105, ABCAM)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:300, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-IL-13 (monoclonal, 08018- 3H7, Sigma-Aldrich)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:100, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-Granzima B (monoclonal, N- terminal, 310215, Sigma-Aldrich)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:200, 1 hora x 37°C e 15-18 horas 4°C	Novolink

Anticorpo	Recuperação antigênica	Anticorpo primário (diluição)	Sistema de revelação
Anti-Caspase-1 (monoclonal, G6231-3D2, Sigma-Aldrich)	Tampão Citrato 10 mM pH: 6,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:500, 15-18 horas 4°C	Novolink
Anti-IL-18 (policlonal, ab68435, ABCAM)	Tampão Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH: 9,0 (Banho Maria 96-99°C) x 30 minutos	1:1500, 1 hora x 37°C e 15-18 horas 4°C	Novolink

3.6.1. Análise quantitativa morfométrica das células imunomarcadas

Os cortes histológicos processados pela reação de imuno-histoquímica foram analisados em microscópio ótico acoplado a um microcomputador empregando-se o programa AxioVision 4.8. Para isto, foram fotografados 10 campos de cada corte histológico (objetiva 40×) e as células imunomarcadas em castanho foram quantificadas utilizando o programa ImageJ, sendo que sua média dos 10 campos foi dividida pela área da foto (0,03536412 mm²) para determinação da densidade de células positivas.

3.7. Análise estatística

Para os aspectos clínicos e epidemiológicos, assim como as alterações histopatológicas observadas nas lesões de pele dos pacientes acometidos com LCL foi feita uma análise descritiva dos dados observados utilizando os programas Microsoft Excel 2016 e Microsoft Access 2016 (Microsoft Company).

Para a análise estatística dos resultados obtidos nas reações de imuno-histoquímica foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. Para determinar os testes estatísticos a serem utilizados foi realizado um teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para analisar a diferença entre os diferentes grupos foi realizada o teste T para

os dados com distribuição Gaussiana e o teste de Mann-Whitney para os demais. Com o objetivo de correlacionar os diferentes marcadores, foi realizado o teste de correlação de Pearson para os dados com distribuição gaussiana e o teste de correlação de Spearman para os dados com distribuição não gaussiana. Os gráficos foram feitos utilizando o programa Origin 8.0.

4. CAPÍTULO I: ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos

Foram analisadas 46 amostras de pacientes com suspeita clínica de LC, dos quais 71,7% (33/46) correspondem ao sexo masculino e 28,3% (13/46) eram do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi de 33 anos (21-72 anos). O número médio de lesões foi de 2 (1-8 lesões), sendo que 47,8% (22/46) apresentaram lesão única. Quanto ao tempo de evolução da lesão, 52,2% dos casos apresentaram lesões de menos de um mês e 47,8% dos casos, há mais de um mês. O tempo médio de evolução foi de 35 dias (14-90 dias). As lesões foram distribuídas, principalmente nos membros superiores (63%); e o restante nos membros inferiores (18%), face / pescoço (10%), dorso (5%) e abdômen (4%). A maioria dos pacientes era da província do Panamá (84,8%: 39/46), Darién (10,9%: 5/46) e Coclé (4,3%: 2/46) (Figura 8).

Figura 8: Mapa da República do Panamá mostrando a distribuição geográfica das amostras coletadas e a intensidade de casos de LCL no Panamá. Fonte: Departamento de Epidemiologia do Ministério da Saúde do Panamá, 2013.

4.1.2. Diagnóstico laboratorial

Todas as amostras analisadas foram positivas para *Leishmania* sp. pelo menos para um dos testes diagnósticos (critério diagnóstico) e foram caracterizadas como *Leishmania* (V.) *panamensis* (78,3%: 36/46) por PCR-Hsp70 / RFLP (Figura 9).

Figura 9: Caracterização de *Leishmania* (V.) *panamensis* por PCR/RFLP-HSP70 com a enzima Bcc1. 1: Marcador Molecular de 100 pb. 2: Cepa de referência de *Leishmania* (V.) *guyanensis*. 3: Cepa de referência de *Leishmania* (V.) *panamensis*. 4,5,6: Amostras de pacientes com LCL do Panamá.

4.1.2.1. Diagnóstico imunológico, parasitológico e molecular

Das 46 amostras positivas, de acordo com os critérios diagnósticos, os testes avaliados conseguiram detectar: 100% (46/46) dos positivos por IDRM, 60% (28/46) por pesquisa direta de parasitos em esfregaços corados com Giemsa, 93,3% (42/46) por isolamento de promastigotas em meio de cultura bifásico, 100% (46/46) por PCR do subgênero *Viannia* e 78,3% (36/46) por PCR Hsp-70 (Figura 10).

Figura 10: Testes moleculares de PCR *Viannia* e Hsp-70. **A:** PCR subgênero *Viannia* (primers LV-B1) que amplifica a região de 750pb do minicírculo das espécies de *Leishmania Viannia*. MM: Marcador molecular de 100pb. CP: Cepa referência de *L. (V.) panamensis*. CN: Controle negativo. **B:** PCR Hsp-70 (*Heat-shock protein 70* genes: primers F25-R1310) que amplifica na região conservada de *Leishmania* sp. de 1422 pb. MM: Marcador molecular de 1kb. CP1: Cepa referência de *L. (V.) panamensis*. CP2: Cepa referência de *L. (V.) guyanensis*. CP3: Cepa referência de *L. (V.) braziliensis*. CN: Controle negativo.

4.1.2.2. Diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico

Na análise histopatológica (HP), 48% (22/46) das amostras foram positivas para identificação de formas amastigotas após a avaliação microscópica dos cortes histológicos. Em pacientes com lesões de LCL de 30 dias ou menos (lesões precoces), 11 amostras foram positivas e 13 negativas; e em pacientes com lesões de mais de 30 dias

de infecção (lesões tardias), 11 foram positivos e 11 negativos. O parasitismo variou entre discreto (+) a intenso (+++) nos dois grupos, com lesões precoces e tardias.

Na análise imuno-histoquímica (IHQ), a presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* foi observada em 76,1% (35/46) das amostras. O parasitismo tecidual variou de negativo (23,9%: 11/46) a positivo discreto 1+ (21,7%: 10/46), positivo moderado 2+ (17,4%: 8/46), positivo intenso 3+ (28,3%: 13/46) e positivo muito intenso 4+ (8,7%: 4/46), com uma média $\pm$ erro padrão de $475,6 \pm 135,4$ amastigotas/mm², na análise morfométrica quantitativa. Já na análise HP, 32,6% das amostras (15/46) mostraram parasitismo de 1+, 6,5% (3/46) de 2+ e 8,7% (4/46) de 3+. A Figura 11 mostra uma comparação entre o parasitismo tecidual por HP e IHQ. A porcentagem de concordância entre IHQ e HP foi 75% (IC 27%-66%). A concordância entre os resultados positivos foi 65,7% (IC 95%: 49,1% – 79,2%) e entre os resultados negativos 100% (95% IC: 77,2 – 100%). O índice Kappa entre os resultados dos testes mostrou uma moderada concordância ($k=0,509$). Todos os resultados positivos por HP foram positivos por IHQ.

Figura 11: Cortes histológicos de lesão de pele de pacientes acometidos por LCL evidenciando formas amastigotas de *Leishmania* (setas vermelhas) por HP empregando coloração de hematoxilina-eosina (A) e por imuno-histoquímica corado com DAB (B).

4.1.2.3. Análise da sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos

Para mostrar que a IHQ pode ser uma ferramenta complementar para o diagnóstico da Leishmanioses e que pode melhorar a sensibilidade da HP foi feito a comparação dos diferentes testes diagnósticos usados no Panamá. Os resultados de cada teste foram comparados com o critério diagnóstico usado pelo Centro de Referência para o Diagnóstico de Leishmaniosis no Panamá, onde uma amostra é considerada positiva a LC quando a amostra é positiva pelo menos para um dos testes diagnósticos (cultura, esfregaço ou PCR *Viannia*). Segundo nesta consideração, a IDRM mostrou 100% de sensibilidade e 66,7% de especificidade; o esfregaço com Giemsa apresentou 60% de sensibilidade e 100% de especificidade; e a cultura mostrou uma alta sensibilidade (93,3%) e especificidade (100%). Para os testes moleculares, o PCR *Viannia* teve 100% para todos os parâmetros, e para o PCR Hsp-70 foi 78,3% de sensibilidade e 100% de especificidade. Para a HP foi observada uma baixa sensibilidade (48%) e 100% de especificidade, e a IHQ mostrou uma melhor sensibilidade (76,1%) e a mesma especificidade (100%) da HP (Tabela 2).

Tabela 2: Sensibilidade e especificidade da IDRM, esfregaço, cultura, PCR *Viannia*, PCR HSP-70, histopatologia (HP) e imuno-histoquímica (IHQ).

Parâmetros	IDRM (IC 95%)	Esfregaço (IC 95%)	Cultura (IC 95%)	PCR <i>Viannia</i> (IC 95%)	PCR Hsp70 (IC 95%)	HP (IC 95%)	IHQ (IC 95%)
Sensibilidade	100% (92,1-100)	60% (44,3-74,3)	91,3% (81,7-98,6)	100% (92,3-100)	78,3% (65,4-90,4)	50% (35-65)	76,1% (62,1-86,1)
Especificidade	56,7% (20,8-93,9)	100% (44-100)	100% (44-100)	100% (34,2-100)	100% (43,9-100)	100% (85-100)	100% (34,2-100)

4.2.Discussão

O diagnóstico preciso do parasito *Leishmania* sp. é importante para o tratamento adequado do paciente e para a vigilância epidemiológica da LCL (MIRANDA et al., 2012). Segundo a OMS, novas e melhores abordagens diagnósticas e metodologias alternativas são necessárias para o controle da LCL (OPAS/OMS, 2013). Nesse sentido, comparamos o teste de IHQ com os testes IDRM, esfregaço, cultura, HP, PCR *Viannia* e PCR Hsp-70, atualmente usados no Panamá para diagnosticar a LC. Foram analisadas 46 amostras de pacientes com suspeita clínica de LC, das quais todas foram positivas para *L. (V.) panamensis*.

Os testes histopatológicos são baseados na observação de amastigotas do parasito *Leishmania* em seções de tecido de parafina coradas com Hematoxilina-Eosina e Giemsa. Foi relatado que a sensibilidade da análise histopatológica é geralmente baixa (HANDLER et al., 2015; XAVIER et al., 2006; YUIL et al., 2012). Em nosso estudo, a sensibilidade da HP foi 48%, concordando com outros estudos (BENICIO et al., 2011; QUINTELLA et al., 2009; XAVIER et al., 2006).

Os testes de IHQ tornaram-se uma das técnicas mais importantes na caracterização de infecções humanas, como a Leishmaniose. A IHQ nos permite identificar o antígeno nos tecidos e avaliar a resposta imune dos pacientes (ALVES et al., 2013; QUINTELLA et al., 2009). No presente estudo, a IHQ mostrou uma sensibilidade de 76,1%, semelhante a outros estudos em que a sensibilidade variou de 58% a 91,8% (QUINTELLA et al., 2009; SCHUBACH et al., 2001). Entre os testes analisados neste estudo, a IHQ apresentou a quinta maior sensibilidade (76,1%). PCR *Viannia* (100%), IDRM (100%), cultura in vitro (91,3%) e PCR Hsp-70 (78,3%) foram os testes com sensibilidade superior.

Técnicas de imunocoloração são usadas para aumentar a sensibilidade da HP (QUINTELLA et al., 2009; RÍOS, 2010). Nesse sentido, a IHQ é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de LCL, facilitando a observação de amastigotas nos tecidos e evitando confusões na identificação do parasito, melhorando a qualidade do diagnóstico (KENNER et al., 1999; QUINTELLA et al., 2009; RÍOS JM, 2010). Em nosso estudo, as quantidades de amastigotas detectadas pela HP e IHQ no tecido foram comparadas, e observou-se que 56% das amostras positivas detectadas pela IHQ apresentaram maiores quantidades de formas amastigotas do parasito quando comparadas à HP. Foi possível determinar amostras com uma quantidade de amastigota de 4+ pela IHQ, enquanto quantidades de apenas 3+ foram detectadas pela HP.

Em nosso estudo, a sensibilidade da HP (48%) melhorou combinando-o com a IHQ (76,1%). Ao comparar a HP com o IHQ, obteve-se uma correlação moderada ($k = 0,509$), e todas as amostras confirmadas como positivas pela HP também foram confirmadas como positivas pela IHQ.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a IHQ é um método diagnóstico útil e sensível para a detecção de amastigotas nas lesões de pacientes com LCL quando utilizados em amostras processadas corretamente, contribuindo para a melhoria do diagnóstico parasitológico. Atualmente, no Panamá, temos o equipamento e a infraestrutura necessários para realizar análises de IHQ em hospitais que realizam diagnóstico histopatológico de rotina. Além disso, a implementação do IHQ é importante para a realização de estudos futuros que avaliem a resposta imune de pacientes no Panamá com leishmaniose causada por *Leishmania* spp.

5.CAPÍTULO II: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

5.1.Resultados

A análise histopatológica das 46 biópsias cutâneas de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial para LCL por *L. (V.) panamensis* mostrou alterações morfológicas tanto na epiderme quanto na derme. As alterações da epiderme foram observadas em 85% (39/46) das biópsias cutâneas; e foram caracterizadas principalmente por acantose em 41% (19/46), espongiose em 39% (18/46), exocitose em 35% (16/46), paraqueratose em 17% (8/46) e hiperplasia pseudoepiteliomatosa em 7 % (3/46) dos casos (Figura 12). A presença de úlceras de fundo, borda e superfície da epiderme foi observada em 43% (20/46) das biópsias cutâneas (Tabela 3). No entanto, as alterações histopatológicas na derme superficial e profunda ocorreram em 100% dos casos e foram caracterizadas principalmente por infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário de intensidade variável com distribuição difusa ou focal.

O infiltrado inflamatório mostrou-se intenso em 39% (18/46), moderado em 57% (26/46) e leve em 4% (2/46) dos casos; com distribuição difusa em 37% (17/46) e focal em 63% (29/46) dos casos. Os infiltrados mais leves foram preferencialmente observados na derme superficial com tendência de distribuição perivascular. O infiltrado inflamatório caracterizou-se por predominância de linfócitos (61%), seguidos por histiócitos (22%) e células plasmáticas (20%). Esboço granulomatoso ou presença de granulomas epitelioides bem formados, foi observado em 46% (21/46) dos casos, com presença de células gigantes multinucleadas em 24% (5/21) e área de necrose focal em 14% (3/21) destes casos.

A presença de formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de macrófagos foi observada em 48% (22/46) de cortes histológicos coradas com HE e a carga parasitária variou de leve, moderada a intensa (Tabela 4). As formas amastigotas foram observadas

em vacúolos fagocíticos de histiócitos, visíveis com coloração HE (Figura 13). O parasitismo apresentou distribuição variável, tanto na derme superficial como na média e mesmo na profunda e gordura subcutânea, com sinais ocasionais de endarterite. De acordo com a predominância das diferentes células inflamatórias e o tipo de resposta inflamatória do tecido dérmico, foi possível classificá-las em três padrões histopatológicos: infiltração linfohistiocítica em 50% (23/46), infiltração linfoplasmocítica em 61% (28/46) e reação granulomatosa em 46% (21/46), sendo esta última encontrada tanto no infiltrado linfohistiocítico como no linfoplasmocítico. Estes padrões não são independentes, frequentemente pode ser observado combinação deles nos mesmos casos (Figura 14). Com relação a densidade parasitária encontrada nos diferentes padrões histopatológicos descritos, observou-se uma maior densidade de parasitos no padrão linfohistiocitário ($923,9 \pm 243,5$ células/mm²) quando comparado com o padrão linfoplasmocitário ($140,0 \pm 64,54$ células/mm²) ($p < 0,01$).

Figura 12: Seção histológica de parafina da lesão cutânea de paciente afetados por LCL causada por *L. (V.) panamensis* mostrando: **A** - acantose (seta preta), **B** - espongiose (seta amarela) e exocitose linfohistiocítico (seta azul). (Coloração com hematoxilina e eosina).

Figura 13: Corte histológico mostrando formas amastigotas de *Leishmania* dentro dos vacúolos de macrófagos na derme de pacientes afetados por LCL causada por *L. (V.) panamensis* (setas vermelhas). (Coloração com hematoxilina e eosina).

Figura 14: Cortes histológicos mostrando os padrões inflamatórios observados em lesões cutâneas causadas por *Leishmania (V.) panamensis*. **A** - Padrão inflamatório linfocistiocítico intenso e difuso. **B** - Padrão inflamatório linfoplasmocítico intenso. **C** - Padrão inflamatório granulomatoso. **D** - Presença de células gigantes multinucleadas observadas na reação granulomatosa (coloração com Hematoxilina-Eosina).

Tabela 3: Achados histopatológicos observados na epiderme de amostras de tecido cutâneo de pacientes com LCL causada por *Leishmania (V.) panamensis* no Panamá.

EPIDERME						
	Úlcera	Acantose	Espongiose	Exocitose	Paraqueratose	Hiperplasia
Número	20/46	19/46	18/46	16/46	8/46	3/46
Porcentagem (%)	43	41	39	35	17	7

Tabela 4: Achados histopatológicos observados na derme de pacientes com LCL causada por *Leishmania (V.) panamensis* no Panamá.

DERME – INFILTRADO INFLAMATÓRIO										
	INTENSIDADE			DISTRIBUIÇÃO		TIPO CELULAR				Amastigota
	Intenso	Moderado	Discreto	Difuso	Focal	*PMN	Linfócito	Plasmócito	Macrófago	
Número	18/46	26/46	2/46	17/46	29/46	38/46 (-)	0/46 (-)	2/46 (-)	1/46 (-)	24/46 (-)
						8/46 (+)	2/46 (+)	14/46 (+)	19/46 (+)	15/46 (+)
						0/46 (++)	15/46 (++)	20/46 (++)	15/46 (++)	2/46 (++)
						0/46 (+++)	29/46 (+++)	10/46 (+++)	11/46 (+++)	5/46 (+++)
Porcentagem (%)	39	57	4	37	63	83 (-)	0 (-)	4 (-)	2 (-)	52 (-)
						17 (+)	4 (+)	30 (+)	41 (+)	33 (+)
						0 (++)	33 (++)	44 (++)	33 (++)	4 (++)
						0 (+++)	63 (+++)	22 (+++)	24 (+++)	11 (+++)

* PMN: Polimorfonuclear

5.2.Discussão

A leishmaniose é considerada uma doença espectral com múltiplas características clínicas e imunopatológicas em humanos, dependendo da imunidade e das características genéticas do hospedeiro, assim como da espécie de parasito (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). No Panamá, a espécie mais prevalente de parasito que causa infecção cutânea humana é a *Leishmania (V.) panamensis* (CHRISTENSEN et al., 1983; VÁSQUEZ, 1998). Embora, a infecção por *L. (V.) panamensis* leve a uma infecção, geralmente cutânea, que pode ser recorrente ou crônica, e também pode causar a forma mucocutânea (EHRLICH et al., 2014).

O diagnóstico clínico dessas lesões pode ser complicado, mesmo para médicos experientes no reconhecimento e tratamento dessa doença parasitária. Por outro lado, é comum o envio de amostras histológicas de pacientes com suspeita de lesões de LCL para as unidades de patologia, pelo menos nas instituições de saúde que possuem esse serviço no Panamá. Essa ação leva o problema do diagnóstico para o patologista que deve ter experiência anterior e/ou experiência acadêmica relacionada. No entanto, estudos que objetivam caracterizar os achados histopatológicos de LCL no Panamá são escassos e, conseqüentemente, necessários para o apoio diagnóstico e prognóstico dessas infecções parasitárias tão frequentes neste país (THORNBURGH; JOHNSON; ELTON, 1952). Em relação à análise histopatológica das lesões cutâneas, a descrição das alterações histológicas observadas na derme e epiderme, têm sido pobremente relatadas no Panamá.

