Gabriela Venicia Araujo Flores

**Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica nos municípios
de Amapala (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras:
avaliação da resposta imune inflamatória e regulatória *in situ*
em lesões de pele**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Dalastra
Laurenti

**São Paulo
2017**

Gabriela Venicia Araujo Flores

**Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica nos municípios
de Amapala (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras:
avaliação da resposta imune inflamatória e regulatória *in situ*
em lesões de pele**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Dalastra
Laurenti

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo Flores, Gabriela Venicia

Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica nos municípios de Amapala (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras : avaliação da resposta imune inflamatória e regulatória *in situ* em lesões de pele / Gabriela Venicia Araujo Flores. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Marcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.Honduras 2.Leishmaniose 3.Imuno-histoquímica 4.*Leishmania infantum chagasi* 5.Linfócitos T reguladores 6.Citocinas

USP/FM/DBD-310/17

Dedico este trabalho aos meus pais: Victoria Flores e Emilio Araujo, razão da minha vida; que me apoiam em todos os momentos com os seus conselhos, seus valores e sua motivação constante, e acima de tudo por seu amor.

À Profª. Drª. Márcia Dalastra Laurenti pelo apoio incondicional, carinho e compreensão; um anjo em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar comigo em cada passo que dou, por me dar a oportunidade de viver, fortalecer meu coração e iluminar a minha mente, por colocar no meu caminho aqueles que têm sido o meu apoio e companhia durante toda a minha vida e sobre tudo nestes últimos dois anos de mestrado.

À minha família, meus pais Victoria Flores e Emilio Araujo, exemplos de perseverança, por seu apoio incondicional em minhas escolhas; aos meus irmãos Alejandra, Daniel, Arturo e Javier por seu amor e sempre apoiar-me; meus sobrinhos Katherine, Josué, Andrey, Alessandro e Victoria, obrigada por existirem na minha vida; sem vocês isto não seria possível.

À minha amiga de toda a vida, Kimberly Sánchez, mesmo à distância, obrigada por tua amizade e teus conselhos.

À minha amiga Carmen Sandoval, pessoa que ao longo destes dois anos de mestrado se converteu em minha irmã, obrigada por seu apoio nos momentos difíceis, com você este percurso foi mais fácil, tenha a certeza que esta conquista nos pertence.

Ao Dr. Concepción Zúniga, por ter confiado em mim, e me indicado para desenvolver este projeto, obrigada por seu apoio, sempre disposto a dar um conselho mesmo à distância.

À minha orientadora Márcia Dalastra Laurenti, um anjo em meu caminho, obrigada por ter acreditado em mim, por todo seu amor demonstrado ao longo destes dois anos, por seu acolhimento, ensinamentos, confiança, sempre disposta a ajudar sem se importar o que fosse. Sem o seu apoio e confiança nada disto seria possível, tenha a certeza que este trabalho também pertence a você.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett por seu carinho e permitir minha entrada no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À Dr^a. Àurea Favero Ferreira, obrigada por seus ensinamentos e apoio no estudo histopatológico das lesões deste projeto, seus conselhos foram de muita importância.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero, Prof^a. Dr^a. Claudia Momo e ao Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos por suas críticas e sugestões no exame de qualificação.

À Dr^a. Cláudia Gomes e Dr^a. Vânia da Matta, por seus conselhos e apoio neste período no LIM-50.

À Lia Negrão, por seu acolhimento desde minha chegada ao LIM-50, muito obrigada por todo o seu amor, conselhos e dicas para uma melhor estadia em São Paulo.

À Thaíse Tomokane, pela amizade que construímos e por todo seu carinho demonstrado ao longo destes dois anos, por sua dedicação e interpretação dos resultados obtidos neste projeto, tenha a certeza que com a sua ajuda tudo ficou mais fácil, muito obrigada por todos os ensinamentos no laboratório.

Ao Dr. Wilfredo Sosa Ochoa, Dr^a. Sara Avalos Hernandez e Dr^a. Mazlova Toledo pela coleta e processamento das biópsias utilizadas neste projeto, obrigada por sua ajuda.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50), Dr. Luiz Felipe, Thaíse, Carol, Fábio, Eduardo (Du), Kadir, Thaís Bruna (TB), Juliana (Jú), Karen, Letícia, Marina, Adriana, Gabriela, Jéssica, Glória e Edson, muito obrigada por fazer do laboratório minha casa.

Aos pacientes que permitiram a utilização das biópsias de lesões neste projeto, muito obrigada, sem elas não seria possível este estudo.

Ao senhor Douglas Bartholomeu da Comissão de Relações Internacionais (CRInt, International Office) da Faculdade de Medicina da USP, por ter permitido que ficasse os primeiros meses de minha estadia em São Paulo no prédio dos residentes, muito obrigada, seu apoio foi de grande ajuda.

À FAPESP, pela concessão do projeto temático, com apoio financeiro importante para o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado que ajudou na minha permanência em São Paulo e no desenvolvimento deste projeto de mestrado.

E finalmente, agradeço a todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

*Não existe nada completamente errado no mundo, mesmo um relógio parado,
consegue estar certo duas vezes por dia.*

Paulo Coelho

Normalização adotada

Esta dissertação 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

Summary

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1	EPIDEMIOLOGIA	2
1.2	ETIOLOGIA	3
1.2.1	PARASITO	3
1.2.2	VETOR	5
1.2.3	RESERVATÓRIO	6
1.2.4	CICLO DE VIDA	7
1.3	PATOGENIA.....	8
1.4	RESPOSTA IMUNE	9
1.5	CLÍNICA E HISTOPATOLOGIA	16
1.5.1	LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)	16
1.5.2	LEISHMANIOSE DÉRMICA PÓS KALA-AZAR (PKDL).....	17
1.5.3	LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR <i>Leishmania (L.) infantum</i> NO VELHO MUNDO	18
1.5.4	LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR <i>Leishmania (L.) infantum</i> <i>chagasi</i> NA AMÉRICA CENTRAL (EL SALVADOR, NICARÁGUA E COSTA RICA).....	19
1.6	LEISHMANIOSES EM HONDURAS	20
2.	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2	CASUÍSTICA	28
3.3	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	29