Em nosso estudo, formas amastigotas foram detectadas apenas em 48% (22/46) dessas biópsias. As formas amastigotas identificadas nos histiócitos apresentaram distribuição variável ao longo das camadas superficial, média e profunda da derme. Esta sensibilidade

diagnóstica relativamente baixa também foi relatada em estudos com outras espécies de *Leishmania* presentes na América do Sul (ALVES et al., 2013; QUINTELLA et al., 2009; RAMÍREZ et al., 2000; XAVIER et al., 2006). No entanto, nesses relatos anteriores, considerou-se que os exames histopatológicos foram importantes para descrever o infiltrado inflamatório associado à leishmaniose (SILVEIRA et al., 2004). Segundo a literatura, a histopatologia é geralmente o método com menor sensibilidade diagnóstica (30%-60%) para LCL (QUINTELLA et al., 2009; RÍOS JM, 2010; YUIL et al., 2012). Existem várias razões que podem explicar as dificuldades do diagnóstico de LCL pela análise histopatológica; uma delas seria o estadiamento da infecção, uma vez que, nos estágios mais tardios da infecção cutânea, quando predominam os granulomas, os histiócitos cheios de parasitas desaparecem gradualmente (HOFMAN et al., 2003; RÍOS, 2010). Neste sentido, tem sido relatado que os parasitos são muito difíceis de ser encontrados em biópsias de lesões com 5-7 meses de evolução (SALDANHA et al., 2017; VENKATARAM, 2001). Em nosso estudo, avaliamos 23 pacientes com lesões precoces (≤ 30 dias) e 22 com lesões tardias (31-90 dias); e, não encontramos diferença estatística entre os grupos quanto à detecção de amastigotas e carga parasitária. Outra razão para a baixa sensibilidade do exame histopatológico seria a presença de infecções oportunistas na mesma lesão ou na mesma célula nas áreas necróticas, dificultando a observação das formas amastigotas. O mesmo acontece quando os parasitos estão livres no tecido conjuntivo (HOFMAN, MD et al., 2003). Ocasionalmente, a análise histopatológica falha em detectar amastigotas mesmo em lesões precoces (VENKATARAM, 2001) e raramente é relatada na epiderme (GREVELINK; LERNER, 1996).

Inflamação crônica inespecífica e/ou granulomatosa são as principais manifestações histopatológicas da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo (RÍOS, 2010; SOTTO et al., 1989). A infiltração de células plasmáticas e alterações

vasculares são sugestivos, mas não dados de diagnóstico da doença (SOTTO et al., 1989; THORNBURGH, 1952; VENKATARAM, 2001). O diagnóstico específico só é possível através da demonstração do parasito no tecido examinado (MARTINS et al., 2014). Como já mencionado, os parasitos são geralmente escassos e difíceis de demonstrar nas lesões mais crônicas, assim, técnicas de imunocoloração poderiam ser empregadas para aumentar a sensibilidade no diagnóstico da doença (SALDANHA et al., 2017; VENKATARAM, 2001). No entanto, existem estudos, utilizando técnicas de imunomarcção, que demonstram que é possível obter maiores sensibilidades no diagnóstico histopatológico da LC (ALVES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010; XAVIER et al., 2006). Nesse sentido, Sotto et al. (1989) trabalharam com 40 biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea ou mucocutânea na América do Sul, e mostraram a presença de parasitas em 20% das biópsias por técnicas comumente usadas em cortes histológicos corados por HE; enquanto que por imunofluorescência indireta em tecido embebido em parafina, a positividade dos casos aumentou para 89,28% e pela reação de imunoperoxidase foi possível visualizar o parasito em 64,51% das biópsias (SOTTO et al., 1989).

Em nosso estudo, a análise morfológica das lesões de pele mostrou uma carga parasitária variável (discreta a intensa) e um infiltrado inflamatório de intensidade variável com distribuição difusa ou focal. O infiltrado inflamatório foi caracterizado por predomínio de linfócitos, seguido de histiócitos e plasmócitos. A epiderme mostrou acantose, espongiose, exocitose, paraqueratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Além disso, as lesões demonstraram a presença de úlceras, área de necrose focal e granulomas bem organizados. A presença de granulomas bem organizados com células gigantes multinucleadas é um fator que pode ser relacionado à tentativa do sistema imunológico de eliminar os parasitas (BITTENCOURT, 1991). Características histopatológicas

semelhantes foram descritas em estudos anteriores com biópsias obtidas de pacientes infectados com espécies do subgênero *Viannia* (ALVES et al., 2013; BITTENCOURT, 1991; GOMES et al., 2017; MORGADO et al., 2007; SILVEIRA, 2004).

Na maioria das biópsias de pele, 63% (29/46), a resposta inflamatória tecidual mostrou-se, focal, em contraste com o relatado por Isaza et al. (1996) (RESTREPO et al., 1996), onde a resposta inflamatória foi difusa em 62,5% das biópsias de pacientes procedentes de áreas endêmicas do estado de Antioquia, na Colômbia, com LC causada por *L. (V.) panamensis*. Por outro lado, Isaza et al. (1996) descreveram predomínio de macrófagos e linfócitos no infiltrado inflamatório de acordo com nosso estudo. Na epiderme observamos a presença de exocitose em 35% das amostras; característica esta, também foi observada no estudo de Isaza et al. (1996) em 69,5% dos casos. A presença do fenômeno de exocitose enfatiza a importância da epiderme na imuno-regulação da doença (TAPIA et al., 1994).

A classificação do espectro de resposta tecidual para LCL mostra diferentes características com variações em sua descrição na dependência do estudo relatado. Assim, Kurban (1966) (KURBAN, 1966) e Mansour (1993) (MANSOUR, 1993), sugeriram dois padrões histológicos de resposta tecidual em biópsias de pacientes com LCL, o primeiro em lesões menores de um ano com infiltrado difuso e o segundo em lesões maiores de um ano com infiltrado granulomatoso. Já, Venkataram (2001) (VENKATARAM, 2001) relataram quatro padrões histológicos sugestivos de LCL; enquanto que, Magalhães e colaboradores (1986) (MAGALHÃES et al., 1986) e Ridley (1979) (RIDLEY, 1979) descreveram até cinco padrões histopatológicos. No presente estudo, de acordo com o predomínio do tipo celular e o tipo de resposta inflamatória do tecido dérmico, foram identificados três principais padrões histopatológicos: o primeiro com resposta

inflamatória linfo-histiocitária encontrada em 50% das amostras, o segundo com resposta linfoplasmocitária observada em 61% e o terceiro com resposta granulomatosa em 46% das amostras. Estes padrões não são independentes uns de outros, sendo encontrado frequentemente uma combinação deles nos diferentes casos. Azogue e colaboradores (1983) descreveram uma resposta histiolinfoplasmocítica em 66% dos casos de LCL com reação granulomatosa e Magalhães e colaboradores (1986) descreveram que 40,9% dos casos de LCL apresentam uma resposta histiolinfoplasmocítica característica do padrão de reação exsudativa celular, com uma reação granulomatosa desorganizada em 26,1% das biópsias (AZOGUE, 1983; MAGALHÃES et al., 1986). Em contraste, Isaza e colaboradores (1996) não encontraram infiltrado granulomatoso em seu estudo (RESTREPO et al., 1996).

A resposta histopatológica e imunológica do hospedeiro à infecção causada pelo parasito do gênero *Leishmania* depende, em grande parte, da espécie parasitária infectante (MEHREGAN, 1999; SILVEIRA et al., 2009). Neste sentido, Silveira e colaboradores (2009) descreveram o espectro clínico e imunopatológico da LTA, causado pelas diferentes espécies dermatrópicas do parasito responsável pela doença no Novo Mundo (SILVEIRA et al, 2004). Enquanto *L. (V.) braziliensis* apresenta uma clara tendência a levar a infecção a partir de uma leishmaniose cutânea localizada (resposta moderada de hipersensibilidade de células T), na direção da leishmaniose mucocutânea (resposta imune proeminente do tipo Th1). A *L. (L.) amazonensis* apresenta uma tendência oposta, levando a infecção ao polo anérgico de hipossensibilidade das células T e com resposta imune celular do tipo Th2. A resposta imune celular do hospedeiro também influencia o aspecto histopatológico da lesão cutânea. A LCL causada por *L. (L.) amazonensis* mostra um denso infiltrado inflamatório de macrófagos vacuolizados na derme com grande número de formas amastigotas, dando ao infiltrado o aspecto de granuloma macrofágico.

Este aspecto morfológico da lesão cutânea difere dos casos de LCL causada por *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, onde predomina um infiltrado mais modesto de macrófagos com carga parasitária geralmente escassa, porém, linfócitos e plasmócitos são mais frequentes com a presença de granulomas epitelioides bem formados (SILVEIRA et al., 2008, 2009; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004), sendo muito parecido aos resultados obtidos no presente estudo em lesões causadas por *L. (V.) panamensis*. Em resumo, as alterações histopatológicas observadas na LCL causada por *L. (V.) panamensis* no Panamá foram caracterizadas por uma intensa reação inflamatória na derme, com predomínio focal e padrões de apresentação linfocitária, linfo-plasmocitária e granulomatosa; e a presença de úlceras, acantose, exocitose e espongiose na epiderme, concordando com os padrões histopatológicos observados pelas espécies do subgênero *Viannia* causadoras de LCL.

6.CAPÍTULO III: RESPOSTA IMUNE CELULAR

6.1.Resultados

Foram analisadas 46 amostras de biópsias de pele positivas para LCL, com o objetivo de caracterizar a resposta imune celular em pacientes panamenhos por imuno-histoquímica. Para avaliar a resposta imune inflamatória (Th1) e anti-inflamatória (Th2) foram usados os marcadores de linfócitos TCD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺, células “*natural killer*” CD56⁺, Granzima B, macrófagos CD68⁺, células iNOS⁺, células IFN- γ ⁺, células CD20⁺, células CD1a⁺, células CD11c⁺, células IL-10⁺ e células IL-13⁺. Para avaliar a resposta imune regulatória foram utilizados os marcadores de células TCD4⁺, células FoxP3⁺, células IL-10⁺ e células TGF- β ⁺. Também, foi avaliada a resposta imune Th17 através dos marcadores de células TCD4⁺, células IL-17⁺, células IL-6⁺, células IL-23⁺ e células RoR γ t⁺. Por último, foi avaliada a presença do inflamassoma utilizando os marcadores de células Caspase-1⁺, células IL-18⁺ e células IL-1 β ⁺.

6.1.1. Análise da resposta imune inflamatória e anti-inflamatória

A média $\pm$ o erro padrão da densidade de células TCD3⁺ foi de 2593,00 $\pm$ 112,00 células/mm², de células TCD4⁺ foi 914,50 $\pm$ 51,76 células/mm², de células TCD8⁺ foi 1698,00 $\pm$ 66,84 células/mm², de células Granzima B foi de 1019,00 $\pm$ 46,91 células/mm², de células CD68⁺ foi 963,30 $\pm$ 77,94 células/mm², de células iNOS⁺ foi de 808,70 $\pm$ 68,20 células/mm², de células CD20⁺ foi de 1016,00 $\pm$ 87,94 células/mm², de células CD1a⁺ foi de 612,60 $\pm$ 53,98 células/mm², de células CD11c⁺ foi de 983,40 $\pm$ 45,14 células/mm², de células CD56⁺ foi de 361,00 $\pm$ 38,93 células/mm², de células IFN- γ ⁺ foi de 840,50 $\pm$ 72,73 células/mm², de células IL-10⁺ foi de 537,50 $\pm$ 30,94 células/mm² e de células IL-13 foi de 563,7 $\pm$ 42,67 células/mm² (Tabela 5) (Figura 15 e 16).

A análise morfométrica quantitativa dos controles de pele saudável mostrou que a média $\pm$ o erro padrão da densidade de células TCD3⁺ foi de $37,30 \pm 8,13$ células/mm², de células TCD4⁺ foi $46,25 \pm 11,55$ células/mm², de células TCD8⁺ foi $15,87 \pm 6,15$ células/mm², de Granzima B foi de $3,70 \pm 2,49$ células/mm², de células CD68⁺ foi $17,80 \pm 7,97$ células/mm², de células iNOS⁺ foi de $0,10 \pm 0,01$ células/mm², de células CD-20⁺ foi de $12,60 \pm 7,88$ células/mm², de células CD11c⁺ foi de $0,10 \pm 0,01$ células/mm², de células CD1a⁺ foi de $299,10 \pm 37,37$ células/mm², de células CD56⁺ foi de $1,30 \pm 1,11$ células/mm², de células IFN- γ ⁺ foi de $7,22 \pm 3,83$ células/mm², de células IL-10⁺ foi de $13,26 \pm 5,05$ células/mm² e de células IL-13 foi de $7,40 \pm 5,54$ células/mm² (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação entre as densidades celulares dos diferentes marcadores utilizados para avaliar a resposta imune Th1 e Th2 em pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* e pele saudável, empregada como controle.

Marcador	Pele de pacientes com LCL (células/mm ²)	Pele normal (células/mm ²)	p valor
TCD3⁺	2593,00 $\pm$ 112,00	37,30 $\pm$ 8,13	p<0,0001
TCD4⁺	914,50 $\pm$ 51,76	46,25 $\pm$ 11,55	p<0,0001
TCD8⁺	1698,00 $\pm$ 66,84	15,87 $\pm$ 6,15	p<0,0001
Granzima B⁺	1019,00 $\pm$ 46,91	3,70 $\pm$ 2,49	p<0,0001
CD68⁺	963,30 $\pm$ 77,94	17,80 $\pm$ 7,97	p<0,0001
iNOS⁺	808,70 $\pm$ 68,20	0,10 $\pm$ 0,01	p<0,0001
CD-20⁺	1016,00 $\pm$ 87,94	12,60 $\pm$ 7,88	p<0,0001
CD1a⁺	612,60 $\pm$ 53,98	299,10 $\pm$ 37,37	p<0,01
CD11c⁺	983,40 $\pm$ 45,14	0,10 $\pm$ 0,01	p<0,0001
CD56⁺	361,00 $\pm$ 38,93	1,30 $\pm$ 1,11	p<0,0001
IFN-γ⁺	840,50 $\pm$ 72,73	7,22 $\pm$ 3,83	p<0,0001
IL-10⁺	537,50 $\pm$ 30,94	13,26 $\pm$ 5,05	p<0,0001
IL-13⁺	563,7 $\pm$ 42,67	7,40 $\pm$ 5,54	p<0,0001

Figura 15: Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células CD3⁺ (A), células CD4⁺ (B), células CD8⁺ (C), células CD20⁺ (D), células CD11c⁺ (E) e células CD1a⁺ (F) por imuno-histoquímica.

Figura 16 : Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células $CD68^+$ (A), células $iNOS^+$ (B), células $CD56^+$ (C), células $IFN-\gamma^+$ (D), células $IL-13^+$ (E) e células Granzima B $^+$ (F) por imuno-histoquímica.

As densidades celulares dos marcadores utilizados nas lesões de pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* para avaliar a resposta imune celular Th1 e Th2, foram maiores quando comparadas às densidades encontradas na pele saudável ($p < 0,01$); mas não mostrou associação em relação à carga parasitária tecidual, o tempo de

evolução da infecção, o sexo, tampouco com o tipo de resposta tecidual, nem com os padrões histopatológicos descritos neste estudo ($p > 0,05$), com exceção das células IFN- γ^+ que apresentou maior densidade nas lesões com presença de granuloma quando comparado com lesões com ausência de granuloma ($p = 0,0097$) (Figura 17).

Figura 17: Gráfico em box-plot mostrando os valores da média, mediana, quartis, máximo e mínimo do número de células positivas por milímetro quadrado do marcador IFN- γ em biópsias com presença de granuloma (preto) e ausência de granuloma (vermelho). ** $p < 0,01$ diferença significativa entre a densidade de células positivas de biópsias com presença de granuloma e não granuloma.

Figura 18: Gráfico em box-plot mostrando a média, mediana e quartis da densidade de células imunomarcadas em corte histológico de pele de paciente com LCL causada por *L. (V.) panamensis*. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, ns: sem diferença significativa entre os grupos celulares.

Na figura 18, podemos observar que as células predominantes no infiltrado inflamatório das lesões de pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* são os linfócitos T seguidos dos linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, confirmando as observações da análise histopatológica.

Com o objetivo de explorar indicadores de gravidade de doença calculou-se a razão de células CD4/CD8 e T/B. A razão total de células CD4/CD8 foi de 0,54. Com uma distribuição de células CD4/CD8 1:2 em 83% (38/46), CD4/CD8 1:1 em 11% (5/46) e CD4/CD8 2:1 em 6% (3/46). Por outro lado, nos controles de pele normal houve uma inversão da razão de células CD4/CD8 (2,90) quando comparado com as amostras de pele de pacientes com LCL. A razão total de células T/B foi de 2,6 e observou-se uma tendência a diminuir com o aumento do tempo de evolução da lesão. A razão das células

T/B em lesões ≤ 30 dias foi de 2,85 e em lesões > 30 dias foi de 2,14. Nos controles de pele normal a razão T/B foi de 2,87. A razão entre citocinas inflamatória e anti-inflamatória também foi avaliada, a razão IFN- γ /IL-10 foi de 1,56 na lesão de LCL e nos controles de pele normal foi de 0,54; e razão de IFN- γ /IL-13 foi de 1,49 na lesão de LCL e de 0,97 nos controles de pele normal.

A análise de correlação entre as densidades dos diferentes marcadores empregados para avaliar a resposta imune inflamatória (Th1) e anti-inflamatória (Th2) mostrou que houve correlação positiva forte entre o número de células CD3⁺ e o número de células CD4⁺ ($r = 0,797$; $p < 0,001$) e CD8⁺ ($r = 0,868$; $p < 0,001$) (Figura 19), assim como entre o número de células CD68⁺ e iNOS⁺ ($r = 0,960$; $p < 0,001$) (Figura 20); e houve correlação positiva moderada entre o número de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD56⁺ com IFN- γ ⁺ ($p < 0,001$) (Figura 21). As células CD11c⁺ mostraram correlação positiva forte com CD4⁺ ($r = 0,760$; $p < 0,001$), CD68⁺ ($r = 0,780$; $p < 0,001$) e CD56⁺ ($r = 0,838$; $p < 0,001$) e correlação positiva moderada com CD8⁺ ($r = 0,717$; $p < 0,001$). Embora não significativa, observou-se correlação inversa entre a densidade de formas amastigotas com a densidade de células CD8⁺ ($r = -0,005$; $p = 0,707$), CD4⁺ ($r = -0,037$; $p = 0,229$) e células IFN- γ ⁺ ($r = -0,092$; $p = 0,490$).

Figura 19: Gráfico de correlação entre os marcadores CD4⁺ e CD8⁺ com CD3⁺. **A.** Correlação positiva entre CD3⁺ e CD8⁺ ($p < 0,001$). **B.** Correlação positiva entre CD3⁺ e CD4⁺ ($p < 0,001$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor

Figura 20: Gráfico de correlação entre os marcadores CD68⁺ e iNOS⁺ ($p < 0,001$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

Figura 21: Gráfico de correlação entre os marcadores CD3⁺, CD4⁺ e CD56⁺ com IFN-γ⁺. **A.** Correlação positiva entre CD8⁺ e IFN-γ⁺ ($p = 0,001$). **B.** Correlação positiva entre CD4⁺ e IFN-γ⁺ ($p < 0,001$). **C.** Correlação positiva entre CD3⁺ e IFN-γ⁺ ($p < 0,001$). **D.** Correlação positiva entre CD56⁺ e IFN-γ⁺ ($p < 0,001$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

Foi observada também correlação positiva moderada entre a densidade de células IL-10⁺ com a densidade de células CD8⁺ ($r = 0,629$; $p < 0,001$) e de células CD4⁺ ($r = 0,632$; $p < 0,001$) (Figura 22); assim como entre a densidade de células IL13⁺ com células CD4⁺ ($r = 0,697$; $p < 0,001$) (Figura 23B); e entre a densidade de células CD8⁺ e de células Granzima B⁺ ($r = 0,531$; $p < 0,001$) (Figura 23A).

Figura 22: Gráfico mostrando correlação entre os marcadores $CD4^+$, $CD8^+$ e $IL-10^+$. **A.** Correlação positiva e moderada entre os marcadores $CD8^+$ e $IL-10^+$ ($p < 0,001$); **B.** Correlação positiva e moderada entre os marcadores $CD4^+$ e $IL-10^+$ ($p < 0,001$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

Figura 23: Gráfico mostrando correlação positiva entre os marcadores $CD8^+$, Granzima B^+ , $CD4^+$ e $IL-13$. **A.** Correlação positiva e moderada entre os marcadores $CD8^+$ e Granzima B^+ ($p < 0,0001$). **B.** Correlação positiva e moderada entre os marcadores $CD4^+$ e $IL-13^+$ ($p < 0,0001$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

6.1.2. Análise da Resposta Imune Regulatória

Para a análise da resposta imune regulatória, foram avaliados os marcadores $TCD4^+$, $FoxP3^+$, $IL-10^+$ e $TGF-\beta^+$, os quais foram evidenciados pela reação de imuno-

histoquímica em todas os casos de lesões cutâneas de LCL causada por *L. (V.) panamensis* (Figura 24).