3.4	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	30
3.4.1	REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	30
3.4.2	ANÁLISE QUANTITATIVA MORFOMÉTRICA DAS CÉLULAS IMUNOMARCADAS	34
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES.....	36
4.2	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....	38
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	40
4.4	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	47
4.4.1	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA	47
4.4.1.1	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA	50
4.4.1.2	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MARCADORES IMUNOLÓGICOS CONSIDERANDO OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E OS CONTROLES DE PELE SAUDÁVEL NA REPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA	54
4.4.2	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE REGULATÓRIA	58
4.4.2.1	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE REGULATÓRIA	61
4.4.2.2	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MARCADORES IMUNOLÓGICOS CONSIDERANDO OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E OS CONTROLES DE PELE SAUDÁVEL DA RESPOSTA IMUNE REGULATÓRIA	63
4.4.3	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA E REGULATÓRIA	66
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÃO	77
7.	ANEXOS	79
7.1	ANEXO A - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	79
7.2	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80

7.3	ANEXO C - Comitê de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas da Universidad Nacional Autónoma de Honduras	82
7.4	ANEXO D - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	83
7.5	ANEXO E - Aspectos clínico e epidemiológicos dos pacientes acometidos por Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica, Honduras	86
7.6	ANEXO F - Alterações histopatológicas caracterizadas na epiderme e derme de pacientes com Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica em Honduras	87
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
μm	micrômetro
μL	microlitros
cm	centímetro
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
Km^2	quilômetro quadrado
M	mols por litro
mL	mililitros
mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado
mM	milimolar
N°	número
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
ρ	rho

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Célula dendrítica
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do 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
FoxP3	Fator de transcrição <i>forkhead box</i> 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
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/ Síndrome da imunodeficiência adquirida
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
kDa	Unidade de massa molecular em quilodalton
(L.)	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea

LCNU	Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica
LCU	Leishmaniose cutânea ulcerada
LIM50	Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas
LMC	Leishmaniose mucocutânea
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
pH	Potencial hidrogeniônico
PKDL	Leishmaniose dérmica pós Kala-azar
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: <i>T helper</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR2	Receptor tipo 2 do fator de necrose tumoral
T _{reg}	T regulatória
(V.)	<i>Viannia</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.: (A) Forma promastigota e (B) Forma amastigota. (Giemsa, $\times 1000$)..	4
Figura 2 – Chave taxonômica de <i>Leishmania</i> spp.....	5
Figura 3 – <i>Lutzomyia</i> spp. (A) macho e (B) fêmea. Seta vermelha sinalizando a genitália do macho e da fêmea respectivamente.....	6
Figura 4 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.: (A) Estágio no hospedeiro invertebrado e (B) estágio no hospedeiro vertebrado.	8
Figura 5 – Distribuição das diferentes formas clínicas da leishmaniose na República de Honduras.	21
Figura 6 – Mapa da República de Honduras..	28
Figura 7 – Aspecto clínico da lesão de leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica: (A) diâmetro da lesão, (B) lesão de evolução recente, aproximadamente 7 meses e (C) lesão de evolução crônica, aproximadamente 180 meses.....	38
Figura 8 – Fotomicrografia de esfregaço de raspado de lesão de pacientes com diagnóstico clínico para leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, evidenciando no interior do círculo vermelho, forma amastigota de <i>Leishmania</i> spp. (Giemsa, $\times 1000$).....	39
Figura 9 – Reação de imuno-histoquímica para <i>Leishmania</i> spp. em pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica ($\times 400$).	39
Figura 10 – Cortes histológicos de biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando alterações histopatológicas da epiderme: (A) leve adelgaçamento, (B) leve acantose e (C) exocitose focal linfocitocitária. (HE $\times 200$, $\times 400$ e $\times 400$, respectivamente).	43
Figura 11 – Cortes histológicos de biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando infiltrado inflamatório na derme: (A) Infiltrado difuso linfocitocitário na derme e (B) presença de células gigantes. (HE $\times 100$ e $\times 400$, respectivamente).....	43
Figura 12 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando discreto infiltrado inflamatório mononuclear perivascular na derme. (HE $\times 100$)..	44

Figura 13 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando a presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear na derme. (HE ×200).	44
Figura 14 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando a presença de intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares na derme. (HE ×200).	45
Figura 15 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando a presença de linfócitos, macrófagos vacuolizados e raras formas sugestivas de amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. na derme. (HE ×400).	45
Figura 16 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando presença de granuloma epitelióide em meio ao infiltrado inflamatório da derme. (HE ×200).	46
Figura 17 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando área focal de necrose na derme. (HE ×400).	46
Figura 18 – Cortes histológicos de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando reação de imuno-histoquímica positiva para (A) CD4 ⁺ ; (B) CD8 ⁺ (C) IL-17 ⁺ , (D) IL-6 ⁺ e (E) IFN-γ ⁺ . (×400). As setas vermelhas sinalizam células imunomarcadas para os diferentes marcadores.	48
Figura 19 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores (A) CD4 ⁺ , IL-17 ⁺ e IL-6 ⁺ e (B) CD8 ⁺ e IFN-γ ⁺ nas biópsias de lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras.	49
Figura 20 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4 ⁺ , IL-17 ⁺ , IL-6 ⁺ , CD8 ⁺ e IFN-γ ⁺ nos controles de pele saudável.	50

Figura 21 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) $CD4^+$ e $CD8^+$, (B) $CD4^+$ e $IFN-\gamma^+$, (C) $CD4^+$ e $IL-17^+$ e (D) $CD4^+$ e $IL-6^+$	51
Figura 22 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) $CD8^+$ e $IL-17^+$, (B) $CD8^+$ e $IL-6^+$ e (C) $CD8^+$ e $IFN-\gamma^+$	52
Figura 23 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células $IL-17^+$ e $IFN-\gamma^+$	53
Figura 24 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células $IL-6^+$ e $IFN-\gamma^+$	53
Figura 25 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo em densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores $CD4^+$, $IL-17^+$ e $IL-6^+$ entre a resposta tecidual com a presença de granuloma, ausência de granuloma nas biópsias de lesões de pele pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras e controle de pele saudável	55
Figura 26 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo em densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores $CD8^+$ e $IFN-\gamma^+$ entre a resposta tecidual com a presença de granuloma, ausência de granuloma nas biópsias de lesões de pele pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras e os controles de pele saudável.....	56
Figura 27 – Reação de imuno-histoquímica em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) e (B) $CD4^+$; (C) e (D) $CD8^+$ e (E) e (F) $IL-17^+$; sendo (A), (C) e (E) com padrão granulomatoso; e (B), (D) e (F) não granulomatoso. ($\times 400$).	57
Figura 28 – Reação de imuno-histoquímica em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) e (B) $IL-6^+$ e (C) e (D) $IFN-\gamma^+$; sendo (A) e (C) com padrão granulomatoso; e (B) e (D) não granulomatoso. ($\times 400$).....	58
Figura 29 – Reação de imuno-histoquímica positiva em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) $CD4^+$; (B) $FoxP3^+$ (C) $IL-10^+$ e (D) $TGF-\beta^+$. ($\times 400$)..	59

Figura 30 - Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4 ⁺ , FoxP3 ⁺ , IL-10 ⁺ e TGF-β ⁺ nas biópsias de lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras.....	60
Figura 31 - Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4 ⁺ , FoxP3 ⁺ , IL-10 ⁺ e TGF-β ⁺ nos controles de pele saudável.	61
Figura 32 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) CD4 ⁺ e FoxP3 ⁺ e (B) CD4 ⁺ e TGF-β ⁺	62
Figura 33 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células FoxP3 ⁺ e TGF-β ⁺	63
Figura 34 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo em densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4 ⁺ , FoxP3 ⁺ , IL-10 ⁺ e TGF-β ⁺ entre a resposta tecidual com a presença de granuloma, ausência de granuloma nas biópsias de lesões de pele pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras e controle de pele saudável	64
Figura 35 – Reação de imuno-histoquímica em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) e (B) CD4 ⁺ ; (C) e (D) FoxP3 ⁺ , (E) e (F) IL-10 ⁺ e (G) e (H) TGF-β ⁺ ; sendo (A), (C), (E) e (G) com padrão granulomatoso; e (B), (D), (F) e (H) não granulomatoso. (×400).	65
Figura 36 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) FoxP3 ⁺ e IL-17 ⁺ , (B) IL-10 ⁺ e IFN-γ ⁺ , (C) TGF-β ⁺ e IL-17 ⁺ e (D) TGF-β ⁺ e IFN-γ ⁺	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros utilizados nas reações de imuno-histoquímica.....	33
Tabela 2 – Aspectos clínico e epidemiológicos dos pacientes acometidos por Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica, Honduras	37
Tabela 3 – Síntese das Alterações histopatológicas caracterizadas da derme de pacientes com Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica em Honduras.....	42
Tabela 4 – Síntese das alterações histopatológicas caracterizadas na epiderme de pacientes com Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica em Honduras.....	42

RESUMO

Araujo Flores GV. *Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica nos municípios de Amapala (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras: avaliação da resposta imune inflamatória e regulatória in situ em lesões de pele* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Na América Central, em países como Honduras, El Salvador, Nicarágua e Costa Rica, tem sido descrito lesões cutâneas não ulceradas, designadas como leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica (LCNU) causadas por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Em Honduras, leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica são produzidas pelo mesmo agente etiológico, *Leishmania (L.) infantum chagasi* e ocorrem na mesma área geográfica. A LCNU é a forma clínica mais comum, afetando principalmente crianças maiores de 5 anos e adultos jovens. A lesão é definida como uma pápula, nódulo indolor, não ulcerativo, eritematoso ou da cor da pele, na presença ou ausência de halo hipopigmentado. Tendo em vista que existe uma lacuna no conhecimento do padrão de resposta imunológica tecidual da leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, este trabalho visou avaliar a resposta imunológica inflamatória e regulatória *in situ* das lesões de pele. Foram utilizadas 20 biópsias de pele, com diagnóstico parasitológico confirmado por raspado de lesão corado por Giemsa e observado em microscópio ótico. O estudo histopatológico foi avaliado em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) e o padrão da resposta imune inflamatória e regulatória por meio da reação de imuno-histoquímica utilizando marcadores para linfócito T (CD4 e CD8), T regulatório (FoxP3), e antígenos intracelulares como: IL-17, TGF- β , IL-10, IL-6 e IFN- γ . As alterações histopatológicas mais significativas foram observadas na derme e caracterizadas por um infiltrado inflamatório linfohistiocitário de intensidade variável e associado à formação de granulomas epitelioides. Já as alterações histopatológicas identificadas na epiderme mostraram-se mais leves e correspondem a leve adelgaçamento, leve acantose e exocitose focal linfohistiocitária. Em 55% dos casos, o parasitismo mostrou-se discreto. A análise imuno-histoquímica das lesões cutâneas dos pacientes com LCNU mostrou no infiltrado inflamatório a presença de todos os marcadores utilizados neste estudo, em especial de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, e das citocinas inflamatórias IFN- γ e IL-6. A participação de células FoxP3⁺, TGF- β ⁺ e IL-10⁺ foi discreta, assim como das células IL-17⁺. Os dados mostram uma participação maior da resposta inflamatória na leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, capaz de controlar o parasitismo e consequentemente a evolução do tamanho da lesão; porém, embora mais discreta, a resposta imune regulatória pode ser responsável para manter um balanço na resposta imune celular evitando danos teciduais e levando a baixa persistência parasitária no tecido, necessária para a manutenção de uma imunidade protetora e duradoura.

Descritores: Honduras; leishmaniose; imuno-histoquímica; *Leishmania infantum chagasi*; linfócitos T reguladores; citocinas.