Figura 24: Corte histológico de lesão de pele de paciente com LCL mostrando células $CD4^+$ (A), células $FoxP3^+$ (B), células $IL-10^+$ (C) e células $TGF-\beta^+$ (D). Seta vermelha indica célula imunomarcada.

A análise morfométrica quantitativa mostrou que a densidade (média $\pm$ erro padrão) de linfócitos $CD4^+$ foi de $914,5 \pm 51,76$ células/mm², $FoxP3^+$ foi de $648,5 \pm 38,03$ células/mm², $IL-10^+$ foi de $537,5 \pm 30,94$ células/mm² e $TGF-\beta^+$ foi de $132,2 \pm 9,50$ células/mm² (Tabela 5) (Figura 25). As densidades celulares destes marcadores foram maiores nas lesões de pele dos pacientes com LCL quando comparados com os controles de pele saudável ($p < 0,0001$) (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação entre as densidades celulares dos marcadores utilizados para avaliar a resposta imune T-regulatória na pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* e as densidades celulares dos mesmos marcadores na pele sadia.

Marcador	Pele de pacientes com LCL (células/mm ²)	Pele normal (células/mm ²)	p valor
TCD4⁺	914,50 ± 51,76	46,25 ± 11,55	p<0,0001
FoxP3⁺	648,50 ± 38,03	3,78 ± 1,72	p<0,0001
IL-10⁺	537,50 ± 30,94	13,26 ± 5,05	p<0,0001
TGF-β⁺	132,20 ± 9,50	0,11 ± 0,01	p<0,0001

Figura 25: Gráfico em box-plot mostrando as médias, medianas e quartis das densidades dos marcadores CD4⁺, FoxP3⁺, IL-10⁺ e TGF-β⁺ em cortes histológicos de pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis*. ****p < 0,0001; ns: sem diferença significativa.

A densidade das células CD4⁺, IL-10⁺, TGF-β⁺ e FoxP3⁺, avaliadas pelo número de células imunomarcadas, não mostrou associação em relação à carga parasitária

tecidual, o tempo de evolução da infecção, tampouco com o tipo de resposta tecidual ($p > 0,05$).

Foi observada uma correlação positiva e forte entre a densidade de células FoxP3⁺ com a densidade de células CD4⁺ ($r = 0,825$; $p < 0,001$) e IL-10⁺ ($r = 0,826$; $p < 0,001$) mas, não foi observada correlação entre a densidade de células FoxP3⁺ e TGF- β ⁺ ($r = 0,291$; $p = 0,077$) (Figura 26).

Figura 26: Gráfico de correlação dos marcadores CD4⁺, FoxP3⁺ e IL-10⁺. **A.** Correlação positiva entre CD4⁺ e FoxP3⁺ ($p < 0,001$); **B.** Correlação positiva entre FoxP3⁺ e IL-10⁺ ($p < 0,001$); **C.** Não correlação entre FoxP3⁺ e TGF- β ⁺ ($p > 0,05$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

6.1.3. Análise da resposta imune inflamatória Th17.

Para avaliar a resposta imune Th17 foram avaliados os marcadores para células $CD4^+$, células $RoR\gamma t^+$, células $IL-17^+$, células $IL-6^+$, células $TGF-\beta^+$ e células $IL-23^+$, os quais foram evidenciadas pela reação de imuno-histoquímica nas lesões de pele dos pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* (Figura 27).

Figura 27: Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células $CD4^+$ (A), células $RoR\gamma t^+$ (B), células $IL-17^+$, (C), células $IL-23^+$ (D), células $IL-6^+$ (E) e células $TGF-\beta^+$ (F). Seta vermelha indica célula imunomarcada.

A média $\pm$ o erro padrão da densidade de células CD4⁺ foi de $914,5 \pm 51,76$ células/mm², de células RoR γ t⁺ foi de $229,20 \pm 13,49$ células/mm², de células IL-17⁺ foi de $859,8 \pm 70,66$ células/mm², de células TGF- β ⁺ foi de $132,2 \pm 9,50$ células/mm², de células IL-6⁺ foi de $273,2 \pm 15,89$ células/mm² e de células IL-23⁺ foi de $669,8 \pm 34,73$ células/mm² (Tabela 6) (Figura 28). Para todos estes marcadores, a densidade celular foi maior nas lesões de pele dos casos de LCL quando comparados aos controles de pele saudável ($p < 0,0001$) (Tabela 6).

Tabela 7: Comparação entre as densidades celulares dos marcadores utilizados para avaliar a resposta imune Th17 na pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* e as densidades celulares dos marcadores na pele sadia.

Marcador	Pele de pacientes com LCL (células/mm ²)	Pele normal (células/mm ²)	p valor
TCD4⁺	$914,50 \pm 51,76$	$46,25 \pm 11,55$	$p < 0,0001$
RoRγt⁺	$229,20 \pm 13,49$	$0,10 \pm 0,01$	$p < 0,0001$
IL-17⁺	$859,80 \pm 70,66$	$18,64 \pm 5,03$	$p < 0,0001$
IL-6⁺	$273,20 \pm 15,89$	$7,31 \pm 2,14$	$p < 0,0001$
TGF-β⁺	$132,20 \pm 9,50$	$0,11 \pm 0,01$	$p < 0,0001$
IL-23⁺	$669,80 \pm 34,73$	$0,10 \pm 0,01$	$p < 0,0001$

Figura 28: Gráfico Box Plot mostrando as comparações das médias, medianas e quartis das densidades dos marcadores CD4⁺, RoRyt⁺, IL-17⁺, IL-6⁺, TGF-β⁺ e IL-23⁺ em cortes histológicos de pele de pacientes com leishmanioses cutânea localizada causada por *L. (V.) panamensis*. **** $p < 0,0001$; ns: sem diferença significativa.

A densidades das células IL-17⁺ foi maior que a densidade das células RoRyt⁺, IL-6⁺ e TGF-β⁺ ($p < 0,0001$), mas não mostrou diferença com a densidade celular de CD4⁺ e IL-23⁺ ($p > 0,05$). (Figura 28).

A densidade das células IL-17⁺, IL-6⁺, TGF-β⁺ e IL-23⁺ não mostrou associação com a carga parasitária tecidual, o tempo de evolução da infecção, o sexo, tampouco com o tipo de resposta tecidual (presença de granuloma ou úlcera) nem com os padrões histopatológicos descritos neste estudo ($p > 0,05$).

Foi observada correlação positiva entre RoRyt⁺ e CD4⁺ ($r = 0,519$; $p < 0,0001$), RoRyt⁺ com IL-17⁺ ($r = 0,362$; $p = 0,01$), IL-6⁺ ($r = 0,453$; $p = 0,002$) e TGF-β⁺ ($r = 0,334$; $p = 0,02$), respectivamente (Figura 29). Além disso, houve uma correlação positiva entre IL-17⁺ com IL-23⁺ ($r = 0,409$; $p = 0,006$), CD3⁺ ($r = 0,314$; $p = 0,03$) e IFN-γ⁺ ($r = 0,435$; p

$< 0,0001$); e uma correlação positiva entre $\text{TGF-}\beta^+$ e IL-6^+ ($r = 0,541$; $p < 0,0001$) (Figura 29). Embora sem diferença estatística significativa, foi observada correlação inversa entre o número de formas amastigotas e o número de células RoRyt^+ ($r = -0,213$; $p = 0,166$) e IL-17^+ ($r = -0,193$; $p = 0,205$).

Figura 29: Gráfico de correlação dos marcadores CD4^+ , RoRyt^+ , IL-17^+ , IL-6^+ , $\text{TGF-}\beta^+$ e IL-23^+ . **A.** Correlação positiva entre RoRyt^+ e CD4^+ ($p < 0,0001$); **B.** Correlação positiva entre RoRyt^+ e IL-17^+ ($p = 0,01$); **C.** Correlação positiva entre RoRyt^+ e IL-6^+ ($p = 0,002$); **D.** Correlação positiva entre RoRyt^+ e $\text{TGF-}\beta^+$ ($p = 0,02$); **E.** Correlação positiva entre

IL-17⁺ e IL-23⁺ ($p = 0,006$); F. Correlação positiva entre TGF- β ⁺ e IL-6⁺ ($p < 0,001$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

6.1.4. Caraterização do inflamassoma

Para avaliar a participação do inflamassoma na resposta tecidual das lesões de pele na LCL por *L. (V.) panamensis* foram feitos e avaliados os marcadores para células IL-1 β ⁺, células IL-18⁺ e células Caspase-1⁺, os quais foram todos evidenciados pela reação de imuno-histoquímica nas lesões cutâneas (Figura 30).

Figura 30: Corte histológico de pele de paciente com LCL mostrando células IL-1 β ⁺ (A), células IL-18⁺ (B) e células Caspase-1⁺ (C). Seta vermelha indica célula imunomarcada.

A média $\pm$ o erro padrão da densidade de células IL-1 β ⁺ foi de $645,9 \pm 72,33$ células/mm², de células IL-18⁺ foi de $73,45 \pm 8,84$ células/mm² e de células Caspase-1⁺

foi de $485 \pm 64,17$ células/mm² (Tabela 7) (Figura 31). As densidades celulares destes marcadores foram maiores nas lesões de pele dos pacientes acometidos por LCL quando comparados aos controles de pele saudável ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 8: Comparação entre as densidades celulares dos marcadores utilizados para avaliar o inflamassoma na pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* e as densidades celulares dos marcadores na pele sadia.

Marcador	Pele de pacientes com LCL (células/mm ²)	Pele normal (células/mm ²)	Valor de “p”
IL-1β	$645,9 \pm 72,33$	$0,10 \pm 0,01$	$p < 0,0001$
IL-18	$73,45 \pm 8,84$	$0,10 \pm 0,01$	$p < 0,0001$
Caspase-1	$485 \pm 64,17$	$0,10 \pm 0,01$	$p < 0,0001$

Figura 31: Gráfico box-plot mostrando as comparações das médias, medianas e quartis das densidades dos marcadores IL-1 β ⁺, IL-18⁺ e Caspase-1⁺ em cortes histológicos de pele de pacientes com leishmanioses cutânea localizada causada por *L. (V.) panamensis*. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$.

A densidade das células IL-1 β ⁺, IL-18⁺ e Caspase-1⁺ avaliadas pelo número de células imunomarcadas, não mostrou associação em relação a carga parasitária tecidual,

o tempo de evolução da infecção, o sexo, tampouco com o tipo de resposta tecidual (presença de granuloma ou úlcera) nem com os padrões histopatológicos descritos neste estudo ($p > 0,05$).

Foi observada correlação positiva entre Caspase-1⁺ com IL-1 β ⁺ ($r = 0,679$; $p < 0,0001$) e IL-18 ($r = 0,600$; $p < 0,0001$) (Figura 32) e correlação positiva entre IL-1 β ⁺ com IL-18 ($r = 0,483$; $p = 0,003$). Embora sem significância estatística, foi observada correlação inversa entre o número de formas amastigotas com o número de células IL-1 β ⁺ ($r = -0,020$; $p > 0,05$) e Caspase-1⁺ ($r = -0,010$; $p > 0,05$).

Figura 32: Gráfico de correlação dos marcadores $IL-1\beta^+$, $IL-18^+$ e Caspase-1⁺. **A.** Correlação positiva entre $IL-1\beta^+$ e Caspase-1⁺ ($p < 0,0001$); **B.** Correlação positiva entre $IL-18^+$ e Caspase-1⁺ ($p < 0,0001$); **C.** Correlação positiva entre $IL-18^+$ e $IL-1\beta^+$ ($p = 0,003$). r = coeficiente de correlação de Spearman, e p = p-valor.

6.2.Discussão

A entrada do parasito no local de infecção através da picada do flebotomíneo no hospedeiro vertebrado, desencadeia mecanismos de defesa que precedem à resposta imune adquirida, através do desenvolvimento da resposta imune inata com a participação de componentes séricos e celulares na tentativa de eliminar o parasito. Porém, em muitos casos, o parasito é capaz de sobreviver à ação do sistema de complemento, imunoglobulinas, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, desencadeando uma resposta imune adaptativa. Existe um tipo de célula que desempenha um papel crucial na patogênese da leishmaniose, que representa o veículo que promove o primeiro contato do antígeno parasitário com a resposta imune adaptativa do hospedeiro, que são as células apresentadoras de antígeno (APC) (SILVEIRA et al., 2008). Entre elas, estão as células de Langerhans e as células dendríticas dérmicas. Elas fornecem uma ligação direta entre a imunidade inata e adaptativa, bem como o controle da diferenciação e polarização das células T. A ativação da resposta imune adaptativa depende, principalmente, destas células. Elas podem reconhecer e internalizar as formas amastigotas que invadem o tecido cutâneo e migram para o linfonodo regional para apresentarem os antígenos parasitários às células efectoras desencadeando uma resposta imune adaptativa no hospedeiro vertebrado que pode ser ligada à resistência ou susceptibilidade à infecção pelo parasito (MAURER, 2009). Em nosso estudo encontramos uma participação moderada de células CD11c⁺ e de células CD1a⁺, quando comparada com os demais marcadores celulares analisados. A densidade de células CD11c⁺ mostrou correlação positiva com a densidade de células CD4⁺, CD56⁺, CD68⁺ (p < 0,001) e CD8⁺ (p < 0,001). Isto sugere uma participação e interação das células dendríticas com os diferentes grupos celulares na ativação da resposta imune desencadeada pela infecção do parasito que pode estar

correlacionada com uma DTH positiva observada na totalidade dos pacientes analisados. Tem sido descrito, um menor número de células de Langerhans em pacientes com LCL causada por *L. (V.) braziliensis* com DTH positiva em relação à pacientes com LCL causada por *L. (L.) amazonensis* com DTH negativa ou menos expressiva; e que nas lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*, quanto mais grave a forma clínica e menor responsividade ao DTH, maior é a densidade de células de Langerhans, ou seja, um aumento progressivo destas células nas lesões de pacientes com a forma cutânea localizada, disseminada e anérgica difusa com DTH negativa, respectivamente (SILVEIRA et al., 2008). Neste estudo, a densidade de células de Langerhans mostrou-se discreta quando comparada com os outros grupos celulares analisados. Para aprofundar este tema seria necessário fazer estudos focalizados na análise de populações e subpopulações de células APC e as citocinas que elas produzem.

Em relação aos outros todos os tipos celulares avaliados no presente estudo, os linfócitos (TCD3) foram as células predominantes no local da lesão dérmica. A predominância de linfócitos T no infiltrado inflamatório de biópsias de lesões cutâneas causadas por *Leishmania Viannia* tem sido descrita em outros estudos (GONZÁLEZ et al., 2018; PALMA, 1997; SILVEIRA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2004); que apontam uma maior densidade de células CD8⁺ entre os outros linfócitos T. As células CD8⁺ têm sido associadas à cura e proteção na leishmaniose cutânea humana e murina (DA SILVA SANTOS, 2014; NOVAIS, 2015; SALAIZA-SUAZO et al., 1999) através de sua função citotóxica, bem como da produção de IFN- γ , um potente indutor de óxido nítrico, mediador que promove a destruição dos parasitos (DA-CRUZ et al., 1994; HERATH; KROPF; MULLER, 2003). Em nosso estudo, foi observada correlação positiva entre as células CD8⁺ e IFN- γ ⁺, mas esta correlação foi maior entre as células CD4⁺ e IFN- γ ⁺, sugerindo envolvimento predominante das células CD4⁺ na produção de IFN- γ auxiliando

no controle do parasitismo tecidual como já foi descrito para outras espécies de *Leishmania* (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014). Por outro lado, foi observada uma correlação positiva entre as células CD8⁺ e Granzima B⁺, sugerindo também o papel das células CD8⁺ no dano tecidual (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Em relação à resposta anti-inflamatória, avaliada pela participação de citocinas Th2, como IL-10 e IL-13, nosso estudo mostrou uma correlação positiva da densidade de células positivas para estas citocinas com a densidade de células CD4⁺, sugerindo ser esta célula uma importante fonte de citocinas anti-inflamatórias na LCL causada por *L. (V.) panamensis*. Essas citocinas estão envolvidas na manutenção da resposta anti-inflamatória e, conseqüentemente, na persistência do parasito nos tecidos (BOURREAU et al., 2003; CASTILHO et al., 2010). Além disso, uma correlação positiva de células CD8⁺ e IL-10⁺ sugere que uma proporção de células CD8⁺ pode estar produzindo IL-10, contribuindo para a resposta anti-inflamatória, conforme foi demonstrado em estudos *in vitro* com *L. (V.) guyanensis* (BOURREAU et al., 2007).

Como indicador da gravidade da doença, a proporção de células CD4 / CD8 foi avaliada. Nosso estudo mostrou diminuição da razão CD4 / CD8 (0,56) quando comparada à pele sadia (2,90), evidenciando o aumento de células CD8⁺ na lesão cutânea causada por *L. (V.) panamensis*. Resultados semelhantes foram observados em LCL causada por *L. (V.) braziliensis* que mostrou razão CD4 / CD8 menor que 1, e relacionou à gravidade da doença (CASTÉS, 1998; FLORES et al., 2013; LAURENCE, 1993). No entanto, foi observado um aumento da razão CD4 / CD8 na lesão cutânea de pacientes com LCL causada por *L. (V.) braziliensis* após tratamento específico (DA-CRUZ et al., 1994). Outro estudo interessante realizado na Bolívia, relatou que a razão CD4 / CD8 foi maior em pacientes infectados por *L. Viannia* que não responderam ao tratamento quando

comparados aos pacientes com boa resposta à terapia (FLORES et al., 2013). Esses dados são úteis para melhor compreensão da imunopatologia da LCL causada por diferentes espécies de *Leishmania* e devem ser considerados em futuros estudos terapêuticos e de manejo.

Independentemente do tipo de célula envolvida no infiltrado inflamatório, é importante avaliar o tipo de resposta imune celular em que essas células estão envolvidas. Nesse sentido, avaliamos a resposta imune inflamatória ou anti-inflamatória em pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis* por meio do número de células positivas para citocinas Th1 e Th2, bem como a razão de IFN- γ / IL-10 e IFN- γ / IL-13. Observamos que a razão IFN- γ / IL-10 foi de 1,56 e a razão IFN- γ / IL-13 foi de 1,49, sugerindo predomínio de resposta imune inflamatória. É importante mencionar que as células NK são outra fonte importante de IFN- γ (DA-CRUZ et al., 1994; NYLEN et al., 2003); mas no presente estudo, foi observado baixo número de células CD56⁺. No entanto, foi observada uma correlação direta entre as células CD56⁺ e IFN- γ ⁺; portanto, apesar do leve envolvimento dessas células na lesão cutânea causada por *L. panamensis*, seu papel não pode ser descartado (GOMES et al., 2017; CUNHA et al., 2016).

A ativação de macrófagos por meio de citocinas inflamatórias, especialmente IFN- γ , está associada ao controle da doença pela produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são os principais mediadores responsáveis pela morte do parasito (GOMES et al., 2017; MONCADA et al., 2017). Nossos dados mostraram uma presença moderada de células CD68⁺, mas uma correlação forte e direta com o número de células iNOS⁺, sugerindo que a maioria desses macrófagos estavam ativados. No entanto, a presença de macrófagos inativados no local da lesão também pode estar associada à persistência do parasito e manutenção da inflamação (BOGDAN et al.,

1996; GOMES et al., 2017). Apesar da presença de células com características morfológicas de macrófagos e iNOS⁺, também foram observados macrófagos sem expressão de iNOS, que podem ser considerados células hospedeiras importantes para a multiplicação e sobrevivência do parasito. Nesse sentido, foi observada correlação positiva entre o número de amastigotas de *Leishmania* e células CD68⁺, semelhante ao estudo relatado por Saldanha e colaboradores (2017) (SALDANHA et al., 2017).

O número de amastigotas é elevado nas lesões papulares iniciais e diminui durante o processo de ulceração, indicando que a formação de úlceras está associada à redução da carga parasitária no local da lesão cutânea (SALDANHA et al., 2017). Porém, em nosso estudo, não foi observada diferença significativa entre o número de amastigotas e o tempo de evolução da lesão e formação das úlceras. Segundo Saldanha e colaboradores (2017), a falta de associação entre a carga parasitária, a área de necrose e o tamanho da úlcera sugere que a carga parasitária não desempenha um papel direto no desenvolvimento da lesão. Portanto, é provável a afirmação proposta de que os antígenos do parasito derivados de amastigotas mortos são capazes de estimular a resposta imune adaptativa, aumentando assim a reação inflamatória (SALDANHA et al., 2017).

Estudos histológicos revelaram uma grande quantidade de células B no infiltrado inflamatório de lesões cutâneas de pacientes colombianos afetados por LCL causada por *L. (Viannia)* (SARAVIA, 1997). Em nosso estudo, foi observada uma quantidade considerável de células B (CD20⁺), e a proporção de células CD3⁺ / CD20⁺ tendeu a diminuir com o tempo de evolução da lesão. No entanto, outros autores descreveram um aumento no número de células B durante a fase crônica da infecção causada por *L. (Viannia)* na leishmaniose cutânea murina e humana (BOMFIM et al., 2007; CASTILHO et al., 2010). Outro estudo relatou que a infiltração de células B no local da infecção

estava relacionada com o desenvolvimento da patologia na infecção por *L. (V.) panamensis* humana (PALMA, 1997; PALMA, 2006). Portanto, sugere-se que as células B contribuam para a patologia da doença por *L. (V.) panamensis*, porém mais estudos são necessários para avaliar em detalhes o papel desse tipo celular na LCL causada por *L. (V.) panamensis* (CASTILHO et al., 2010).

Espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* são conhecidas por induzirem intensa resposta inflamatória em pacientes com LCL e, portanto, mecanismos imunomoduladores são necessários para o controle do processo inflamatório (EHRLICH et al., 2014). A presença de células Tregs na lesão cutânea pode estar relacionada ao controle da resposta inflamatória exacerbada e à patologia da doença. A ativação das células Treg ocorre por meio de uma interação direta entre as células apresentadoras de antígenos e as células T, que podem ser moduladas pela presença de citocinas como IL-10 e TGF- β (BELKAID, 2003; BELKAID, 2009). Embora se saiba que as células Treg podem contribuir para a persistência do parasita na leishmaniose, elas não desempenham papel igual na infecção por diferentes espécies de *Leishmania* (RODRIGUES et al., 2014). Recentemente, foi descrito que pacientes infectados com *L. (V.) panamensis* apresentaram diminuição da funcionalidade das células Treg durante a infecção, mas sua capacidade supressora foi restaurada após tratamento bem-sucedido (RODRIGUEZ-PINTO et al., 2012). Também foi relatado que a depleção experimental de células Treg durante a infecção levou à exacerbação da doença, e também que o aumento temporal de células Treg leva ao controle da doença ao apontar o papel benéfico dessas células (EHRLICH et al., 2014). Neste estudo, demonstramos a presença de células Treg em pacientes com LCL pelo marcador FoxP3 positivo, mas não evidenciamos seu papel protetor. Além disso, observamos uma correlação positiva entre as células FoxP3⁺ e as células IL-10⁺, mas nenhuma correlação foi demonstrada com as células TGF- β ⁺. Esses dados sugerem que

as células Tregs estão regulando principalmente pela ação da IL-10, conforme demonstrado em estudos com *L. (V.) guyanensis*, onde o papel supressor das células Treg é mediado principalmente pela ação da IL-10 (BOURREAU et al., 2007, 2009).

Em conjunto, nossos dados mostraram que a LCL causada por *L. (V.) panamensis* desencadeia uma resposta imune celular mista, caracterizada pela presença de elementos pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e reguladores na lesão cutânea. Apesar da grande quantidade de células $\text{IFN-}\gamma^+$ e células iNOS^+ que podem estar contribuindo para o controle do parasitismo tecidual, há evidências de dano tecidual e persistência do parasito, provavelmente relacionado a células citotóxicas e citocinas anti-inflamatórias. Esta resposta imune celular mista foi relacionada aos aspectos clínicos observados na infecção por *L. (V.) panamensis* (EHRlich et al., 2014).

Estudos recentes têm mostrado a participação das células Th17 e do inflamassoma na resposta imune contra infecção por *Leishmania* sp. Ambos fatores contribuem para a produção de citocinas pró-inflamatórias favorecendo a resposta inflamatória no local da infecção (BACELLAR et al., 2009; CASTILHO et al., 2010; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015; ZAMBONI; SACKS, 2019). Entre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 está relacionada à diferenciação das células Th17 e à ativação do inflamassoma (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; LIMA-JUNIOR et al., 2013; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; WILSON et al., 2007; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). As células Th17 ($\text{RoR}\gamma\text{t}$) produzem IL-17 (BETTELLI et al., 2008; LANGRISH et al., 2005), cuja função principal é a indução da inflamação do tecido e proteção do hospedeiro contra patógenos (BETTELLI et al., 2008).

O presente estudo mostrou a presença de células CD4^+ , $\text{RoR}\gamma\text{t}^+$ e IL-17^+ , conforme evidenciado pela imuno-histoquímica, e a análise de correlação linear da

densidade celular destes marcadores mostrou correlação positiva entre eles, sugerindo a presença de células Th17 (CD4⁺ RoRγt⁺) produtoras de IL-17 nas biópsias de pele de pacientes com LCL causada por *L. (V.) panamensis*. A densidade celular das células IL-17⁺ foi maior que a densidade das células RoRγt⁺, indicando que outras células poderiam produzir essa citocina nas lesões cutâneas. De acordo com a literatura, a maior parte da IL-17 produzida na LCL é proveniente principalmente de células TCD4⁺ RoRγt⁺; no entanto, a IL-17 também pode ser secretada por outros tipos de células, como células TCD8, Tγδ, NK e monócitos (BELKAID, 2009). Portanto, no presente estudo, não podemos descartar a possibilidade de que outros tipos celulares, como células Tγδ e linfócitos CD3 duplo negativos, estejam produzindo IL-17 (LOCKHART, 2006).

Foi observado também correlação positiva entre células RoRγt⁺ e células IL-6⁺ e TGF-β⁺ ($p < 0,002$ e $p < 0,02$, respectivamente), o que sugere a participação dessas citocinas na diferenciação das células Th17 (BETTELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006). Também observamos uma correlação positiva entre células IL-1β⁺ e células RoRγt⁺ ($\rho = 0,320$; $p = 0,04$), sugerindo a possível participação de IL-1β no desenvolvimento de células Th17, conforme descrito na literatura (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; WILSON et al., 2007). Além disso, houve correlação positiva entre IL-17 e IL-23 ($p = 0,006$), sugerindo o importante papel da IL-23 na manutenção de células Th17 produtoras de IL-17 (BANERJEE et al., 2016; BETTELLI et al., 2008).

Embora não estatisticamente significativa, foi observada uma correlação inversa entre a densidade de amastigotas e a densidade de células RoRγt⁺ e IL-17⁺, sugerindo seu papel no controle do parasitismo tecidual conforme descrito em estudos murinos, uma vez que IL-17 em sinergia com IFN-γ demonstrou ter um papel importante na resolução da doença causada pelos parasitos de *Leishmania (Viannia)* (CASTILHO et

al., 2010; VARGAS-INCHAUSTEGUI, 2008). No entanto, a presença de IL-17 também tem sido associada à piora da doença devido ao aumento do tamanho da lesão e presença de úlceras (LOPEZ et al., 2009). Infelizmente, no presente estudo, devido à ausência de dados sobre o tamanho da lesão, não conseguimos estabelecer essas correlações e associá-las à gravidade da doença. Apesar da presença de úlceras em 43% das biópsias de pele, não observamos uma correlação que indicasse o papel prejudicial das células Th17, provavelmente devido à presença de outros mecanismos ou citocinas, como o TNF- α , que poderiam estar envolvidos no dano tecidual observado nas lesões cutâneas (ANTONELLI et al., 2005; BACELLAR et al., 2002). É importante ressaltar que as lesões analisadas neste estudo eram relativamente recentes, sendo que a maioria dos pacientes (65%) apresentava lesões com tempo de evolução ≤ 30 dias, variando de 10 a 90 dias. Os resultados sugerem que as células Th17 podem ajudar a eliminar os parasitos por meio da IL-17 na ativação das células do hospedeiro; entretanto, seu papel na progressão da patologia da doença causada por *L. (V.) panamensis* não pode ser desconsiderado.

Uma resposta imune desequilibrada na infecção por *L. (V.) panamensis* envolvendo a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias é responsável pela manutenção da inflamação, que desempenha um papel importante na patogênese da leishmaniose (SILVEIRA et al., 2008; SILVEIRA et al., 2004). Nesse sentido, outras citocinas inflamatórias, como IL-1 e IL-18, que estão diretamente relacionadas à ativação do inflamassoma, poderiam fazer parte desse processo e estar diretamente envolvidas nas lesões cutâneas causadas por essa espécie de parasito (LIMA-JUNIOR et al., 2013; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). Os dados obtidos em nosso estudo mostraram a presença das citocinas IL-1 β e IL-18, além da caspase-1, que são marcadores canônicos para avaliar a presença de ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção por *Leishmania*

(*Viannia*), na resposta inflamatória contra *L. (V.) panamensis* (MARTINON, 2002; ZAMBONI, 2015). Sua presença, evidenciada pela imuno-histoquímica, está correlacionada ao infiltrado inflamatório moderado a intenso observado nas lesões cutâneas de LCL causadas por *L. (V.) panamensis*. Embora a ativação do inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 β levem ao aumento da patologia da infecção murina por *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2018), observamos uma correlação inversa entre a densidade de amastigotas e as densidades de IL-1 β e caspase-1, sugerindo o papel do inflamassoma no controle da infecção por *L. (V.) panamensis* conforme descrito anteriormente (LIMA-JUNIOR et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

A ativação do inflamassoma demonstrou ser importante para a restrição da replicação do parasito em um modelo murino de infecção induzida por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Essas espécies do parasito *Leishmania* desencadeiam a ativação da caspase-1 em macrófagos, levando à produção de óxido nítrico (NO), importante para a eliminação do parasito. Outro estudo *in vitro* mostrou que a ativação do inflamassoma NLRP3 promove resistência do hospedeiro contra a infecção por *L. braziliensis* através da produção de NO por macrófagos (SANTOS et al., 2013). Embora esses dados sugiram o importante papel do inflamassoma no controle dos parasitos de *Leishmania*, seu papel patogênico na infecção por *L. (V.) panamensis* não pode ser descartado. Estudos futuros sobre o papel do inflamassoma na infecção por *L. (V.) panamensis*, incluindo correlações com a evolução da infecção e envolvimento da mucosa, são necessários.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) panamensis* desencadeia uma resposta imune celular mista *in situ*, com a participação de elementos da imunidade inflamatória, anti-inflamatória e regulatória. Esses achados implementam o conhecimento da patogenia da infecção

causada por esta espécie de parasito e servem de base para futuros estudos na área de prevenção, tratamento e controle, contribuindo para os programas de controle dessa importante doença negligenciada.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- A reação de imuno-histoquímica aumentou a sensibilidade na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* quando comparada a colorações histoquímicas em cortes histológicos, apoiando sua implementação como uma ferramenta para o diagnóstico da leishmaniose cutânea no Panamá.
- As alterações histopatológicas observadas na leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) panamensis* no Panamá foram caracterizadas por reação inflamatória mononuclear moderada na derme de predomínio focal com padrões de apresentação linfo-histiocitária, linfo-plasmocitária e granulomatosa; e presença de úlceras, acantose, exocitose e espongiose na epiderme, concordando com os padrões histopatológicos observados em lesões cutâneas causadas por espécies do subgênero *Viannia*.
- A resposta imune celular foi caracterizada pela predominância de células T relacionadas a produção de IFN- γ e IL-10 (CD4 e CD8) e IL-13 (CD4), porém a participação de células CD8 podem também estar relacionadas ao dano tecidual através da produção de granzima B.
- A participação de resposta imune celular Th17 e de marcadores que caracterizam a presença do inflamassoma, podem estar relacionados a eliminação do parasito, porém sua contribuição para a manutenção do processo inflamatório não pode ser descartada.
- A resposta T-regulatória associada principalmente à produção de IL-10, está presente na lesão cutânea por *L. (V.) panamensis*, corroborando no controle da resposta inflamatória exacerbada.

- Em conjunto, o estudo da resposta imune celular *in situ* nas lesões de pele produzidas pela infecção por *L. (V.) panamensis* mostra a participação de uma resposta tecidual mista que é responsável pela manutenção do processo inflamatório local característico da leishmaniose cutânea localizada causada por esta espécie de parasito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 942–949, 5 set. 2007.

ADLER, S. LEISHMANIA. **Advances in parasitology**, v. 2, p. 35–96, 1964.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.

ALVES, C. F. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63343, 21 maio 2013.

ANTONELLI, L. R. V. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, nov. 2005.

ANTONELLI, L. R. V. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–348, maio 2004.

ARAUJO FLORES, G. V. et al. Evaluation of Regulatory Immune Response in Skin Lesions of Patients Affected by Nonulcerated or Atypical Cutaneous Leishmaniasis in Honduras, Central America. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–7, 21 mar. 2018.

AREND, R. G. Leishmaniasis cutánea (Revisión Bibliográfica). **Revista Médica de Costa Rica y Centro América**, p. 169–172, 2009.

AZOGUE C., E. Diagnóstico histopatológico de la leishmaniasis cutánea y cutáneo-mucosa en Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 1, p. 13–20, mar. 1983.

AZPURUA, J. et al. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e627, 9 mar. 2010.

BACELLAR, O. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, dez. 2002.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, jul. 2009.

BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, nov. 2016.

BARRIO, A. et al. Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 4, p. 636–9, out. 2007.

BATES, P. A. The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 215–218, set. 1994.

BELKAID, Y. The role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Leishmania* infection. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, n. 6, p. 875–885, 3 set. 2003.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 11, p. 875–888, nov. 2007.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 551–589, abr. 2009.

BELOSEVIC, M. et al. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 143, n. 1, p. 266–74, 1 jul. 1989.

BENICIO, E. DE A. et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1141–1144, dez. 2011.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 30 maio 2006.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051–1057, 19 jun. 2008.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51–56, mar. 1991.

BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 4, p. 517–525, ago. 1996.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 1 out. 2001.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–134, jan. 1998.

BOMFIM, G. et al. Cellular Analysis of Cutaneous Leishmaniasis Lymphadenopathy: Insights into the Early Phases of Human Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 854–859, 1 nov. 2007.

BOURREAU, E. et al. Th2 Responses Predominate during the Early Phases of Infection in Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis and Precede the Development of Th1

Responses. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2244–2246, abr. 2003.

BOURREAU, E. et al. IL-10 producing CD8⁺ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 8, p. 1034–1041, jul. 2007.

BOURREAU, E. et al. Intralesional Regulatory T-Cell Suppressive Function during Human Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania guyanensis*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1465–1474, abr. 2009.

BRODSKY, C. I. et al. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 9, p. 4467–73, 1 nov. 1997.

CALZADA, J. E. et al. Cutaneous Leishmaniasis in dogs: is high seroprevalence indicative of a reservoir role? **Parasitology**, v. 142, n. 9, p. 1202–1214, 20 ago. 2015.

CARNEIRO, F. P. et al. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 10, p. 646–651, out. 2009.

CASTÉS, M.; TAPIA, F. J. [Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]. **Acta científica venezolana**, v. 49, n. 1, p. 42–56, 1998.

CASTILHO, T. M. et al. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: Role of IL-13 in disease. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2816–2829, out. 2010.

CASTRO GOMES, C. M. et al. Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania (Viannia) spp.* in Amazonian Brazil. **Parasitology Research**, v. 116, n. 5, p. 1423–1431, 21 maio 2017.

CHRISTENSEN, H. A. et al. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. **Journal of medical entomology**, v. 20, n. 5, p. 463–84, 5 out. 1983.

CHRISTENSEN, H. A.; HERRER, A. *Leishmania braziliensis* in the Panamanian Two-Toed Sloth, *Choloepus Hoffmanni* *. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 6, p. 1196–1200, 1 nov. 1980.

CUNHA, C. F. et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 4, p. 244–254, abr. 2016.

CUNHA, L. D.; ZAMBONI, D. S. Subversion of inflammasome activation and pyroptosis by pathogenic bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. NOV, p. 1–14, 2013.

DA-CRUZ, A. M. et al. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614–2618, jun. 1994.

DA-CRUZ, A. M. et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or

mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 2, p. 251–6, mar. 2002.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in public health**, v. 2, n. September, p. 165, 29 set. 2014.

DE VASQUEZ, A. M.; CHRISTENSEN, H. A.; PETERSEN, J. L. Short report epidemiologic studies on cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 1, p. 54–57, 1 jan. 1999.

DOMÍNGUEZ, M.; TORAÑO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 1, p. 25–35, 4 jan. 1999.

DUTARI, L. C.; LOAIZA, J. R. American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthrophilic *Lutzomyia* sand fly species. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 218, 2014.

EHRlich, A. et al. The Immunotherapeutic Role of Regulatory T Cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 2961–2970, 15 set. 2014.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8 + T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, ago. 2009.

FLORES LEÓN, A. et al. Cuantificación de niveles de INF- γ -IL-13 y células T CD4+, CD8+ en pacientes con leishmaniasis tegumentaria con falla terapéutica Quantifying levels of INF- γ -IL-13 and CD4 + T cells, CD8 + in patients with therapeutic failure leishmaniasis. **Gaceta Médica Boliviana**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2013.

GALLEGO, C. et al. Toll-Like Receptors Participate in Macrophage Activation and Intracellular Control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2871–2879, jul. 2011.

GITHURE, J. I. et al. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 1, p. 31–43, 1 jul. 1990.

GONZÁLEZ, K. et al. Survey of Wild Mammal Hosts of Cutaneous Leishmaniasis Parasites in Panamá and Costa Rica. **Tropical Medicine and Health**, v. 43, n. 1, p. 75–78, 2015.

GONZÁLEZ, K. et al. Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by *Leishmania Viannia panamensis* in Panama. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 15 fev. 2018.

GOTO, H. et al. *Leishmania (Viannia) panamensis* - induced cutaneous leishmaniasis in susceptible and resistant mouse strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 6, p. 475–481, dez. 1995.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 10 abr. 2010.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257–272, fev. 1996.

GUARÍN, N. et al. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. **Biomédica**, v. 26, n. 1, p. 38–48, 2006.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, dez. 2015.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 1, p. 59–72, 1 jan. 1989.

HERATH, S.; KROPF, P.; MULLER, I. Cross-talk between CD8+ and CD4+ T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8+ T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4+ T cells. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 11–12, p. 559–567, nov. 2003.

HERRER, A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the Tropical Porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. **The Journal of Parasitology**, v. 57, n. 3, p. 626, jun. 1971.

HOFMAN, MD, V. et al. Immunostaining of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* Using Monoclonal Antibody (19-11) to the *Leishmania* Homologue of Receptors for Activated C-Kinase. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, n. 4, p. 567–574, 1 out. 2003.

IGYARTO, B. Z.; KAPLAN, D. H. The evolving function of Langerhans cells in adaptive skin immunity. **Immunology & Cell Biology**, v. 88, n. 4, p. 361–365, 16 maio 2010.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, set. 2006.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 ago. 2011.

KENNER, J. R. et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 26, n. 3, p. 130–136, mar. 1999.

KURBAN AK, MALAK JA, F. F. Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis. **Archives of Dermatology**, v. 93, p. 396–401, 1966.

LAINSON, RALPH; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniases in biology and medicine- Biology and epidemiology**. Academic Press: London, v. 1, p. 1- 120., 1987.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 25–33, jun. 2010.

LAINSON R., S. J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology, London.**, v. Vol. 5, n. 9, p. 242–266., 1998.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 17 jan. 2005.

LAURENCE, J. T-Cell Subsets in Health, Infectious Disease, and Idiopathic CD4+T Lymphocytopenia. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, n. 1, p. 55, 1 jul. 1993.

LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 427–434, mar. 2004.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses. Tese (Título de Professor Livre-Docente) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.**

LAWYER, P. G. et al. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae)1. **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 3, p. 347–355, 1 maio 1987.

LIEKE, T. et al. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1898–1909, 9 dez. 2011.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 12, p. 4794–7, 15 jun. 1990.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 9 jul. 2013.

LLANES, A. et al. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia) subgenus*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8550, 24 jul. 2015.

LOCKHART, E.; GREEN, A. M.; FLYNN, J. L. IL-17 Production Is Dominated by $\gamma\delta$ T Cells rather than CD4 T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4662–4669, 1 out. 2006.

LOCKSLEY, R. M. et al. Murine cutaneous leishmaniasis : Susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie**, v. 138, n. 5, p. 744–749, 1 jan. 1987.