ABSTRACT

Araujo Flores GV. *Non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis in the municipalities of Amapala (Valle) and Orocuina (Choluteca), Honduras: evaluation of the inflammatory and regulatory immune response *in situ* in skin lesions* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

In Central America, in countries such as Honduras, El Salvador, Nicaragua and Costa Rica, non-ulcerated skin lesions, designated as non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis (NUCL) caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi*, has been reported. In Honduras, visceral leishmaniasis and non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis are caused by the same etiologic agent, *Leishmania (L.) infantum chagasi* and occur in the same geographical area. NUCL is the most common clinical form, affecting mainly children older than 5 years and young adults. The lesion is defined as a papule, painless nodule, non-ulcerative, erythematous or skin color, in the presence or absence of hypopigmented halo. Considering that, there is a gap in the knowledge of the tissue immune response pattern of non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis, this study aimed to evaluate the *in situ* inflammatory and regulatory immune response of skin lesions. Twenty skin biopsies with a confirmed parasitological diagnosis by scraping of lesion stained by Giemsa and observed under an optical microscope were used. The histopathological study was evaluated in histological sections stained with hematoxylin and eosin (HE) and the inflammatory and regulatory immune response through the immunohistochemistry reaction using T lymphocyte (CD4 and CD8), regulatory T (FoxP3) markers, and intracellular antigens such as IL-17, TGF- β , IL-10, IL-6 and IFN- γ . The most significant histopathological changes were observed in the dermis, and they were characterized by a lymphohistiocytic inflammatory infiltrate of variable intensity and associated to the formation of epithelioid granulomas. On the other hand, the histopathological changes identified in the epidermis were lighter and correspond to mild thinning, mild acanthosis and focal lymphohistiocytic exocytosis. In 55% of the cases, the parasitism was discreet. The immunohistochemistry analysis of the cutaneous lesions of patients with NUCL showed in the inflammatory infiltrate the presence of all the markers used in this study, especially CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes, and the inflammatory cytokines IFN- γ and IL-6. The participation of FoxP3⁺, TGF- β ⁺ and IL-10⁺ cells was discrete, as well as IL-17⁺ cells. The data show a higher participation of the inflammatory response in non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis, able to control the tissue parasitism and consequently the evolution of the lesion size; however, although discreet, the regulatory immune response may be responsible for maintaining a balance in the cellular immune response avoiding tissue damage and leading to low tissue parasitic persistence necessary for the maintenance of a protective and lasting immunity.

Descriptors: Honduras; leishmaniasis; immunohistochemistry; *Leishmania infantum chagasi*; T lymphocytes, regulatory; cytokines.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que afeta o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. É causada por uma grande variedade de parasitos protozoários que pertencem à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. É transmitida pela picada de insetos dípteros do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (AREND, 2009; KILLICK-KENDRICK, 1990; LAURENTI, 2010).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose uma das seis endemias prioritárias de saúde pública global devido à sua ampla distribuição mundial em 98 países, com maior frequência em países em desenvolvimento. Estima-se que, aproximadamente, 350 milhões de indivíduos estão expostos a risco de infecção e, anualmente, ocorrem de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de leishmaniose visceral em todo o mundo. Na região das Américas, os casos de leishmaniose são registrados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com a exceção das ilhas do Caribe, Chile e Uruguai. (OPS/OMS, 2014).

1.2 ETIOLOGIA

1.2.1 PARASITO

A *Leishmania* é um parasito digenético que pertence à família Trypanosomatidae. Durante o seu ciclo de vida, duas formas podem ser observadas: uma forma encontrada no trato digestório das fêmeas do hospedeiro invertebrado, conhecida como promastigota (Figura 1A), de forma alongada, extracelular com flagelo longo e funcional que emerge da parte anterior do corpo proporcionando mobilidade ao parasito. O tamanho pode variar dentro da mesma espécie, entre 16 – 40 μm de comprimento e 1,5 – 3,0 μm de largura, incluindo o flagelo, que frequentemente é maior do que o corpo do parasito. A outra forma, conhecida como amastigota, apresenta-se com morfologia arredondada e sem flagelo, e é observada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos, nos hospedeiros vertebrados (Figura 1B). Seu tamanho varia dentro da mesma espécie, entre 1,5 – 3,0 por 3,0 – 6,5 μm . Tanto a forma promastigota como a amastigota multiplicam-se por divisão binária, e também possuem uma única mitocôndria modificada chamada cinetoplasto (BERNAL et al., 2010; LAURENTI, 2010).

Figura 1 – Formas evolutivas de *Leishmania* ssp.: (A) Forma promastigota e (B) Forma amastigota. (Giemsa, $\times 1000$). Fonte: (B) Imagem cedida por Thaíse Yumie Tomokane.

Os parasitos do gênero *Leishmania* compreendem em torno de 25 espécies que se classificam em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, dependendo do local e do tipo de desenvolvimento do parasito no vetor flebotomíneo (Figura 2) (KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON; SHAW, 1987).

No Novo Mundo, os parasitos do subgênero *Leishmania* causam doença cutânea, como: *Leishmania* (L.) *mexicana*, *Leishmania* (L.) *amazonensis*, e *Leishmania* (L.) *venezuelensis* e sistêmica visceral, como: *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*; enquanto os parasitos do subgênero *Viannia* causam somente doença cutânea, entre eles: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *shawi*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *naiffi*, *Leishmania* (V.) *lindenbergi*, *Leishmania* (V.) *guayanensis*, *Leishmania* (V.) *peruviana* e *Leishmania* (V.) *panamensis* (LAINSON; SHAW, 1987).

Figura 2 – Chave taxonômica de *Leishmania* spp. Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010.

1.2.2 VETOR

A leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, que predominam nas regiões tropicais e subtropicais. Esta subfamília é composta por seis gêneros, *Sergentomyia*, *Phlebotomus* e *Chinius* no Velho Mundo e *Brumptomyia*, *Warileya* e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Sendo de importância médica, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (BERNAL et al., 2010).

Os flebotomíneos são insetos com metamorfose completa, o seu tamanho varia de 2 a 5 mm, de cor palha, asas lanceoladas, patas longas e o corpo recoberto por pelos. Os machos (Figura 3A) são exclusivamente fitófagos e somente as fêmeas são hematófagas (Figura 3B) (EZQUERRA, 2001; YOUNG; DUCAN, 1994).

Figura 3 – *Lutzomyia* spp. (A) macho e (B) fêmea. Seta vermelha sinalizando a genitália do macho e da fêmea respectivamente. Fonte: (A) Imagem cedida por Carmen Sandoval.

1.2.3 RESERVATÓRIO

Os reservatórios são animais vertebrados que albergam o parasito, e permitem que os vetores se infectem, mantendo o ciclo de transmissão do parasito. Existe uma ampla variedade de animais domésticos, peridomésticos e selvagens que estão implicados como reservatórios de *Leishmania*, e dependendo da fonte de infecção para o vetor podemos ter uma transmissão de caráter zoonótico, cujos reservatórios são animais selvagens, domésticos ou peridomésticos; ou antroponótico, cujo reservatório é o ser humano (BERNAL et al., 2010; EZQUERRA, 2001; O.M.S., 2010).