LÓPEZ-FUERTES, L. et al. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 251–256, 1 fev. 2010.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 1 mar. 2009.

MACHADO, P. et al. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **European journal of dermatology : EJD**, v. 12, n. 5, p. 449–51, 2002.

MAGALHÃES, A. V. DE et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253–262, ago. 1986.

MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 641–649, 4 jun. 2008.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 30 maio 2006.

MANSOUR, L. et al. A histopathological study of different clinical forms of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 591–7, ago. 1993.

MARKLE, W. H.; MAKHOUL, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. **American family physician**, v. 69, n. 6, p. 1455–60, 15 mar. 2004.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, ago. 2002.

MARTINS, A. L. G. P. et al. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 52–58, jan. 2014.

MAURER, M.; DONDJI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 3, p. 137–146, 25 ago. 2009.

MCMAHON-PRATT, D.; GRIMALDI, G.; TESH, R. B. A Review of the Geographic Distribution and Epidemiology of Leishmaniasis in the New World. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687–725, 1 dez. 1989.

MEHREGAN, D. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 297–304, 6 maio 1999.

MIRANDA, A. et al. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 9, p. 544–548, set. 2012.

MONCADA, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol The Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794–4797, 2017.

MONTALVO, A. M. et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. **Parasitology**, v. 137, n. 8, p. 1159–68, 5 jul. 2010.

MONTALVO, A. M. et al. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1453–1461, 15 jul. 2012.

MORGADO, F. N. et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 1, p. 071018080405005-???, 18 out. 2007.

MUSKUS, C. E.; MARÍN VILLA, M. Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. **Biomédica**, v. 22, n. 2, p. 167, 1 jun. 2002.

MUTISO, J. M. et al. Immunology of leishmaniasis. **Scientia Parasitologica**, v. 14, n. 2, p. 51–61, 2013.

NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 251–259, 24 maio 2015.

NYLEN, S. et al. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 3, p. 457–467, mar. 2003.

OLIVEIRA, M. A. P. DE et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 83–88, abr. 2010.

OPAS/OMS. Segunda reunión de gerentes de programas de leishmaniasis de las Américas. **Us1.1**, p. 1–61, 2013.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. **Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis**. Washington: OPS, 2019.

PALMA, G. I.; SARAIVA, N. G. In Situ Characterization of the Human Host Response to *Leishmania panamensis*. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 19, n. 6, p. 585–590, dez. 1997.

PANDEY, R. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Differential Expression of miRNA Regulates T Cell Differentiation and Plasticity During Visceral Leishmaniasis Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 206, 25 fev. 2016.

QI, H. et al. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 988–95, fev. 2004.

QUINTELLA, L. P. et al. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 83–86, abr. 2009.

RAMÍREZ, C. et al. Human Macrophage Response to *L. (Viannia) panamensis*: Microarray Evidence for an Early Inflammatory Response. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1866, 25 out. 2012.

RAMÍREZ, J. R. et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: the Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3768–3773, out. 2000.

REIS, L. D. C. et al. MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA RESPOSTA CELULAR E HUMORAL NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103–115, 18 out. 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–25, 1 jan. 2007.

RESTREPO, R. et al. Immunocytochemical and Histopathologic Characterization of Lesions from Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania panamensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 4, p. 365–369, 1 out. 1996.

RIDLEY, D. S. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 150–160, jan. 1979.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Pathology**, v. 141, n. 1, p. 83–96, set. 1983.

RÍOS JM, Y. DE R. E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea. **Revista Médico Científica**, v. 23, n. 2, p. 45–60, 2010.

RODRIGUES, F. M. D. et al. Expression of Foxp3, TGF- β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 2, p. 163–171, 7 mar. 2014.

RODRIGUEZ-PINTO, D. et al. Regulatory T Cells in the Pathogenesis and Healing of Chronic Human Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1627, 24 abr. 2012.

RODRIGUEZ-PINTO, D.; SARAVIA, N. G.; MCMAHON-PRATT, D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania (Viannia)* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 108, 25 dez. 2014.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 1, p. 1–7, mar. 2002.

ROGERS, M. et al. Proteophosphoglycans Regurgitated by *Leishmania*-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000555, 21 ago. 2009.

ROJAS, J. I. et al. *Leishmania (Viannia) panamensis*-induced cutaneous leishmaniasis in Balb/c mice: pathology. **International journal of experimental pathology**, v. 74, n. 5, p. 481–91, out. 1993.

ROSEN, G. M. et al. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 2, p. 200–9, fev. 1995.

ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **British medical journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261–2, 14 nov. 1903.

SALAZAR-SUÁZ, N. et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 4, n. 12, p. 801–11, dez. 1999.

SALDANHA, M. G. et al. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 16–0539, 23 jan. 2017.

SAMUDIO, F. et al. Molecular Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 565–571, 1 out. 2009.

SANTOS, D. et al. IL-1 β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1107–1115, maio 2018.

SANTOS, D. M. et al. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 7, p. 985–995, out. 2013.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, mar. 2010.

SCHUBACH, A. et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 987–996, out. 2001.

SILVEIRA, F. T. et al. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1075–1080, nov. 2008.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–31, ago. 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–51, maio 2004.

SOTTO, M. N. et al. Cutaneous leishmaniasis of the new world: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Tropica**, v. 46, n. 2, p. 121–130, mar. 1989.

TAPIA, F. J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M. A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology today**, v. 15, n. 4, p. 160–5, abr. 1994.

THORNBURGH, D. B.; JOHNSON, C. M.; ELTON, N. W. The histopathology of cutaneous leishmaniasis in Panama. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 550–554, set. 1952.

TORRES, R.; BARROETA, S. Tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada con infiltraciones perilesionales de glucantime y lidocaína. **Revista Kasmera**, v. 27, n. 3, p. 1–29, 1999.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, nov. 2007.

VALDERRAMA, A.; TAVARES, M. G.; ANDRADE FILHO, J. D. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1024–1031, dez. 2011.

VALLADEAU, J.; SAELAND, S. Cutaneous dendritic cells. **Seminars in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 273–283, ago. 2005.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 1 dez. 2004.

VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Apoptosis driven infection. **Autoimmunity**, v. 40, n. 4, p. 349–352, 7 jan. 2007.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7537–7545, 1 jun. 2008.

VÁSQUEZ, A. et al. **Informe Final: Estudios Sobre la Epidemiología de la Leishmaniasis Panamá, en la parte Occidental de la República de Panamá. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud, MINSA.** [s.l: s.n.].

VELDHOEN, M. et al. TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p.

179–189, 1 fev. 2006.

VENKATARAM, M.; MOOSA, M.; DEVI, L. Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: a study in Oman. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 67, n. 6, p. 294–8, 2001.

VERGEL, C.; WALKER, J.; SARAVIA, N. G. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 4, p. 423–9, abr. 2005.

VEZZOLI, P. et al. Cutaneous Lymphoid Hyperplasia Associated with *Leishmania panamensis* Infection. **Acta Dermato Venereologica**, v. 90, n. 4, p. 418–419, 2010.

VON STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 340–346, abr. 2007.

WALTERS, L. L. Leishmania Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196–206, mar. 1993.

WHO. **Leishmaniasis.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

WILSON, N. J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 950–957, 2007.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 158, n. 6, p. 2016–23, 1 dez. 1983.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC veterinary research**, v. 2, n. 1, p. 17, 8 jun. 2006.

YANG, L. et al. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T H17 cells. **Nature**, v. 454, n. 7202, p. 350–352, 17 jul. 2008.

YUIL, J. M. R. et al. Comparación entre histopatología y PCR, para diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria. **Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica**, v. 10, n. 1, p. 13–20, 2012.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156–171, 2015.

ZAMBONI, D. S.; SACKS, D. L. Inflammasomes and *Leishmania*: in good times or bad, in sickness or in health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 70–76, 1 dez. 2019.

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice I

(Instrumento de Recolección de Información)

INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD

FICHA HISTORIA DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS

Código_____

1- GENERALIDADES

Fecha _____

Apellido Paterno: Apellido Materno: Nombre:

Fecha de Nacimiento_____ Edad_____ Sexo F____
M_____

Cédula_____

Lugar de Residencia _____

Lugares visitados en los últimos tres meses _____

2- DESCRIPCIÓN DE LA LESIÓN CUTÁNEA

Tiempo de evolución de la lesión_____

Apariencia y tamaño de la lesión _____

Nº y ubicación de la(s) de Lesion(es)

PARA USO DE LOS INVESTIGADORES

3- DATOS DE LABORATORIO

MUESTRA : _____

PRUEBA REALIZADA

RESULTADO

_____ FROTIS:

_____ CULTIVO:

_____ MONTENEGRO:

_____; Tamaño _____ x _____

_____ PCR

_____; Especie de *Leishmania*: _____

RESULTADOS HISTOPATOLOGÍA:

RESULTADOS INMUNOHISTÓQUIMICA:

9.2. Apêndice 2

(Consentimiento Informado)

INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

TITULO DEL PROYECTO: Aplicación de pruebas inmunohistoquímicas como herramienta para el diagnóstico y evaluación de la respuesta inmunológica en pacientes con leishmaniasis tegumentaria, panamá 2012.

Código de paciente: _____

Iniciales: _____ Paciente; _____ Testigo

El Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud en conjunto con el Hospital Santo Tomás están organizando un estudio sobre leishmaniasis tegumentaria en pacientes panameños. La leishmaniasis cutánea también conocida con “Picada de Bejuco” o “Ya Te Vi” es causada por la presencia de parásitos muy pequeños en la piel, los cuales producen una llaga (úlceras) que no se cura. Algunas veces la enfermedad puede extenderse a otras partes del cuerpo o a la nariz.

Nos gustaría invitarlo a participar en este proyecto de investigación. Este es un estudio que busca utilizar nuevas formas para diagnosticar y estudiar el parásito que produce la “Picada de Bejuco” o Leishmaniasis. Pensamos que usted puede tener leishmaniasis tegumentaria, una enfermedad que es causada por un parásito muy pequeño que puede causar llagas (úlceras) como la que tiene usted en la piel. Existen algunas pruebas que se realizan para encontrar el parásito y estudiar cómo usted se defiende contra este parásito. En este estudio esperamos encontrar nuevas alternativas para efectuar un mejor diagnostico y a la vez estamos tratando de aprender más sobre cómo se defiende una persona que está. Para eso es necesario tomar unas muestras de su llaga.

Si usted acepta participar o acepta que su hijo participe en este estudio, le haremos algunas preguntas sobre la salud de su persona o sobre la de su hijo, le haremos un examen médico y luego nos gustaría tomar una muestra. Para ello la lesión de la piel será raspada y se tomará una muestra pequeña de tejido, para ver si usted/su hijo tiene parásitos de Leishmania en sus llagas. Esto se haría de la misma manera que si usted va a otro doctor por la misma razón.

Todos los procedimientos y evaluaciones serán realizados bajo la supervisión de un médico que estará dispuesto a responder cualquier pregunta. Los raspados de la úlcera o la extracción (biopsia de una muestra pequeña (como la punta de un bolígrafo) del tejido. pueden causar un dolor leve en la zona donde se toman las muestras. Estos procedimientos son inofensivos. Puede ocurrir un poco de sangrado pero muy escaso, además de un dolor tolerable y es raro el desarrollo de infección. Si esto sucediera el personal médico responsable colaborador del proyecto brindará la atención médica pertinente inmediatamente. Si tuviera alguna molestia a consecuencia de ello, recibirá tratamiento y se le observará hasta que usted se sienta mejor. Si las pruebas muestran que se encuentran parásitos de Leishmania en su lesión, usted recibirá el tratamiento en el Centro de Salud bajo la supervisión de un médico del mismo.

Con su participación en el estudio usted sabrá si tiene leishmaniasis para que pueda recibir los cuidados y el tratamiento adecuado en su centro de salud. No existe costo alguno por su participación en este estudio. Su nombre no será usado en ningún reporte o presentación de resultados. La información de algún caso relacionado con la enfermedad será compartida por las autoridades médicas para que usted reciba el tratamiento adecuado. Las muestras clínicas obtenidas no serán utilizadas para ningún otro fin fuera de los alcances de este proyecto.

Usted tiene la libertad de decidir si quiere participar o no en el estudio. Si usted decide participar y luego desea retirarse, lo puede hacer en cualquier momento. Si decide no estar más en el estudio o retirarse del estudio recibirá la misma atención. Usted podría consultar con el personal encargado del estudio cualquier pregunta que tuviese acerca de este proyecto de investigación. Los investigadores le informarán a usted cualquier cosa que ellos piensan que le podría afectar.

¿Tiene alguna pregunta respecto al estudio? Si tiene alguna duda acerca de sus derechos en este estudio, por favor póngase en contacto con la Dra. Ruth De León Presidenta del Comité Nacional de Bioética en Investigación, al teléfono 207 5639, 227- 4111 ext. 162 ó al beeper 811 bien sea a lo largo del estudio o en el futuro. Si tuviera otras preguntas o dudas respecto al estudio, puede contactar al Dr. José Calzada al teléfono 527-4811.

Si ha leído esta forma de consentimiento o alguien se la explicó y está de acuerdo con su participación en el estudio, por favor firme aquí abajo.

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____ Fecha: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: _____

Nombre del investigador: _____

Firma del investigador: _____ Fecha: _____

9.3. Apêndice 3

(Asentimiento Informado)

TITULO DEL PROYECTO: Aplicación de pruebas inmunohistoquímicas como herramienta para el diagnóstico y evaluación de la respuesta inmunológica en pacientes con leishmaniasis tegumentaria, panamá 2012.

El Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud y el Hospital Santo Tomás quieren estudiar el parásito que causa la Leishmaniasis aquí en Panamá. Para ello estamos realizando este estudio.

Si estás de acuerdo en participar, te tomaremos una pequeña muestra de la llaga que tienes en la piel para ver si tú tienes el parásito que produce esta enfermedad. Puedes sentir algo de temor o un ligero dolor en el momento que se toma la muestra de la llaga. También puedes sangrar un poquito donde se te tome la muestra.

¿Tienes alguna pregunta sobre este estudio de aplicación de pruebas inmunohistoquímicas para el diagnóstico de la leishmaniasis?

Si estás de acuerdo en participar en este estudio, puedes informarnos verbalmente o puedes escribir tu nombre en el espacio abajo.

	<i>Edad</i>	<i>Fecha</i>
<i>Nombre/firma del niño</i>		

	<i>Fecha</i>
<i>Firma del testigo</i>	

	<i>Fecha</i>
Firma del testigo (consentimiento verbal)	

9.4. Apêndice 4

COORDINACION INSTITUCIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACION

21 de mayo de 2012
NOTA No. 133/CIDI HST

Doctor
AZAEK SALDAÑA
Investigador Principal
Presente

Doctor Saldaña:

El Comité de Bio-Ética de la Investigación ha revisado su protocolo de Investigación: "IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS COMO HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA. PANAMÁ 2012", el cual ha sido aprobado.

Deberá presentar a la Coordinación de Docencia e Investigación lo siguientes:

- Fecha de inicio y de culminación del estudio.
- Reportar el status de su investigación cada mes.
- Indicar de inmediato cualquier adenda a la investigación.
- Reportar de inmediato cualquier efecto adverso severo.
- Describir los riesgos potenciales de las terapias experimentales de la medicación a utilizar en su investigación e informar aquellos que se presenten a lo largo de la investigación.
- Tan pronto finalice la investigación, debe enviar una copia de la publicación y presentar los resultados a la Dirección Médica y a esta Coordinación.

Esperando su pronta respuesta,

Atentamente,

DRA. RITA VASQUEZ
Coordinadora Institucional de
Docencia e Investigación

Excoia

Coordinación Institucional de Docencia, Telefax: 507-5620, Tel. 5075600 Ext.186 – 420-422

"SERVIR CON EFICIENCIA, CALIDAD Y HUMANISMO A TODOS LOS PANAMEÑOS"

9.5. Apêndice 5

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 31/07/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 141/13 intitulado: **“IMUNOISTOQUÍMICA COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR IN SITU EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO PANAMÁ.”** apresentado pelo Departamento de PATOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra “c”).

Pesquisador (a) Responsável: Marcia Dalastra Laurenti
Pesquisador (a) Executante: Kadir Gonzalez

O pesquisador deverá aguardar a aprovação da CONEP para iniciar a pesquisa.

CEP-FMUSP, 01 de Agosto de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

9.6. Apêndice 6

REVISTA
DO
INSTITUTO
DE
MEDICINA
TROPICAL
DE
SÃO PAULO
JOURNAL OF THE SÃO PAULO
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201860008>

Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by *Leishmania Viannia panamensis* in Panama

Kadir González^{1,2}, Rosendo Diaz³, Aurea F. Ferreira², Víctor García³, Héctor Paz¹, José E. Calzada¹, Michelle Ruiz⁴, Márcia Laurenti², Azael Saldaña^{1,5}

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease in the Republic of Panama, caused by *Leishmania (Viannia)* parasites, whose most common clinical manifestation is the presence of ulcerated lesions on the skin. These lesions usually present a chronic inflammatory reaction, sometimes granulomatous, with the presence of lymphocytes, plasma cells and macrophages. This study describes the histopathological characteristics found in the skin lesions of patients with CL caused by *Leishmania (V.) panamensis* in Panama. We analyzed 49 skin biopsy samples from patients with clinical suspicion of CL, by molecular tests (PCR for subgenus *Viannia* and HSP-70) and by Hematoxylin-Eosin staining. Samples were characterized at the species level by PCR-HSP-70/RFLP. From the 49 samples studied, 46 (94%) were positive by PCR and were characterized as *Leishmania (V.) panamensis*. Of these, 48% were positive by Hematoxylin-Eosin staining with alterations being observed both, in the epidermis (85%) and in the dermis (100%) of skin biopsies. The inflammatory infiltrate was characterized according to histopathological patterns: lymphohistiocytic (50%), lymphoplasmacytic (61%) and granulomatous (46%) infiltration, being the combination of these patterns frequently found. The predominant histopathological characteristics observed in CL lesions caused by *L. (V.) panamensis* in Panama were: an intense inflammatory reaction in the dermis with a combination of lymphohistiocytic, lymphoplasmacytic and granulomatous presentation patterns and the presence of ulcers, acanthosis, exocytosis and spongiosis in the epidermis.

KEYWORDS: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania Viannia panamensis*. Histopathology. Panama.

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a zoonotic disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, which infects mammalian reservoirs through the bite of an infected vector of the genus *Lutzomyia* in the New World and *Phlebotomus* in the Old World^{1,2}. Leishmaniasis is among the group of neglected tropical infections, leading to high levels of morbidity mainly among the most vulnerable social groups^{3,4}. In Panama, it is considered an emerging health problem with an estimated 1,000-3,000 new cases per year⁵. In 2011, the Pan American Health Organization (PAHO) reported Panama as the country with the highest incidence of CL per 100,000 inhabitants in the American continent⁶.

CL presents a spectrum of clinical and histopathological manifestations that encompass different morphological states such as a nodule, plaque and ulcer; and which may persist as a chronic lesion or heal with a scar, depending on the infecting parasite species⁷. The lesion may later recur⁸. Commonly, the infection presents

¹Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panama

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia, São Paulo, São Paulo, Brazil

³Hospital Santo Tomás, Departamento de Patología, Panama,

⁴Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Panama

⁵Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias, Panama

Correspondence to: Azael Saldaña
Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Av. Justo Arosemena y calle, 35, 0816-436, Panama

E-mail: asaldana@gorgas.gob.pa

Received: 18 September 2017

Accepted: 17 November 2017

as cutaneous lesions in exposed areas of the patient, being the skin the main affected organ. Once the parasite invades the skin, after the innate immune response, the defense against infection is the cell-mediated immune response, which actively participates in the formation of granuloma eventually limiting the spread of the infectious agent and, in this way, controlling the infection¹.

Because the current CL treatment is complicated and is often associated with drugs that have adverse effects, diagnostic confirmation prior to treatment is important. The main diagnostic data are clinical and epidemiological; however, additional laboratory testing is required for definitive diagnosis. Several diagnostic tests are available to confirm the diagnosis: parasitological, immunological, histopathological, immunopathological and molecular⁹. Histopathological techniques are important because they allow observing the parasite and studying the inflammatory infiltrate that is produced during infection by *Leishmania* parasites^{9,11}. The cutaneous lesion of leishmaniasis is characterized by a chronic inflammatory reaction, sometimes granulomatous, with the presence of lymphocytes, plasma cells and macrophages. *Leishmania* amastigotes are found in the cytoplasm of macrophages as rounded organisms, with a round nucleus, a kinetoplast and surrounded by a clear halo^{9,11,12}. Two histological patterns have been reported in patients with active CL lesions. The first one is a non-specific chronic inflammatory reaction with a diffuse infiltrate of lymphocytes, plasma cells, macrophages, granulocytes and cell debris. The second one, a granulomatous reaction that contains histopathological elements found in a chronic inflammatory reaction, but associated with the presence of epithelioid cells and the formation of granulomas, frequently associated with giant cells. Vasculitis, neuritis and necrosis have also been observed. In scarred lesions, dermal fibrosis and perivascular infiltrates can be found¹³. The first reports of CL in Panama were those described by Darling in 1911¹⁴, Herrick in 1911¹⁵, Darling and Connor in 1911¹⁶ and Bates in 1913¹⁷, who considered the lesions clinically identical to the oriental sore. Fox in 1931¹⁸ summarized the clinical and gross features of the disease as seen in Brazil, but did not stress the histological aspects, which were later summarized by Snow *et al.* in 1948¹⁹. However, there is only one detailed report from 1952 describing the histopathological changes in skin lesions of patients affected by CL in Panamá²⁰. The results showed a rather constant and distinctive histological pattern presented in 20 skin ulcer biopsies due to CL. The cardinal findings of epithelial hyperplasia, poor granulation, intense chronic inflammation of the dermal papillae, inflammatory cells located on sweat glands towards the periphery of the lesion, and lack of blood vessel changes,

differentiate leishmaniasis from most cutaneous ulcers; however, positive diagnosis still requires the demonstration of the presence of parasites²⁰.

Considering that the histopathological characteristics of these lesions, as well as their diagnostic and predictive value have been poorly documented in Panama, this study had the main aim to describe the histopathological findings of cutaneous lesions caused by *Leishmania* (*V.*) *panamensis* in patients from Panama.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This study aimed to describe the histopathological features of skin biopsies from patients with CL in Panama. Patients with suspected CL were attended at the Tropical Medicine Clinic, Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama City. This study was carried out from January 2012 to December 2012. All patients were adults, and accepted, freely and voluntarily, to participate in the study through the signing of informed consents. Patients were biopsied and the histopathological and molecular diagnosis of CL was performed. After CL diagnosis, all patients were treated with meglumine antimonate (GlucantimeTM) in a dose of 20 mg/kg/body weight, intramuscularly for 20 days, according to the Panamanian guidelines for Leishmaniasis control²¹.

Biopsy collection

Forty-nine skin biopsy samples from patients with suspected CL attended at the Tropical Medicine Clinic, Gorgas Memorial Institute of Health Studies, were evaluated. Biopsy specimens were taken with a 5-mm Harris punch (Whatman International Ltd), preceded by the application of local anesthesia and asepsis^{1,22}.

Molecular characterization

DNA extraction from the biopsy samples was performed using the Qiagen QIAmp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Two protocols based on the polymerase chain reaction (PCR) were used: a PCR to identify the subgenus *Viannia* (LV-B1 primers), which amplifies the kDNA region of the minicircle yielding a 750 pb²³ fragment; and the Hsp-70 PCR (F25-R1310 primers) that amplifies a region from the Heat Shock Protein 70 gene yielding a product of 1,286 pb²⁴. In addition, samples were characterized by PCR-Hsp-70/RFLP analysis using the enzymes HaeIII and

BccI to observe the distinct patterns of *Leishmania* species that have been previously described^{25,26}.

Histopathological analysis

All samples were fixed in 10% buffered formalin, and processed within a period of not more than 48 h to dispose of the paraffin tissue block^{27,28}, in the Laboratory of Pathology of Santo Tomas Hospital, Panama city. All tissue samples were dehydrated, cleared, embedded in paraffin, cut into 4–5 µm thick sections and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Giemsa²². Lesion sections were characterized microscopically based on the histological alterations found in the epidermis and in the dermis. At the same time, the intensity and distribution of inflammatory reactions in the dermis were evaluated, as well as the presence of different cell types present in the infiltrate, the formation of granuloma and the parasite load, among other morphological aspects. A comparative, semi-quantitative histopathological analysis of the HE-stained sections was performed, attributing crosses according to the intensity of the different characterized processes: (-) negative, (+) discrete, (++) moderate and (+++) intense²⁹.

RESULTS

Cutaneous lesions of 49 CL-suspected patients were analyzed using molecular and histopathological methods. Of the patients studied, 73% were male and 27% female. Most of the patients (96%) came from the province of Panama. The age range was 23 to 71 years with an average of 41 years old. Evolution time of lesions varied from 10 to 90 days with an average of 30 days. The number of lesions ranged from 1 to 8 with an average of 2 lesions per patient, mostly located in the upper limbs (60%). Out of the total samples, 94% (46/49) were positive by PCR (*Viannia*, Hsp-70). Positive PCR Hsp-70 samples (78%, 36/46) were characterized as *L. (V.) panamensis* by PCR-RFLP analysis.

Forty-eight percent (22/46) of the samples were positive to amastigotes by microscopic evaluation of histological sections. In patients with CL lesions of 30 days or less (early lesions), 11 were positive and 13 were negative; and in patients with lesions of more than 30 days of infection (late lesions), 11 were positive and 11 were negative. Moreover, the amount of parasites varied between discreet (+) and intense (+++) in the two groups. Amastigote forms were observed in typical histiocyte phagocytic vacuoles, visible in HE staining (Figure 1). The parasite load presented a variable distribution in both, superficial and middle dermis and even deeper in the subcutaneous fat, with occasional signs of endarteritis.

Figure 1 - Amastigotes forms of *Leishmania* inside macrophages vacuoles in the dermis of patients affected by localized cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) panamensis* (red arrows). (Hematoxylin-Eosin staining)

The histopathological analysis from the 46 skin biopsies of patients with clinical and laboratory diagnosis of localized CL caused by *L. (V.) panamensis* showed morphological alterations in both, epidermis and dermis. Alterations of the epidermis were observed in 85% (39/46) of skin biopsies; and were mainly characterized by acanthosis in 41% (19/46), spongiosis in 39% (18/46), exocytosis in 35% (16/46), parakeratosis in 17% (8/46) and pseudoepitheliomatous hyperplasia in 7% (3/46) of the cases (Figure 2). The presence of ulcers in the fundus, border and surface of epidermis was observed in 43% (20/46) of skin biopsies (Table 1). However, the histopathological alterations in the superficial and deep dermis occurred in 100% of the cases and were characterized mainly by a lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate of variable intensity, with diffuse or focal distribution. The inflammatory infiltrate was intense in 39% (18/46), moderate in 57% (26/46) and mild in 4% (2/46) of the cases with diffuse distribution in 37% (17/46) and focal in 63% (29/46) of the cases. Milder infiltrates were preferentially located in superficial dermis with tendency of perivascular distribution. The inflammatory infiltrate was characterized by predominance of lymphocytes (61%), followed by histiocytes (22%) and plasma cells (20%). Granulomatous outline or well-formed epithelioid granulomas were observed in 46% (21/46) of the cases, with the presence of multinucleated giant cells in 24% (5/21) and focal necrosis area in 14% (3/21) of these cases. The presence of *Leishmania* amastigote forms in macrophage cytoplasm was observed in 48% (22/46) of HE-stained histological sections and the parasite load varied from mild, moderate to intense (Table 2). According to different inflammatory cells predominance in the dermal tissue response, it was possible to classify them into three

Figure 2 - Paraffin histological section of the skin lesion of a patient affected by localized cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) panamensis* showing in A) acanthosis (black arrow), and in B) spongiosis (yellow arrow) and lymphohistiocytic exocytosis (blue arrow) (Hematoxylin-Eosin staining)

Table 1 - Histopathological findings observed in the epidermis of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) panamensis* in Panama

	EPIDERMIS					
	Ulcer	Acanthosis	Spongiosis	Exocytosis	Paraqueratosis	Hyperplasia
Number	20/46	19/46	18/46	16/46	8/46	3/46
Percentage (%)	43	41	39	35	17	7

Table 2 - Histopathological findings observed in the dermis of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) panamensis* in Panama

DERMIS – INFLAMMATORY INFILTRATE											Amastigote
INTENSITY			DISTRIBUTION			CELLULAR TYPE					
Intense	Moderate	Discrete	Diffuse	Focal	*PMN	Lymphocyte	Plasma cell	Macrophage			
Number	18/46	26/46	2/46	17/46	29/46	38/46 (-)	0/46 (-)	2/46 (-)	1/46 (-)	24/46 (-)	
						8/46 (+)	2/46 (+)	14/46 (+)	19/46 (+)	15/46 (+)	
						0/46 (++)	15/46 (++)	20/46 (++)	15/46 (++)	2/46 (++)	
						0/46 (+++)	29/46 (+++)	10/46 (+++)	11/46 (+++)	5/46 (+++)	
Percentage (%)	39	57	4	37	63	83 (-)	0 (-)	4 (-)	2 (-)	52 (-)	
						17 (+)	4 (+)	30 (+)	41 (+)	33 (+)	
						0 (++)	33 (++)	44 (++)	33 (++)	4 (++)	
						0 (+++)	63 (+++)	22 (+++)	24 (+++)	11 (+++)	

*PMN: Polimorphonuclear

histopathological patterns: lymphohistiocytic infiltration in 50% (23/46), lymphoplasmocytic in 61% (28/46) and granulomatous in 46% (21/46), being the combination of these patterns frequently found (Figure 3).

DISCUSSION

At least 95% of leishmaniasis cases reported in Panama correspond to cutaneous lesions of chronic evolution³⁰. The clinical diagnosis of these lesions is often complicated, even for physicians experienced in the recognition and treatment

of this parasitic disease. On the other hand, it is common to send histological samples of patients with suspected CL lesions to pathology units of reference Panamanian health institutions in which pathologists must have previous experience and academic background. However, studies aimed to characterize CL histopathological findings in Panama are scarce and consequently necessary for the diagnostic and prognostic support of these parasitic infections that are so frequent in this country²⁰.

In this work, evaluation by histopathology of 46 patient's lesions with CL previously characterized by

Figure 3 - Inflammatory patterns observed in cutaneous lesions caused by *Leishmania (V.) panamensis*. A) Intense and diffuse lymphohistiocytic inflammatory pattern; B) Intense lymphoplasmocytic inflammatory pattern; C) Granulomatous inflammatory pattern; D) Presence of multinucleated giant cells observed in the granulomatous reaction (Hematoxylin-Eosin staining)

molecular tests was achieved. However, amastigotes were only detected in 48% (22/46) of biopsies. Amastigotes identified within histiocytes presented a variable distribution along the superficial, middle and deeper layers of dermis. This relatively low diagnostic sensitivity has also been reported in studies with other *Leishmania* species which are present in South America^{10,31-33}. Nevertheless, in these previous reports, it was considered that histopathological tests were important to describe the inflammatory infiltrate associated to leishmaniasis³⁴. According to the literature, histopathology is usually the method with the lowest diagnostic sensitivity (30% -60%) for CL^{9,32,35}. There are several factors that can explain the difficulties of CL diagnosis by histopathological analysis. One of them occurs in the later stages of the cutaneous infection when granulomas predominate and parasite-filled histiocytes gradually disappear^{9,36}. In this regard, it has been reported that parasites are very difficult to find in lesion biopsies with 5-7 months of evolution^{37,38}. Thus, we evaluate 23 patients with early lesions (up to 30 days) and 22 with late lesions (31-90 days). However, we did not find statistical

differences between the two groups regarding amastigote detection and parasite load. Another situation occurs when there are several opportunistic infections in the same lesion or the same cell type in necrotic areas, making it difficult to observe amastigote forms. The same happens when parasites are free in connective tissues³⁶. Occasionally, the histopathological analysis fails to detect amastigotes even in early lesions³⁷ which are rarely reported in the epidermis⁸.

Chronic nonspecific and/or granulomatous inflammation are the main histopathological manifestations of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the New World^{9,39}. The associated infiltration of plasma cells and vascular alterations are suggestive but not diagnostic features of the disease^{20,37,39}. The specific diagnosis is only possible through the demonstration of parasites in examined tissues²⁹. As already mentioned, parasites are generally scarce and difficult to demonstrate in more chronic lesions, thus, immunostaining techniques could be employed to increase the sensitivity of the histopathological diagnosis^{37,38}. However, there are studies, using immunostaining techniques, that demonstrated that it is possible to obtain

higher sensitivities in CL histopathological diagnosis^{10,33,40}. In this sense, Sotto *et al.*³⁹ analyzed 40 biopsies of human patients with cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis in South America, evidencing the presence of parasites in 20% of biopsies in histological sections stained by HE, while by indirect immunofluorescence of paraffin-embedded tissues, the positivity increased to 89.28% and by the immunoperoxidase reaction, it was possible to visualize the parasite in 64.51% of biopsies.

Morphological analysis of lesions showed a variable parasite load (discrete to intense) and inflammatory infiltrates of variable intensity with diffuse or focal distribution. Inflammatory infiltrates were characterized by lymphocytes predominance, followed by histiocytes and plasma cells. The epidermis showed acanthosis, spongiosis, exocytosis, parakeratosis and pseudoepitheliomatous hyperplasia. In addition, lesions demonstrated the presence of ulcers, focal necrosis area and well-organized granulomas. The presence of well-organized granulomas with multinucleated giant cells is a factor related to the immune system attempt to eliminate parasites⁴¹. Similar histopathological features have been described in previous studies which analyzed biopsies obtained from patients infected with species from the *Viannia* subgenus^{33,34,41-43}.

In the present study, 63% (29/46) of the tissue inflammatory response was found to be focal in the tissue, in contrast to data reported by Isaza *et al.*¹, showing that inflammatory response was diffuse (62.5%) in biopsies of patients coming from endemic areas of the State of Antioquia in Colombia. These patients had CL caused by *L. (V.) panamensis*. In addition, Isaza *et al.*¹ described a predominance of macrophages and lymphocytes in the inflammatory infiltrate in accordance with our study. At the epidermis level, we found the presence of exocytosis in 35% of the samples. This cellular process was also observed (69.5%) in the study by Isaza *et al.*¹ The presence of the exocytosis phenomenon emphasizes the importance of the epidermis in the immunoregulation of the disease⁴⁴.

The histological spectrum of CL has had variations in its classification in different types. For example, Kurban *et al.*⁴⁵ and Mansour *et al.*⁴⁶, suggested two histological patterns in biopsies of patients with CL: the first one corresponding to lesions with less than one year of duration associated with a diffuse infiltrate, and the second one corresponding to lesions of more than one year of duration with granulomatous infiltrate. On the other hand, Venkataram *et al.*³⁷ reported four histological patterns suggestive of CL. Moreover, Magalhães *et al.*²² and Ridley *et al.*⁴⁷ described up to five histopathological patterns. In the present study, three main histopathological patterns were identified: the first one with a lymphohistiocytic

inflammatory response found in 50% of samples, the second one with a lymphoplasmacytic response, present in 61% of samples and the third one with a granulomatous response, found in 46% of samples. It is important to mention that sometimes these patterns appear combined. For example, Azogue⁴⁸ describes a histiolymploplasmocytic response in 66% of CL cases associated with granulomatous reactions and Magalhães *et al.*²⁴ described that 40.9% of CL cases had characteristic histiolymploplasmocytic responses with cellular exudative reaction patterns and disorganized granulomatous reactions in 26.1% of biopsies. In contrast, Isaza *et al.*¹ did not find granulomatous infiltrates in his study.

The histopathological and immunological host response to infection caused by parasites of the genus *Leishmania*, depends largely on the infecting parasite species^{7,49}. In this sense, Silveira *et al.*³⁴ described the clinical and immunopathological spectrum of the American CL, caused by different dermatropic species of the parasite responsible for the disease in the New World. While *L. (V.) braziliensis* presents a clear tendency to lead to localized cutaneous leishmaniasis (moderate T-cell hypersensitivity response), progressing to mucocutaneous leishmaniasis (prominent Th1 type immune response), *L. (Leishmania) amazonensis* shows an opposite tendency, leading infection to the anergic T-cell hyposensitivity pole, in association with a Th2 type of cellular immune response. The cellular immune response of the host also influences the histopathological aspect of skin lesions. Localized cutaneous leishmaniasis caused by *L. (L.) amazonensis* shows a dense inflammatory infiltrate of vacuolated macrophages in the dermis with a large number of amastigote forms, giving to the infiltrate the appearance of a macrophagic granuloma. This morphological aspect of the skin lesion differs from the localized cutaneous leishmaniasis cases caused by *L. (V.) braziliensis* and other species of the subgenus *Viannia*, where there is a predominance of a more modest infiltrate of macrophages with a generally scarce parasite load, however, lymphocytes and plasma cells are more frequent in the presence of well-formed epithelioid granulomas^{7,34,50}.

CONCLUSIONS

In conclusion, the histopathological changes observed in localized CL caused by *L. (V.) panamensis* in Panama were characterized by an intense inflammatory reaction in the dermis with diffuse predominance and lymphohistiocytic, lymphoplasmocytic and granulomatous presentation patterns, as well as the presence of ulcers, acanthosis, exocytosis and spongiosis in the epidermis. However,

none of them are specific to establish the diagnosis by histopathology. Under the conditions described above, the sensitivity of the histopathological technique in the diagnosis of CL caused by *L. (V.) panamensis* was 48%.

ETHICAL CONSIDERATIONS

This study was approved by the National Bioethics Committee of Research of the Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama and by the Ethics Research Committee of the Faculty of Medicine of the *University of São Paulo*, Brazil, Protocol N° 141/13.

ACKNOWLEDGMENTS

To the following people who helped in a great way with the accomplishment of this work: Salomón Puga, Roberto Rojas, Aracelis Miranda, Thaise Tomokane. Azael Saldaña and José E. Calzada are members of the SNI-SENACYT, Panamá. Marcia Laurenti is a research fellow from National Research Council (CNPq) grant N° 303098/2014-7. This project was carried out with the support of the *Sistema Nacional de Investigación* (SNI-SENACYT, Panamá) and the *São Paulo Research Foundation* (FAPESP) grants N° 2014/51404-9 and N° 2017/03141-5.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Hector Paz helped with patient sampling and care. Victor García performed the histopathological processing of the samples. José Calzada, Marcia Dalastra Laurenti, Michelle Ruíz and Azael Saldaña assisted in drafting the manuscript and in coordinating the study. Rosendo Díaz and Kadir González are, in the same way, the main authors. Both worked on the processing and analysis of the samples. Azael Saldaña is the corresponding author.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Isaza DM, Restrepo M, Restrepo R, Caceres-Dittmar G, Tapia FJ. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:365-9.
2. Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;41:687-725.
3. Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1:e114.
4. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e313.
5. González K, Calzada JE, Saldaña A, Rigg CA, Alvarado G, Rodríguez-Herrera B, et al. Survey of wild mammal hosts of cutaneous leishmaniasis parasites in Panamá and Costa Rica. *Trop Med Health*. 2015;43:75-8.
6. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Informe final: segunda reunión de gerentes de programas de leishmaniasis de las Américas: Ciudad de Panamá, 8 al 10 de octubre de 2013. Washington: OPS/OMS; 2014.
7. 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;31:423-31.
8. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:257-72.
9. Ríos YJ, Emma YR. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea. *Rev Med Cient*. 2010;23:45-60.
10. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*. 2006;2:17.
11. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73:911-26.
12. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol*. 2002;12:449-51.
13. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:987-96.
14. Darling ST. Oriental sore in Panama. *Arch Intern Med*. 1911;7:581-97.
15. Herrick AB. An unusual type of oriental sore. *Proc Canal Zone Med Assoc Year*. 1911;3:21-5.
16. Darling ST, Connor RC. A case of oriental sore (dermal leishmaniasis) in a native Colombian. *JAMA*. 1911;56:1257-8.
17. Bates LB, Ancon CZ. Leishmaniasis (oriental sore) of the nasal mucosa. *JAMA*. 1913;60:898.
18. Fox H. American leishmaniasis: report of cases observed in Brazil. *Arch Derm Syphilol*. 1931;23:480-502.