1.2.4 CICLO DE VIDA

O ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* ocorre quando a fêmea do flebotomíneo realiza sua alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado infectado e ingere células com formas amastigotas do parasito. Dentro do tubo digestório do inseto vetor ocorre a lise destas células, liberando as amastigotas que se transformam rapidamente em promastigotas procíclicas, as quais se multiplicam por divisão binária e colonizam diferentes regiões do tubo digestório do vetor, dependendo da espécie do parasito, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas, formas infectivas do parasito. A infecção no hospedeiro vertebrado se estabelece no momento em que a fêmea do flebotomíneo infectada realiza sua alimentação sanguínea, e regurgita formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, alojando-se no interior dos vacúolos parasitóforos onde se transformam em amastigotas (forma intracelular obrigatória) e multiplicam-se por divisão binária até lisar o macrófago. As amastigotas livres infectam ou invadem outros macrófagos que são recrutados para o sítio da infecção. Quando outro flebotomíneo realiza sua alimentação sanguínea em um hospedeiro infectado, ingere células contendo as formas amastigotas, mantendo desta forma, o ciclo biológico (Figura 4) (BERNAL et al., 2010; EZQUERRA, 2001; LAURENTI, 2010).

Figura 4 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp.: (A) Estágio no hospedeiro invertebrado e (B) estágio no hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado Nature Reviews/Immunology, 2002.

1.3 PATOGENIA

Pelo fato de *Leishmania* ser um parasito intracelular obrigatório e transmitido por um inseto vetor, a patogenia da leishmaniose dependerá do perfil imunológico do homem, fortemente associado à resposta imune celular, à virulência da espécie de *Leishmania* infectante e fatores inerentes ao vetor. 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: a) eventos iniciais responsáveis para o estabelecimento da infecção (interação *Leishmania*-macrófago e *Leishmania*-saliva do vetor-macrófago) e b) eventos responsáveis pelo estabelecimento da doença (interação *Leishmania*-células

dendríticas/células de Langerhans-linfócitos T); dos quais resultaram as diferentes formas clínicas da leishmaniose (BERNAL et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; LAURENTI, 2010; SILVEIRA et al., 2008, 2009).

1.4 RESPOSTA IMUNE

A resposta imune nas leishmanioses é bastante complexa, enquanto em alguns casos pode ocorrer uma cura espontânea, em outros ocorre uma resposta exacerbada da doença, a qual é caracterizada pela susceptibilidade ou resistência ao parasito no homem, dependendo de sua interação com os diferentes tipos celulares envolvidos na resposta imune do hospedeiro. O desenvolvimento de uma resposta imune protetora para patógenos intracelulares requer uma ação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa (ANTONELLI et al., 2004; CARVALHO et al., 2012; MUTISO et al., 2013). Depois da infecção por *Leishmania* spp., diferentes tipos celulares da resposta imune inata podem interagir com o parasito. A presença das formas promastigotas ativa o sistema complemento através da via clássica ou alternativa. A susceptibilidade das formas promastigotas de *Leishmania* spp. aos fatores do sistema complemento, depende do estágio de desenvolvimento do parasito. O fragmento hemoliticamente ativo do sistema complemento (C3b), uma das opsoninas mais potentes, se adere à membrana do parasito, podendo causar sua destruição ou facilitar sua fagocitose pelos macrófagos. A molécula de lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa (gp63) presentes na superfície de *Leishmania* spp. convertem rapidamente o fragmento C3b em fragmento hemoliticamente inativo do sistema complemento (iC3b) para facilitar sua entrada nos macrófagos por meio da interação dos receptores CR1 e CR3 presentes na superfície destas células, o que favorece sua sobrevivência, já que desencadeia uma menor resposta oxidativa dentro do

macrófago (LÓPEZ; RESTREPO, 2000; MOSSER; EDELSON, 1984; MUTISO et al., 2013; NYLÉN; GAUTAM, 2010; RUSSELL; TALAMAS-ROHANA, 1989; SILVEIRA et al., 2008; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983).

Em relação às células da resposta imune inata, os neutrófilos são uma das primeiras células a serem infectadas por *Leishmania* spp., sua função fagocítica contribui no início da inflamação, e este processo é essencial para iniciar a resposta imune. Os neutrófilos têm um período de vida curto e são constitutivamente programados para morrer por apoptose. Neutrófilos apoptóticos contendo formas de *Leishmania* intactas podem ser fagocitados pelos macrófagos, podendo atuar como “Cavalos de Troia” favorecendo uma entrada silenciosa do parasito dentro do macrófago. Independentemente dos neutrófilos atuarem como “Cavalos de Troia” ou não, há evidências que indicam que a *Leishmania* na fase precoce da infecção, pode evadir-se lisando neutrófilos para assegurar sua sobrevivência (CARVALHO et al., 2012; CHARMOY et al., 2010; KAYE; SCOTT, 2011; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

As células *natural killer* (NK) também representam uma das primeiras linhas de defesa na resposta imune frente à infecção por *Leishmania* spp., quer seja por meio de destruição de células infectadas, ou por secreção de interferon gama (IFN- γ) através do estímulo de interleucina (IL)-12 produzida por macrófagos infectados. Este IFN- γ ativará macrófagos, resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e reativos de oxigênio, e consequentemente a morte dos parasitos intracelulares (CARVALHO et al., 2012; LIEKE et al., 2011; MUTISO et al., 2013; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

Outra população celular importante na defesa contra patógenos intracelulares são as células dendríticas (CD), essenciais para uma resposta imune efetiva, desempenhando um papel essencial para iniciar tanto a resposta imune inata como a adaptativa. As células dendríticas sobrevivem nos tecidos e órgãos linfoides como células imaturas. O processo

de eliminação do parasito requer que as células dendríticas captem antígeno de *Leishmania* e migrem até os linfonodos regionais onde apresentarão antígenos, principalmente aos linfócitos T para produzir IFN- γ e dar início à resposta imune específica (CARVALHO et al., 2012; VALLADEAU; SAELAND, 2005).