19. Snow JS, Satulsky EM, Kean BH. American cutaneous leishmaniasis: report of 12 cases from Canal Zone. *Arch Derm Syphilol.* 1948;57:90-101.
20. Thornburgh DB, Johnson CM, Elton NW. The histopathology of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:550-4.
21. Panamá. Ministério de Salud. Guía para el abordaje integral de la leishmaniasis en Panamá, 2015. Ciudad de Panamá: Ministério de Salud; 2015.
22. Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Classificação histopatológica. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1986;28:421-30.
23. Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:423-9.
24. García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2294-7.
25. Montalvo Alvarez AM, Nodarse JF, Goodridge IM, Fidalgo LM, Marin M, Van Der Auwera G, et al. Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using BclI for hsp70 PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104:364-7.
26. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology.* 2010;137:1159-68.
27. Tresserra F, Martínez Lanao MA, Soler MT. Manejo de las muestras para test inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar.* 2016;29:26-31.
28. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:537-43.
29. Martins AL, Barreto JA, Lauris JR, Martins AC. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *An Bras Dermatol.* 2014;89:52-8.
30. Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, et al. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:565-71.
31. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3768-73.
32. Quintella LP, Cuzzi T, Madeira MF, Okamoto T, Schubach AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania* (*L.*) *chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2009;51:83-6.
33. Alves CF, Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GL, Melo MN, et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. *PLoS One.* 2013;8:e63343.
34. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:239-51.
35. Yuil JM, Saldaña A, Calzada J, Arias J, Díaz R, González K. Comparación entre histopatología y PCR, para diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria. *Dermatol Cosmet Med Quir.* 2012;10:13-20.
36. Hofman V, Brousset P, Mougneau E, Marty P, Lamant L, Antoine JC, et al. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. *Am J Clin Pathol.* 2003;120:567-74.
37. Venkataram M, Moosa M, Devi L. Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: a study in Oman. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2001;67:294-8.
38. Saldanha MG, Queiroz A, Machado PR, Carvalho LP, Scott P, Carvalho Filho EM, et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96:645-52.
39. Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, da Matta VL, de Brito T. Cutaneous leishmaniasis of the new world: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop.* 1989;46:121-30.
40. Oliveira MA, Pires AS, Bastos RP, Lima GM, Pinto SA, Pereira LI, et al. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010;52:83-8.
41. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86:51-6.
42. Morgado FN, Schubach A, Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 2008;158:50-8.
43. Castro Gomes CM, Sousa MG, Menezes JP, Batista MC, Lima AC, Belda Jr W, et al. Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Amazonian Brazil. *Parasitol Res.* 2017;116:1423-31.

44. Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today*. 1994;15:160-5.
45. Kurban AK, Malak JA, Farah FS, Chaglassian HT. Histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol*. 1966;93:396-401.
46. Mansour L, el-Marhoumy SM, Eid MM, Gawish K. A histopathological study of different clinical forms of cutaneous leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 1993;23:591-7.
47. Ridley DS. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73:150-60.
48. Esperanza Azogue C. Diagnóstico histopatológico de la leishmaniasis cutánea y cutáneo-mucosa en Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78:13-20.
49. Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 1999;17:297-304.
50. Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:1075-80.

9.7. Apêndice 7

Parasitology International 71 (2019) 46–52

Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Performance of immunohistochemistry as a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama, Central America

K. Gonzalez^{a,c}, J.E. Calzada^a, R. Díaz^b, H. Paz^a, V. García^b, A. Miranda^a, T. Tomokane^c, S. Puga^a, A. Saldaña^a, M. Laurenti^{c,*}^a Instituto Conmemorativo Gorgas de los Estudios de la Salud (ICGES), Panama^b Laboratorio de Patología, Hospital Santo Tomás, Panama; Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil^c Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cutaneous leishmaniasis
Diagnosis
Immunohistochemistry
L. (V.) panamensis

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is one of the most frequent parasitic zoonoses in Panama. Currently, conventional, molecular and histopathological tests are performed to diagnose CL. Immunohistochemistry (IHC) has proven to be a valuable tool to facilitate the diagnosis of leishmaniasis and to study the cellular immune response developed during the infection. Therefore, considering the absence of IHC in the diagnostic routine in Panama, the objective of this study is to demonstrate the usefulness of this test as a complementary diagnostic tool for improving the sensitivity of histopathology (HP) and helping to study the cellular immune response of patients. Samples from patients with suspected CL were analysed by intradermal reaction of Montenegro (IDRM), smears, culture, PCR (*Viannia*, Hsp-70), HP and IHC. According to the diagnostic criteria, 95.8% of patients were positive for *Leishmania* sp., that was characterized as *Leishmania (V.) panamensis* by PCR-HSP70/RFLP. From positive samples, *Leishmania* was detected by the tested diagnostic methods in the following degrees: 100% by IDRM, 60% by smears, 93.3% by culture, 100% by kDNA PCR, 78.3% by PCR Hsp-70, 50% by HP and 73.9% by IHC. Although IHC had a poor correlation ($k = 0.191$) with the diagnostic criteria, the sensitivities of both HP (76.1%) and smears (89.1%) were improved by combining them with IHC. IHC considerably improved the detection of the *Leishmania* parasites in the histopathological sections, supporting the need to implement this diagnostic tool in Panama. In addition, immunohistochemistry allows evaluation of the patient's immune response and thus provides new guidelines for the treatment and control of CL in Panama.

1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is one of the most frequent parasitic zoonoses in Panama. Approximately 3000 cases are registered annually, but a high underreporting of cases has been described [1,2]. Because no effective measures are currently available to prevent the disease, CL control in Panama relies mainly on the detection, diagnosis and specific treatment of human cases [3]. Treatment is complicated and is usually associated with adverse effects; therefore, the Panamanian Ministry of Health and the Pan American Health Organization recommend confirming the diagnosis before starting therapy [2,4].

A complete identification of the *Leishmania* sp. parasite in human cases has a fundamental importance in deciding the therapeutic scheme, the management of the patient and the prognosis of the disease [2,5,6]. CL diagnosis is not always easy [7], and it must usually be accompanied by clinical-epidemiological analyses and laboratory tests [8]. In the absence

of vaccines and effective preventive measures, diagnostic methods play an important role in the control and adequate treatment of this infection [6–9]. At present, the treatment of most patients in the country with suspected leishmaniasis is based on clinical-epidemiological criteria because a significant number of cases occur in rural and remote areas, where formal health care and resources for laboratory diagnosis are limited; even in the main health centres of the city, clinical-epidemiological diagnosis and histopathology are the only available testing methods, and it is often difficult to clearly observe the parasite using these methods. Therefore, improving the CL diagnostic quality is necessary to implement the treatment guidelines in the different endemic regions of Panama [3].

Laboratory CL diagnosis tests include parasitological, immunological, molecular, histopathological and immunopathological tests [10,11]. In Panama, only parasitological methods, such as lesion smears stained by Giemsa and cultured in biphasic medium and immunological methods, as intradermal reaction of Montenegro (IDRM)

* Corresponding author.

E-mail addresses: kgonzalez@usp.br (K. Gonzalez), mdlaurenti@usp.br (M. Laurenti).<https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.007>

Received 16 October 2018; Received in revised form 28 February 2019; Accepted 7 March 2019

Available online 16 March 2019

1383-5769/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and histopathology using paraffin section stained by haematoxylin-eosin and Giemsa are performed by the country's health institutions for the diagnosis of CL [3,12]. However, not all health institutions perform these tests; in the areas with difficult access to supplies but that possess a microscope and trained personnel, only lesion smears are performed [4,7]. Molecular tests, such as polymerase chain reaction (PCR), are used only in reference centres, such as the Gorgas Memorial Institute of Health Studies [7,10]. Additionally, in research institutions, Hsp-70 PCR is used, which allows the characterization of species through the use of restriction enzymes (RFLP) [13] and histopathological tests are limited to hospitals with pathology units.

Techniques involving immunohistochemistry (IHC) have proven to be valuable tools to facilitate the diagnosis of leishmaniasis, as well as to study the cellular immune response developed during the infection [14,15]. The diagnostic sensitivity of IHC can reach 80%, in each case improving the diagnostic sensitivity of other methodologies, such as histopathology [10,15,16]. To date, IHC has not been used in Panama for the diagnosis of CL. It is necessary to implement immunohistochemistry as a tool to not only improve the diagnosis of CL but also to improve the studies of patient immune responses; currently, no immunopathological studies have been developed in the country to develop new strategies for the control and treatment of CL. Therefore, the objective of the present study is to demonstrate the usefulness of IHC testing as a complementary tool in Panama for the diagnosis of CL and to compare IHC with the current routine diagnostic tests, strengthening the histopathological diagnosis of leishmaniasis and offering clear, up-to-date knowledge of the diagnostic realities when choosing the methodologies implemented in the different levels of health care centres in Panama.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Forty-eight skin scraping and skin biopsy samples from patients with lesions suggestive of CL attending the Clinic of Tropical Medicine at the Gorgas Memorial Institute of Health Studies were analysed. All patients were adults and accepted, freely and voluntarily, to participate in the study through the signing of informed consent. All patients were subjected to the homemade intradermal reaction of Montenegro (IDRM) prepared at the Gorgas Memorial Institute of Health Studies with reference strains of *Leishmania (V.) panamensis* (MHOM/PA/98/WR2306). Skin lesion scrapings were analysed by conventional and molecular tests at the Gorgas Memorial Institute of Health Studies (ICGES), Panama, skin lesion biopsy samples were analysed by histopathology at the Pathology Laboratory of the Hospital Santo Tomás, Panama, and immunohistochemistry was performed at the Laboratory of Pathology of Infectious Diseases of the Medical School, University of São Paulo, Brazil. The biopsy and skin scraping samples were taken from the same lesion to avoid alterations in the comparison test results. After CL diagnosis, all patients were treated with intramuscular glucantime according to the Panamanian guidelines for leishmaniasis control [5].

2.2. Sample collection

2.2.1. Scraping of the cutaneous lesions

To obtain the skin lesion sample, the area surrounding the lesion was cleaned with surgical liquid soap, cleaned with 70% alcohol, and the outer edge of the lesion was scraped with a sterile lancet. A local injectable epinephrine anaesthetic with lidocaine was applied to the subcutaneous tissue with a # 22 hypodermic needle in a volume no > 3 mL. Then, the area was scraped with the blunt edge of a sterile scalpel [3].

2.2.2. Cutaneous biopsy samples

To obtain skin lesion biopsy samples, the area surrounding the lesion was cleaned with surgical liquid soap and then with 70% alcohol. While the lesion was still under an anaesthetic effect, the biopsy was

taken from the outer edge of the ulcer with a punch of 4 mm in diameter, within no > 48 h, the sample was fixed in 10% buffered formalin and placed in paraffin [17–20] to be processed through histopathology and immunohistochemistry. The biopsy and scraping samples were taken by the same person to avoid individual variations.

2.3. Diagnostic tests

2.3.1. Intradermal reaction of Montenegro (IDRM).

A total of 0.1 mL of Montenegro antigen solution was inoculated intradermally in the suprascapular region at a concentration of 10^6 promastigotes of *Leishmania (V.) panamensis* lysed by ultrasound (MHOM/PA/98/WR2306). The appearance of an induration area (≥ 5 mm) at the point of antigen inoculation after 48 h was considered positive [1].

2.3.2. Conventional tests (smears and culture)

For the smear test, scraping samples were taken with a sterile lancet, and a total of 4 smears were prepared (2 per slide). Then, the smears were stained by Giemsa to search for *Leishmania* amastigotes. For parasite isolation and culture, a scraping was taken and placed in a sterile saline solution with antibiotic (penicillin, 100 U and streptomycin, 0.1 mg) at 10% [3] in duplicate for transport. Under sterile conditions, scrapings were transferred to a solution of biphasic Senekjic's medium, Schneider's medium, M-199 Special medium with glutamine, and Hank's Salt. The culture tubes were stored at 26 °C and checked daily for 1 month to verify the presence of *Leishmania* promastigotes [1,7].

2.3.3. Histopathology

All samples were fixed in 10% buffered formalin and processed within no > 48 h from sampling by a standard histology technique [14,20] in the Laboratory of Pathology of Santo Tomas Hospital, Panama city. All tissue samples were dehydrated, cleared, and embedded in paraffin, and 4- μ m sections were stained with haematoxylin-eosin (HE) [15]. The lesion sections were evaluated by the presence of amastigote forms, and crosses were attributed according to the Ridley modified parasitic index where 0 amastigotes per standard section is (–) negative, ≥ 1 amastigotes per standard section is 1+, ≥ 10 amastigotes per standard section is 2+, ≥ 100 amastigotes per standard section is 3+ and ≥ 1000 amastigotes per standard section is 4+ [16].

2.3.4. Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissue was submitted to IHC according to Moreira et al. [21]. The procedure was carried out in the following stages: inhibition of the endogenous peroxidase with H_2O_2 , recovery of the antigen with 10 mM citrate buffer pH 6.0, blocking of the non-specific sites with 6% milk powder (Molico®, Nestle) with PBS and incubation with 10% foetal bovine serum. Samples were incubated overnight with the primary antibody diluted 1:1000 at 4 °C. Polyclonal hyperimmune serum produced in the Laboratory of Pathology of Infectious Diseases at the Medical School of the University of São Paulo Brazil from mice chronically infected with *Leishmania (L.) amazonensis* was used as the primary antibody.

The reaction with the secondary antibody and streptavidin solution was developed using the universal detection system with the LSAB Kit, Dako, USA (Catalogue number K0690, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) with diaminobenzidine (DAB) as the chromogen. The sections were evaluated by the presence of amastigote forms, attributing crosses according to the Ridley modified parasitic index, where 0 amastigotes per standard section is (–) negative, ≥ 1 amastigote per standard section is 1+, ≥ 10 amastigotes per standard section is 2+, ≥ 100 amastigotes per standard section is 3+ and ≥ 1000 amastigotes per standard section is 4 [16].

2.3.5. Molecular diagnosis

2.3.5.1. Sample collection and DNA extraction. For molecular analysis, skin scrapings were placed in 1.5 mL tubes containing 100 μ L of TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). DNA extraction was performed using the Qiagen QIamp® DNA Blood Mini Kit according

to the manufacturer's instructions (Qiagen, CA, USA). *Leishmania* DNA from culture-isolated parasites was purified using the Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3.5.2. PCR diagnosis for leishmania. Primers B1 (5'-GGGGTTGG-TGTAATATAGTGG-3') and LV (5'-ATTTTGAACGGGGTTTCTG-3') were used to specifically amplify the entire 750-bp minicircle of *Leishmania* (*Viannia*) [1,22]. Amplification reactions were performed in a final volume of 50 µL containing Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.6 µmol/L of each primer and 5 µL of DNA extracted from the TE buffer.

2.3.5.3. PCR Hsp-70. PCR was performed with the oligonucleotides F25 (5'-GGAGCCGGCAGGATTKCT-3') and R1310 (5'-CCTGGTTG-TTGTTCAGCCACTC-3'), which amplify a 1286 bp product from the repeated gene heat shock protein 70 (Hsp70) as previously described [23]. Amplification reactions were performed in a final volume of 50 µL containing 25 µL of Go Taq Green Master Mix 2 × (Promega), 0.6 µmol/L of each primer and 5 µL of DNA from the clinical samples and 1 ng from the reference strains. Thermal cycling was performed in an Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler.

2.4. *Leishmania* characterization

Additionally, positive culture samples were characterized by PCR Hsp-70 / RFLP using *Hae*III enzymes, and subsequently by *Bcc*I and *Rsa*I, to observe the differentiation patterns of the *Leishmania* species described in the literature [24].

2.5. Data analysis

A positive CL laboratory diagnosis was based on the tests routinely used at the Gorgas Institute for leishmaniasis diagnosis, which included parasitological tests using Giemsa-stained smears, *in vitro* cultures and/or positive PCR tests (Diagnostic criteria). Sensitivity was calculated by comparing the results of the different evaluated tests (IDRM, smears, culture, PCR *Viannia* and Hsp-70, HP and IHC) with the established positive criteria. Sensitivity calculations were estimated at a 95% CI. The results obtained from the different diagnostic tests were compared in 2 × 2 contingency tables, calculating the precision parameters, such as the degree of general agreement, sensitivity, specificity, estimated efficiency, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), using SPSS statistics 23 and Prism 5.0 software. The Kappa index was used to determine the concordance index between tests and the percentage of general agreement.

2.6. Ethical considerations

This work was approved by the Research Bioethics Committee in the Gorgas Institute of Health Studies (Panama) and by the Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Brazil) under protocol number 141/13. All participants signed an informed consent and agreed to participate in the study freely and voluntarily.

3. Results

3.1. Performance of the diagnostic tests

A total of 48 samples from patients with clinically and epidemiologically suspected CL diagnoses were analysed, of which 70.8% (34/48) corresponded to males and 29.2% (14/48) corresponded to females. The average age of the patients was 39 years, varying between 21 and 73 years. The average number of lesions was 2 (1 to 8 lesions) with an average time of evolution of 35 days (10 to 90 days); lesions were mostly distributed in the upper extremities (63%), and the rest were distributed in the lower extremities (18%), face/neck (12%), back (5%) and abdomen (4%). The majority of patients (62.5%) had lesions with an evolution time ≤ 30 days. The patients were from the province of Panama (85.4%: 41/48), Darién (10.4%: 5/48) and Coclé (4.2%: 2/48).

From the total samples analysed, 95.8% (46/48) were positive for *Leishmania* sp. by at least one of the diagnostic tests (diagnostic criteria); from the positive samples, 78.3% (36/46) were characterized as *Leishmania* (*V.*) *panamensis* by PCR-Hsp70 / RFLP.

In order to demonstrate that the IHC could be a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis improving the sensitivity of the HP, different diagnostic tests were compared with the IHC. From the samples positive according to the diagnostic criteria, 100% (46/46) were characterized as positive by IDRM, 60% (28/46) by direct search for parasites in the smears stained with Giemsa, 93.3% (42/46) by parasite isolation in the biphasic culture medium, 100% (46/46) by subgenus *Viannia* PCR, 78.3% (36/46) by Hsp70-PCR, 50% (23/46) by histopathology (HP) and 76.1% (35/46) by immunohistochemistry (IHC).

To calculate the different diagnostic parameters, the result of each test was compared with the diagnostic criteria used in the National Reference Center of Leishmaniasis in Panama, in which a sample is considered positive for CL when a positive result is obtained by at least one of the routine diagnostic tests (smear, culture or PCR *Viannia*). Based on this consideration, IDRM showed 100% sensitivity, 66.7% specificity, 97.8% PPV, 100% NPV and 97.9% efficiency; skin lesion smears stained with Giemsa presented 60% sensitivity, 100% specificity, 100% PPV, 14.4% NPV and 62.5% efficiency; and cultures showed a high sensitivity (91.3%) and specificity (100%), with a PPV of 100%, an NPV of 50% and an efficiency of 93.8% (Table 1).

Regarding the molecular tests, subgenus *Viannia* PCR obtained 100% for all parameters, including sensitivity, specificity, PPV, NPV and efficiency, while Hsp-70 PCR showed 78.3% sensitivity, 100% specificity, 100% PPV, 25% NPV and 8.3% efficiency (Table 1).

For histopathology, a low sensitivity (50%) with 100% specificity, 100% PPV, 8.0% NPV and 52.1% efficiency was obtained, while IHC reflected a better sensitivity (76.1%) and efficiency (77.1%), an equal specificity (100%), a PPV of 100% and an NPV of 15.4% (Table 1).

3.2. Agreement among the diagnostic tests

The level of concordance between the tests was calculated using the Kappa index, comparing each methodology against the diagnostic criteria mentioned above. IDRM and subgenus *Viannia* PCR showed

Table 1

Sensitivity, specificity, efficiency, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) compared with the positive criteria^a of IDRM, smear, culture, PCR *Viannia*, PCR Hsp-70, histopathology (HP) and immunohistochemistry (IHC).

Parameter	IDRM (IC 95%)	SMEAR (IC 95%)	Culture (IC 95%)	PCR viannia (IC 95%)	PCR hsp70 (IC 95%)	HP (IC 95%)	IHC (IC 95%)
Sensitivity	100% (92.1–100)	60% (44.3–74.3)	91.3% (81.7–98.6)	100% (92.3–100)	78.3% (65.4–90.4)	50% (35–65)	76.1% (62.1–86.1)
Specificity	56.7% (20.8–93.9)	100% (44–100)	100% (44–100)	100% (34.2–100)	100% (43.9–100)	100% (85–100)	100% (34.2–100)
PPV	97.8% (88.5–99.9)	100% (87.2–100)	100% (92–100)	100% (92.3–100)	100% (90.3–100)	100% (34–100)	100% (89.7–100)
NPV	100% (15.8–100)	14.4% (3.1–36.3)	50% (11.8–88.1)	100% (34.2–100)	25% (5.5–57.2)	8.0% (1–26)	15.4% (1.8–42.8)
Efficiency	97.9%	62.5%	93.8%	100%	81.3%	52.1%	77.1%

^a Diagnosis criteria: A positive cutaneous leishmaniasis laboratory diagnosis was based on a positive parasitological test (Giemsa stained smears or *in vitro* culture) and/or PCR assay.