Uma vez que ocorre a apresentação de antígenos nos linfonodos regionais, a resposta imune específica é mediada principalmente por duas subpopulações funcionais de células T CD4⁺, diferenciadas pela produção de citocinas locais, que regulam no sentido de resistência da resposta imune, estimulando células T CD4⁺ do tipo Th1 a secretar ativadores da imunidade mediada por células, tais como IL-2, IL-12, IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). A produção de IFN- γ ativa macrófagos, o que resulta na produção de óxido nítrico e junto ao estresse oxidativo, representam um importante mecanismo de eliminação dos parasitos intracelulares. Já a outra subpopulação de células T CD4⁺ tipo Th2, regula no sentido de suscetibilidade da resposta imune, secretando citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e 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 (principal ativador de macrófagos) e, conseqüentemente, desativa o macrófago, e desta maneira, contribui para a sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos. A regulação da resposta humoral significa a ativação dos linfócitos B, com a conseqüente produção de anticorpos, principalmente IgG, que não são capazes de neutralizar o parasito por ser intracelular, o qual está relacionado ao estabelecimento e desenvolvimento da doença (CARVALHO et al., 2012; EZQUERRA, 2001; KAYE; SCOTT, 2011; MUTISO et al., 2013; SCOTT, 2005; SILVEIRA et al., 2009; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Os linfócitos T regulatórios (T_{reg}) e as células produtoras de IL-17 têm um papel importante na regulação da resposta imune inata e adaptativa, sendo capazes de

reconhecer antígenos que regulam a resposta de células T efetoras, independente da polarização Th1/Th2. As células T_{reg} representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados fenotipicamente como CD4⁺CD25⁺ e pela expressão do fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3), fundamental no controle da resposta imune excessiva ou mal direcionada contra microrganismos ou antígenos próprios. Sendo FoxP3 essencial para o desenvolvimento e função de células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ e o principal marcador desta subpopulação celular. Estas células podem ser diferenciadas como T_{reg} naturais (CD4⁺CD25⁺), as quais se desenvolvem no timo, se definem como a população de células T regulatórias presentes no hospedeiro antes da exposição ao patógeno e por sua expressão constitutiva da cadeia α do receptor de IL-2 (CD25); ou como T_{reg} induzidas (CD4⁺CD25⁻) que se desenvolvem na periferia a partir de células T CD4⁺ convencionais, que adquirem sua função de regulação depois da exposição a citocinas regulatórias, drogas imunossupressoras ou células apresentadoras de antígenos (APC), condicionadas por uma variedade de estímulos antigênicos (BELKAID, 2003; BELKAID; TARBELL, 2009; MELO; CARVALHO, 2009).

As células T_{reg} atuam em conjunto com as células T efetoras na modulação da resposta imune celular. Três mecanismos parecem mediar o efeito supressor de células T_{reg}: o primeiro, implica a eliminação física de células citotóxicas, por contato direto célula-célula no sítio de inflamação, o qual requer a participação de moléculas de superfície, tais como: TGF- β e CTLA-4, além de moléculas citolíticas (Fas e Granzima B/perforinas); o segundo, envolve a inibição da proliferação e/ou produção de citocinas; e o terceiro, implica uma competição local por fatores de crescimento, em particular, IL-2, dando lugar a células apoptóticas pela falta de citocinas (ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008; BELKAID, 2007; CARNEIRO et al., 2009; MELO; CARVALHO, 2009).

A função das células T_{reg} é mediada pela secreção das citocinas imuno-reguladoras, tais como IL-10 e TGF- β , as quais afetam diretamente a atividade de células T citotóxicas e células apresentadoras de antígenos. Na presença destas citocinas, células T_{reg} , as quais se acumulam no sítio da infecção, são ativadas e podem inibir a proliferação e produção de citocinas Th1 por células T efetoras, prevenindo assim a eficiente eliminação do parasito (BELKAID; TARBELL, 2009; RODRIGUES et al., 2014).

TGF- β pode ser produzido por células infectadas ou por células com as quais o patógeno entra em contato, ou como resultado de um processo inflamatório. Esta citocina modula a expressão de FoxP3 por T_{reg} , sendo capaz de transformar células T periféricas $CD4^+ CD25^-$ em $CD4^+ CD25^+$. Além disto, o TGF- β pode reduzir a secreção de citocinas pelas células T $CD4^+$ ativadas, sem limitar sua capacidade de expansão e sem induzir a sua apoptose; também induz a produção de IL-10 em células Th1, o qual promove a produção de citocinas inibitórias e atenua diretamente a função de células T efetoras. TGF- β desempenha um importante papel regulador na leishmaniose cutânea (LC), aumentando a virulência do parasito e sua replicação em macrófagos (ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008; BELKAID; TARBELL, 2009; CAMPANELLI et al., 2006).

A IL-10 é uma importante citocina imuno-reguladora, essencial em limitar a resposta imune. Esta citocina está correlacionada com a supressão da resposta proliferativa de células T induzida por antígenos, tem a capacidade de inibir a ativação das células apresentadoras de antígenos e indiretamente diminui a intensidade da resposta imune por meio da inibição da produção de IL-2. O efeito inibidor de IL-10 sobre os macrófagos pode ser prejudicial, porque faz com que os macrófagos não respondam a ativação por IFN- γ . Células T_{reg} produtoras de IL-10 podem limitar as consequências patogênicas da resposta imune contra microrganismos sem comprometer a persistência

parasitária (ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008; BELKAID; TARBELL, 2009; CAMPANELLI et al., 2006; MELO; CARVALHO, 2009; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

Relatos na literatura mostram que células T_{reg} , *in vitro*, são capazes de produzir IFN- γ sob estímulo de Th1 (HALL et al., 2011; WAN, 2010; ZENG; CHANG; LAI, 2017). Govindaraj et al., 2013 mostraram que células T_{reg} com fenótipo $CD25^{+}TNFR2^{+}$ (Receptor tipo 2 do fator de necrose tumoral) induzidas rapidamente após a ligação cruzada CD3/CD28 de células T CD4 induz diferenciação de células com capacidade máxima de proliferação e produção de citocinas efetoras. Apesar da maior parte da literatura mostrar que a expressão de FoxP3 inibe a produção de IFN- γ , estes autores sugerem que sobre ativação de células T, $CD25^{Hi}TNFR2^{+}$ não só expressam IFN- γ como também IL-2, IL-10 e T-bet. Assim, esta população de células T_{reg} *in vivo* pode desempenhar um papel importante nas etapas iniciais da resposta imune do hospedeiro (GOVINDARAJ et al., 2013).

Por outro lado, estudos têm indicado que células T_{reg} e T efetoras são encontradas na leishmaniose crônica, sugerindo a persistência de *Leishmania* no sítio da infecção, que em alguns casos, é necessária para a manutenção da imunidade protetora. Deste modo, as células T_{reg} podem controlar o balanço da resposta imune celular estabelecida entre o patógeno e seu hospedeiro, mediando um equilíbrio que pode chegar a ser mutuamente benéfico. Um desequilíbrio neste subtipo celular pode promover a progressão da lesão e mudança na resposta imune, já que células $CD4^{+} CD25^{+} IL-10^{+} TGF-\beta^{+}$ poderiam estar envolvidas na modulação da resposta imune efetora em lesões de pele induzidas por *Leishmania* spp. (BELKAID; TARBELL, 2009; CAMPANELLI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014).

Recentemente, o paradigma Th1/Th2 foi ampliado, seguido do descobrimento de um terceiro subtipo de células Th efetoras que produzem IL-17 (Th17) e exibe funções efetoras distintas das células Th1 e Th2. Assim como as células Th1 e Th2, o desenvolvimento de células Th17 a partir de células T naturais é dependente da apresentação de antígenos pelas APCs. Estudos têm demonstrado que uma sinergia entre IL-6 e TGF- β é necessária para uma ótima produção de IL-17, enquanto TGF- β , por si só, estimula a diferenciação de T_{reg}, IL-23 é importante para a completa diferenciação e manutenção de Th17. A função primária de células Th17 é a eliminação de microrganismos que não são adequadamente destruídos pelas células Th1 ou Th2. IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que atua sobre uma ampla gama de tipos celulares para induzir a expressão de IL-6, IL-8, fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) e metaloproteases; é a chave na ativação e recrutamento de neutrófilos para mediar a resposta inflamatória (BANERJEE et al., 2016; KORN et al., 2009; MATSUZAKI; UMEMURA, 2007; STEINMAN, 2007; VAN DE VEERDONK et al., 2009).

Bacellar e colaboradores sugerem que na leishmaniose cutânea e mucocutânea, a maioria de IL-17 é produzida por células T CD4⁺, mas aproximadamente 30% da produção de IL-17 poderia estar sendo secretado por outros tipos celulares, como: células T CD8⁺, células T $\gamma\delta$, células NK e monócitos (BACELLAR et al., 2009).

Dados mostrados por diferentes autores sugerem que a resposta imune mediada por células Th17 tem um importante papel regulatório na defesa do hospedeiro, assim como também, estimula inflamação crônica e autoimunidade (BACELLAR et al., 2009; BANERJEE et al., 2016; KORN et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

1.5 CLÍNICA E HISTOPATOLOGIA

As manifestações clínicas da leishmaniose são variáveis e dependem da espécie do parasito, virulência da cepa, quantidade de parasitos inoculados, do vetor e especialmente das condições imunológicas do hospedeiro, podendo ocorrer desde a forma mais comum da doença, leishmaniose cutânea, até a forma mais grave da doença e fatal se não for tratada, leishmaniose visceral (BRUZUAL; ARCAY; DE LA PARTE-PÉREZ, 2008; DE LIMA, 2008; OPS/OMS, 2014). No caso da leishmaniose cutânea causada por espécies dermatrópicas, podemos ter a forma cutânea localizada, a forma mais frequente da doença, tendo como agente etiológico qualquer membro do subgênero *Viannia* e *Leishmania*. Porém, esta apresentação clínica pode evoluir para forma mucocutânea, causada por parasitos do subgênero *Viannia* que despertam uma resposta imune celular exacerbada de hipersensibilidade do hospedeiro; ou para a forma anérgica difusa, causada por parasitos do subgênero *Leishmania* que levam a uma falha na resposta imune celular do hospedeiro (SILVEIRA et al., 2008; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Uma vez que nosso tema de interesse é a leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi*, não aprofundaremos sobre este espectro clínico.

1.5.1 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)

A leishmaniose visceral é uma enfermidade generalizada e crônica, apresentando sintomas como: febre baixa recorrente, com dois ou três picos diários que persistem com remissões durante todo o curso da infecção da doença; esplenomegalia, que costuma ser em maior escala que a hepatomegalia; e ainda, na maioria dos casos, micropoliadenia, além de uma série de eventos que se iniciam à medida que os órgãos são acometidos,

desencadeando alterações de ordem fisiológica e histopatológica, as quais se agravam com o decorrer da doença (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004; SILVEIRA et al., 2010). Sendo o seu agente etiológico *Leishmania (L.) infantum chagasi* e seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, nas Américas (LAINSON, 2010).

De modo geral, os principais órgãos afetados na leishmaniose visceral são: baço, fígado e medula óssea. As principais alterações histopatológicas observadas no baço são a dilatação dos sinusoides venosos, com abundantes macrófagos infectados com amastigotas na polpa branca e na polpa vermelha, assim como nas trabéculas. Também é comum observar um infiltrado de plasmócitos. A polpa branca está muito reduzida e é frequente a presença de fibrose e necrose nas áreas de células T. No fígado, as células de Kupffer estão hiperplasiadas e hipertrofiadas, com abundantes amastigotas. A arquitetura normal do fígado é afetada pela presença de inúmeros macrófagos infectados nos sinusoides hepáticos. As células do parênquima quase sempre são normais, ainda que algumas vezes apresente degeneração gordurosa. Os vasos portais apresentam abundantes macrófagos parasitados e se observa proliferação dos dutos biliares e leve fibrose. A medula óssea apresenta hiperplasia mieloide, diminuição das células adiposas e uma menor quantidade de macrófagos infectados em comparação com o fígado e o baço. Os indivíduos que apresentam anemia, apresentam sinais de hematopoiese extramedular e em alguns casos há leucopenia grave (BERNAL et al., 2010).