Table 2

KAPPA index for IDRM, smear, culture, PCR *Viannia*, PCR Hsp-70, histopathology (HP) and immunohistochemistry (IHC) according to diagnosis criteria^a. The kappa index has a range from 0 to 1.00, in which $k < 0.4$ indicates poor concordance, k of 0.4–0.7 indicates good concordance and $k > 0.70$ indicates excellent concordance.

Parameter	IDRM	SMEAR	Culture	PCR <i>Viannia</i>	PCR Hsp70	HP	IHC
KAPPA index (IC 95%)	0.789	0.158	0.636	1.000	0.333	0.077	0.210
Agreement	Excellent	Poor	Good	Excellent	Poor	Poor	Poor
Overall Percent Agreement	98%	63%	94%	100%	81%	52%	75%

^a Diagnosis criteria: A positive cutaneous leishmaniasis laboratory diagnosis was based on a positive parasitological test (Giemsa stained smears or *in vitro* culture) and/or PCR assay.

excellent concordance levels (IDRM, $k = 0.789$ and subgenus *Viannia* PCR, $k = 1.000$). Culturing presented good concordance levels ($k = 0.636$), and the other tests showed poor concordance levels in the following order: Hsp-70 PCR ($k = 0.333$), IHC ($k = 0.210$), smears ($k = 0.158$), and histopathology ($k = 0.077$) (Table 2).

When calculating the percentage of agreement between IHC and HP, 75% of the total percentage concordance (confidence interval of 27%–66%) was obtained. The concordance between the positive results was 65.71% (95% CI: 49.15%–79.17%), and that between the negative results was 100% (95% CI: 77.19%–100%). The kappa index between the two tests showed a moderate agreement ($k = 0.509$). All positive results for HP were positive for IHC.

The number of amastigotes observed in the tissue sections was analysed by HP and IHC. For HP, 34.8% of the samples (16/46) had 1+, 6.5% (3/46) had 2+, and 8.7% (4/46) had 3+; for IHC, 21.7% of the samples (10/46) had 1+, 17.4% (8/46) had 2+, 28.3% (13/46) had 3+, and 8.7% (4/46) had 4+.

3.3. Combinations among the diagnostic testes

The use of combined methodologies is recommended to obtain a better diagnosis [11,25,26]. Based on this, the combined sensitivity of the different diagnostic tests performed in this study was calculated. The diagnostic sensitivity of HP increased when combined with IHC, detecting 76.1% (35/46) of the positive cases. In this way, the sensitivity of culture/IHC and the smears/IHC was calculated, and these combinations detected 97.8% (45/46) and 89.1% (41/46) of the positive cases, respectively (Table 3). It was also observed that the combination of PCR or IDRM with any test increased the sensitivity to 100%. In addition, the combination of culture, smears and histopathology reached 100% sensitivity, as well as did the combination of smears with IDRM.

4. Discussion

An accurate diagnosis of the *Leishmania* sp. parasite is important for adequate treatment of the patient and for the epidemiological surveillance of CL [3]. According to the WHO, new and better diagnostic approaches and alternative methodologies are necessary for the control of CL [2]. In Panama, only parasitological methods, such as lesion smears stained by Giemsa, immunological methods, as IDRM and histopathology using paraffin section stained by haematoxylin-eosin and Giemsa are performed by the country's health institutions for the diagnosis of CL [3,12]. Culture and molecular tests, such as polymerase chain reaction (PCR), are not performed in diagnostic routine, it is used only in reference centres [7, 10]. So, in order to demonstrate that the IHC is able to improve the sensitivity of HP to detect amastigotes of *Leishmania* sp., we compared the performance of IHC against other routine tests, including the HP. In this sense, we compared the IHC test against the IDRM, smears, culture, HP, *Viannia* PCR and Hsp-70 PCR tests which have been used in Panama to diagnose CL. A total of 48 samples from patients with suspected CL were analysed, of which 95.8% were positive for *Leishmania* sp., and characterized as *L. (V.) panamensis* by PCR-Hsp70/RFLP.

IHC tests have become one of the most important techniques in the diagnosis of human infections, such as leishmaniasis. IHC allows us to

Table 3

Sensitivity of the combined tests used for the diagnosis of CL in Panama.

Procedures	Number of positives cases	Percentage of positives cases ^b
smear + culture	43	93.5%
smear + hp	37	80.4%
smear + ihc	41	89.1%
smear + pcr viannia	46	100.0%
smear + hsp70	40	86.9%
IHC + hp	35	76.1%
ihc + pcr viannia	46	100%
hp + pcr viannia	46	100%
culture + hsp70	43	93.5%
culture + hp	45	97.8%
culture + ihc	45	97.8%
idrm + smear	46	100%
idrm + smear + culture	46	100%
smear + culture + pcr viannia	46	100%
smear + culture + hp	46	100%
smear + hp. + ihc	41	89.1%
smear + culture + ihc	45	97.8%
idrm + smear + culture + pcr viannia	46	100%
smear + culture + pcr viannia + hp. + ihc	46	100%
idrm + smear + culture + pcr viannia + hp. + ihc	46	100%

^a Diagnosis criteria: A positive cutaneous leishmaniasis laboratory diagnosis was based on a positive parasitological test (Giemsa stained smears or *in vitro* culture) and/or PCR assay.

^b The percentage of positive cases was calculated based on the number of positive samples according to the diagnosis criteria^a ($n = 46$).

identify the antigen in tissues and evaluate the immune response of patients [25,27]. In the present study, IHC showed a sensitivity of 76.1%, similar to other studies where the sensitivity varied from 58% to 91.8% [25,28,29]. In 2009, Quintella et al. [25] reported 80% sensitivity for IHC in skin biopsies infected with *Leishmania (V.) braziliensis*. Among the tests analysed in this study, IHC had the fifth highest sensitivity (76.1%) (Table 1). PCR *Viannia* (100%), IDRM (100%), *in vitro* culture (91.3%) and Hsp-70 PCR (78.3%) were the tests with superior sensitivity; but unfortunately, only IDRM is used currently in the health centres. It is important to mention, that IDRM is an immunological test that indicates the patient's cellular immune response against *Leishmania* sp. parasite; it is an indirect diagnosis test. The disadvantage of IDRM is that it does not differentiate between past and current infections [7,30], as it has been reported that patients older than 19 months presented a positive test after treatment [31,32].

Immunostaining techniques are used to increase histopathological tests sensitivity [10,25]. These tests are based on the observation of *Leishmania* parasite amastigotes in paraffin tissue sections. It has been reported that the sensitivity of histopathological analysis is usually low [12,33,34]. In this sense, IHC is a valuable tool for the diagnosis of CL, facilitating the observation of amastigotes in tissue and avoiding confusion in the identification of the parasite, therefore improving the quality of diagnosis [15,34] (Fig. 1). Sotto et al. [29] worked with 40 biopsies of human patients with cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis in South

Fig. 1. Histological section of the cutaneous lesion by *L. (V.) panamensis* stained by Hematoxylin-Eosin and immunohistochemistry, respectively showing mild (A and B), moderate (C and D) and intense (E and F) parasitism in the skin tissue.

America and showed the presence of parasites in 20% of the biopsies by the usual techniques performed in histological sections stained by HE, while it was possible to visualize the parasite in 64.51% of the biopsies by immunoperoxidase reaction. In our study, the amounts of amastigotes detected by HP and IHC in the tissue were compared, and it was observed that 56% of the positive samples detected by IHC presented higher amounts of parasite amastigote forms when compared with HP. A study conducted by Quintella et al. [25] reported an improvement of sensitivity of HP (53.3%) when IHC was used (80%) in the testing of 30 skin biopsies of patients a by *Leishmania (V.) braziliensis* infection. In our study, the sensitivity of HP (50%) improved by combining it with IHC (76.1%). When comparing HP with IHC, a moderate correlation was obtained ($k = 0.509$), and all samples confirmed positive by HP were also confirmed positive by IHC. Although IHC had a poor correlation to with the diagnostic criteria, it increased the sensitivity from 60% to 89.1% in smear tests and from 50% to 76.1% in histopathological tests. It has been demonstrated in the literature that IHC improves the diagnostic sensitivity of conventional tests, such as smears [11].

Conventional tests have shown an unsatisfactory sensitivity for the parasitological diagnosis of CL, with a sensitivity of approximately 70% when combined methods are used [25]. The results obtained in this study demonstrate that IHC is a useful and sensitive diagnostic method for the detection of amastigotes in the lesions of patients with active CL when used in correctly processed samples, thus contributing to the improvement of the parasitological diagnosis.

The use of combined methodologies is recommended to obtain a better diagnosis [11,25,26]. In Panama, the routine diagnosis involves the performance of IDRM, lesion scraping smears stained with Giemsa in local health centres; culture in biphasic medium, PCR *Viannia* in reference centres; and histopathology in local hospitals. The PCR used for the diagnosis of CL by the Gorgas Memorial Institute of Health Studies (ICGES), showed a high sensitivity and specificity to be able to detect the positive cases, agreeing with other studies that use kDNA PCR [1,3,17,18]. In contrast, Hsp-70 presents less sensitivity, but shows high specificity and can be used for the characterization of *Leishmania* species by PCR-Hsp70/RFLP [23,24], which allows the determination of the presence of the different species of parasites that circulate in the country and can cause more severe forms of disease. The low sensitivity of Hsp-70 can probably be because of the copy number of target DNA and it can be improved by performing a Nested PCR [13,35]. Concerning culture in biphasic medium, a high sensitivity (93.7%) was observed in our study compared to others. In a study conducted in Panama with the same methodology, the culture sensitivity was 44.6% [1], and studies conducted in Brazil obtained sensitivities of 69.7% [36] and 52% [37]. The combined sensitivity of the routine tests used in the CL diagnosis reaches 100% in reference centre (ICGES), while hospitals only have low-sensitivity methods such as HP [3,12]. Therefore, the use of smears and HP increased the sensitivity from 50%–60% to 80% (Table 3), and both tests can be performed in hospitals that have a pathology service.

Based on the results shown in Table 3 regarding the diagnostic sensitivity of the combined methods, in rural areas of difficult access that have a primary health care center, the use of diagnostic tests such as smears and/or IDRM is recommended because it is easy to perform with a microscope and Giemsa stain; and they do not require special equipment or laboratories [10,19]. In regions that have hospitals with a pathology service, the use of smears, HP and IHC is recommended, providing greater autonomy in diagnosis to health centers without having to depend on the diagnosis provided by the reference center located in capital of country, Panama City, where it is often far from the primary care centers located throughout the country. In areas that have infrastructure, equipment and trained personnel, the use of molecular tests, culture and/or smear is recommended. And to carry out studies with research purposes to evaluate the immune response in patients with CL, the use of IHC tests is recommended. Based on the results, it is possible to observe that IHC is able to improve the CL diagnosis in conjunction with other tests. Currently, in Panama, we have the equipment and infrastructure necessary to perform IHC analysis in hospitals that perform routine histopathological diagnosis. In addition, the implementation of IHC is important to conduct future studies that evaluate the immune response of patients in Panama with leishmaniasis caused by *Leishmania* spp.

5. Conclusion

In conclusion, IHC was able to improve the detection of *Leishmania* parasites in histopathological sections, supporting its implementation as a tool for CL diagnosis in the regional hospitals with available pathology service in Panama. In addition, immunohistochemical techniques allow the evaluation of the patient's immune response and thus provide new guidelines for the treatment and control of CL in Panama.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

Acknowledgement

To the following people who helped in a great way with the accomplishment of this work: Azael Saldaña and José E. Calzada are members of the SNI-SENACYT, Panamá. Marcia Laurenti is a research fellow from National Research Council (CNPq) grant N° 302174/2017-6. This work was supported by the *Sistema Nacional de Investigación* (SNI-SENACYT, Panamá), *Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos - Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación* (IFARHU-SENACYT) and the *São Paulo Research Foundation* (FAPESP) grants N° 2014/50315-0 and N° 2017/03141-5.

Authors' contribution

Hector Paz and Salomon Puga helped with patient sampling and care. Victor García and Rosendo Díaz performed the histopathological processing of the samples. Kadir González, Aracelis Miranda and Thaise Tomokane performed the conventional, molecular and immunohistochemical tests. José Calzada, Marcia Dalastra Laurenti, Azael Saldaña assisted in drafting the manuscript and in coordinating the study. Kadir González is the main author. Marcia Dalastra Laurenti is the corresponding author.

References

- [1] A. Miranda, A. Carrasco, H. Paz, J.M. Pascale, F. Samudio, A. Saldaña, G. Santamaría, Y. Mendoza, J.E. Calzada, Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81 (2009) 565–571, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0265>.
- [2] OPS/OMS, Segunda reunión de gerentes de programas de leishmaniasis de las Américas, Us1. 1 (2013) 1–61 http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=26267&Itemid=270.
- [3] A. Miranda, A. Saldaña, K. González, H. Paz, G. Santamaría, F. Samudio, J.E. Calzada, Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, *Central America, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106 (2012) 544–548, <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.005>.
- [4] Pan American Health Organization, Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de las Américas, febrero 2018, United States, 2018. www.paho.org (accessed August 30, 2018).
- [5] Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, Guía para el abordaje integral de la leishmaniasis en Panamá, (2016).
- [6] E. Von Stebut, Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy, *Exp. Dermatol.* 16 (2007) 340–346, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00554.x>.
- [7] R. Reithinger, J.-C. Dujardin, Molecular diagnosis of Leishmaniasis: current status and future applications, *J. Clin. Microbiol.* 45 (2007) 21–25, <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>.
- [8] W.H. Markle, K. Makhoul, Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment, *Am. Fam. Physician* 69 (2004) 1455–1460 <http://www.aafp.org/afp/2004/0315/p1455.pdf> (accessed September 7, 2017).
- [9] M.Z. Handler, P.A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, R.A. Schwartz, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives, *J. Am. Acad. Dermatol.* 73 (2015) 897–908, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.051>.
- [10] Y. de, R.E. Ríos, JM, Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea, *Rev. Médico Científica*. 23 (2010) 45–60 <http://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/260/pdf/13>.
- [11] H. Goto, J.A.L. Lindoso, Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 8 (2010) 419–433, <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>.
- [12] J.M.R. Yuil, A. Saldaña, J. Calzada, J. Arias, R. Díaz, K. González, Comparación entre histopatología y PCR, para diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria, *Dermatología Cosmet. Médica y Quir.* 10 (2012) 13–20.
- [13] A.M. Montalvo, J. Fraga, L. Monzote, I. Montano, S. De Doncker, J.C. Dujardin, G. Van der Auwera, Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the new and Old World, *Parasitology*. 137 (2010) 1159–1168, <https://doi.org/10.1017/S0033182010000089>.
- [14] F. Tresserra, M.A. Martínez Lanau, M.T. Soler, Manejo de las muestras para test inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos en el cáncer de mama, *Rev. Senol. y Patol. Mamar.* 29 (2016) 26–31, <https://doi.org/10.1016/j.senol.2015.11.004>.
- [15] A.V. Magalhães, M.A.P. Moraes, A.N. Raick, A. Ilanos-cuentas, J.M.L. Costa, P.D. Marsden, P.H. Service, G. Ai, M. Complementar, M. Tropical, Histopatología da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 28 (1986) 421–430.
- [16] D.S. Ridley, M.J. Ridley, The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis, *J. Pathol.* 141 (1983) 83–96, <https://doi.org/10.1002/path.1711410109>.
- [17] E. Bensoussan, A. Nasereddin, F. Jonas, L.F. Schnur, C.L. Jaffe, Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 1435–1439, <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>.
- [18] A. Barrio, M.C. Mora, F. Ramos, S. Moreno, R. Samson, M.A. Basombrio, Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (2007) 636–639 <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/77/4/0770636.pdf?expires=1523821983&id=id&accname=guest&checksum=BB6F64F2233059CA18F9E43FECD368B> (accessed April 15, 2018).
- [19] J.R. Ramírez, S. Agudelo, C. Muskus, J.F. Alzate, C. Berberich, D. Barker, I.D. Velez, Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3768–3773 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015400>.
- [20] K.B. Engel, H.M. Moore, Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135 (2011) 537–543, <https://doi.org/10.1043/2010-0702-RAIR.1>.
- [21] M. Moreira, M. Luvizotto, J. Garcia, C. Corbett, M.D. Laurenti, Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs, *Vet. Parasitol.* 145 (2007) 245–252, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.012>.
- [22] C. Vergel, J. Walker, N.G. Saravia, Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72 (2005) 423–429 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827280>.
- [23] A.M. Montalvo, J. Fraga, I. Maes, J.-C. Dujardin, G. Van der Auwera, Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2012) 1453–1461, <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>.
- [24] A.M. Montalvo Alvarez, J.F. Nodarse, I.M. Goodridge, L.M. Fidalgo, M. Marin, G. Van Der Auwera, J.-C. Dujardin, I.D.V. Bernal, C. Muskus, Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using BclI for hsp70 PCR-RFLP, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104 (2010) 364–367, <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.002>.
- [25] L.P. Quintella, T. Cuzzi, M.D.F. Madeira, T. Okamoto, A.D.O. Schubach, Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 51 (2009) 83–86, <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000200005>.
- [26] A. Schubach, T. Cuzzi-Maya, A.V. Oliveira, A. Sartori, M.P. de Oliveira-Neto,

- M.S. Mattos, M.L. Araújo, W.J. Souza, F. Haddad, M.D.A. Perez, R.S. Pacheco, H. Momen, S.G. Coutinho, M.C. de Almeida Marzochi, K.B. Marzochi, S.C. da Costa, Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96 (2001) 987–996, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000700018>.
- [27] C.F. Alves, C.F. Alves, M.M. Figueiredo, C.C. Souza, G.L.L. Machado-Coelho, M.N. Melo, W.L. Tafuri, P. Raso, R.P. Soares, W.L. Tafuri, American Tegumentary Leishmaniasis: effectiveness of an Immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin, *PLoS One* 8 (2013) e63343, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063343>.
- [28] J.R. Kenner, N.E. Aronson, G.L. Bratthauer, R.P. Turnicky, J.E. Jackson, D.B. Tang, P. Sau, Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues, *J. Cutan. Pathol.* 26 (1999) 130–136 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10235378> (accessed April 17, 2018).
- [29] M.N. Sotto, E.H. Yamashiro-Kanashiro, V.L.R. da Matta, T. de Brito, Cutaneous leishmaniasis of the new world: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa, *Acta Trop.* 46 (1989) 121–130, [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(89\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0001-706X(89)90006-5).
- [30] F.T. Silveira, R. Lainson, J.J. Shaw, A.A. De Souza, E.A. Ishikawa, R.R. Braga, 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.* 85 (1991) 735–738, [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90437-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90437-4).
- [31] S.G. Reed, Diagnosis of leishmaniasis, *Clin. Dermatol.* 14 (1996) 471–478, [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00038-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00038-7).
- [32] J.J. Shaw, R. Lainson, Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69 (1975) 323–335, [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(75\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(75)90127-3).
- [33] S.C. Xavier, H.M. de Andrade, S.J.H. Monte, I.M. Chiarelli, W.G. Lima, M.S.M. Michalick, W.L. Tafuri, W.L. Tafuri, Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods, *BMC Vet. Res.* 2 (2006) 17, <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-17>.
- [34] M.Z. Handler, P.A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, R.A. Schwartz, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management, *J. Am. Acad. Dermatol.* 73 (2015) 911–926, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>.
- [35] M.L. Cruz-Barrera, C. Ovalle-Bracho, V. Ortegón-Vergara, J.E. Pérez-Franco, M.C. Echeverry, Improving *Leishmania* Species Identification in Different Types of Samples from Cutaneous Lesions, (2015), <https://doi.org/10.1128/JCM.02955-14>.
- [36] Z. Maria, P. Luz, A. Rotondo, D. Silva, F. De Oliveira Silva, R.B. Caligiorno, E. Oliveira, A. Rabello, Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis, *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*. 104 (2009) 62–66 <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n1/10.pdf> (accessed April 16, 2018).
- [37] E. de A. Benicio, E.P.N. Gadelha, A. Talhari, R.M. da Silva, L.C. Ferreira, M.C.C. dos Santos, M.T. Mira, C.M.C. de Oliveira, C. Talhari, S. Talhari, P.R. Machado, A. Schriefer, Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*, *An. Bras. Dermatol.* 86 (2011) 1141–1144, <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600012>.