1.5.2 LEISHMANIOSE DÉRMICA PÓS KALA-AZAR (PKDL)

No Velho Mundo, a PKDL é uma manifestação clínica comumente secundária em pacientes com leishmaniose visceral prévia e cura clínica, que pode ocorrer ao redor de um ano depois do tratamento; porém, de 15 a 20% dos casos não apresentam história

prévia de LV mesmo quando são de região endêmica. É causada por *Leishmania (L.) donovani* e se caracteriza clinicamente como máculas hipopigmentadas, pápulas e/ou nódulos, com rara tendência à ulceração, na face, tronco e extremidades e dependendo do grau de severidade podem disseminar pelo corpo todo (GARCÍA-ALMAGRO, 2005; MEHREGAN; MEHREGAN; MEHREGAN, 1999; SINGH; RAMESH; RAMAM, 2015; ZIJLSTRA, 2016).

Histologicamente, se observa uma zona de Grenz que separa a epiderme do infiltrado subjacente. Na derme, o infiltrado pode apresentar-se como um infiltrado difuso de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, sem formação de granuloma ou como um infiltrado nodular e difuso de granulomas bem formados compostos de macrófagos epitelioides, linfócitos e plasmócitos, além de células gigantes tipo Langhans. Pode ser encontrado um número variável de parasitos, dependendo da apresentação clínica (MEHREGAN; MEHREGAN; MEHREGAN, 1999; O.M.S., 2010).

1.5.3 LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania (L.) infantum* NO VELHO MUNDO

A leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (L.) infantum* é de evolução lenta e crônica, geralmente superior a um ano e de cura espontânea, sua aparência se assemelha frequentemente com a picada de um inseto. Em indivíduos imunocompetentes, não há sinais prévios nem posteriores de leishmaniose visceral. Clinicamente, a lesão pode ser papular, eritematosa, ulcerativa ou infiltrativa. A lesão inicial é uma pequena pápula, eritematosa que aumenta lentamente em tamanho para formar um nódulo ou uma placa que pode ulcerar e converter-se em crosta, localizada na face (80%), geralmente única ou

em pequeno número (1-3), e indolor. O diâmetro médio é de 10 mm (CAMPINO et al., 2006; DEL GIUDICE et al., 1998; O.M.S., 2010).

Histologicamente, a fase inicial é caracterizada por um infiltrado inflamatório denso e difuso na derme, composto de histiócitos, linfócitos e plasmócitos. Parasitos podem ser visualizados dentro dos histiócitos, eosinófilos e neutrófilos são raros. A fase crônica da lesão é caracterizada por um infiltrado inflamatório granulomatoso com parasitismo discreto (AGUADO et al., 2013; DEL GIUDICE et al., 1998).

1.5.4 LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania (L.) infantum chagasi* NA AMÉRICA CENTRAL (EL SALVADOR, NICARÁGUA E COSTA RICA)

Recentemente, na América Central, tem sido descrita lesões cutâneas não ulceradas, designadas como leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica (LCNU) causadas por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Esta variante clínica é descrita nas mesmas regiões onde a leishmaniose visceral é endêmica. Clinicamente, é caracterizada pela presença de pequenos nódulos, pápulas ou placas eritematosas, frequentemente circundadas por uma área de despigmentação, de evolução lenta, crônica e sem tendência à ulceração; ocorrem frequentemente em áreas expostas do corpo (face, braços, pernas ou costas) e as crianças são mais frequentemente afetadas que os adultos. Estes pacientes não apresentam febre ou hepatoesplenomegalia, achados característicos da LV (BELLI et al., 1999; CEDILLOS; ROMERO CHÉVEZ; GAVIDIA, 2014; O.M.S., 2010; ZELEDÓN et al., 1989).

Histologicamente, em um estudo realizado na Nicarágua em 1999 por Belli e colaboradores, demonstraram um infiltrado granulomatoso presente em lesões de pele

não ulceradas de sete pacientes. Nesta região é a única notificação que se tem sobre achados histopatológicos (BELLI et al., 1999).

1.6 LEISHMANIOSES EM HONDURAS

Em Honduras, a leishmaniose é considerada uma doença de notificação compulsória e apresenta quatro formas clínicas, distribuídas de forma endêmica em várias regiões geográficas, em 14 dos 18 Estados (OPS., 2009), afetando populações rurais que adentram as áreas arborizadas e úmidas, tais como a leishmaniose cutânea ulcerada (LCU) e leishmaniose mucocutânea (LMC) causadas por parasitos do subgênero *Viannia* (*Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (V.) *panamensis*), ou zonas áridas ou semiáridas, como leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica e leishmaniose visceral, ambas causadas por *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* (Figura 5) (MATUTE et al., 2009; OPS., 2009).

Figura 5 – Distribuição das diferentes formas clínicas da leishmaniose na República de Honduras. Fonte: Imagem cedida gentilmente pelo Dr. Concepción Zúniga.

Em Honduras, a LV é causada por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, os primeiros casos foram notificados na década de 70, afeta principalmente crianças menores de cinco anos, com maior incidência em menores de dois anos. Em adultos esta forma clínica está relacionada com um estado de imunossupressão, comumente associada ao HIV/AIDS. As áreas endêmicas compreendem os Estados de Choluteca e Valle, assim como a parte sul dos Estados de Francisco Morazán, El Paraíso, La Paz, Intibucá e Lempira (NAVIN et al., 1985; OPS., 2009).

Em 1988, foram identificados em Honduras, os primeiros casos de leishmaniose cutânea causados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, agente etiológico bem estabelecido de leishmaniose visceral no Novo Mundo, incluindo Honduras (NOYES et

al., 1997). Ponce e colaboradores observaram em uma área endêmica de leishmaniose visceral (Isla del Tigre, Município de Amapala), lesões cutâneas em crianças, familiares e vizinhos de pacientes com LV, com características incomuns, apresentando uma forma clínica não ulcerada e que não respondiam a tratamentos contra outras doenças, como sarcoidoses ou hanseníase, sendo posteriormente, nomeada como leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica. Estes pacientes pareciam ter um estado nutricional adequado e sem histórico clínico sugestivo de leishmaniose visceral antes do aparecimento das lesões cutâneas. Estas lesões apresentavam evolução crônica e localizadas, principalmente na face, de aspecto papular, não ulceradas mesmo quando estavam presentes por muitos anos, hipopigmentadas, geralmente em pequeno número (1 – 3), e variando de 0,5 a 3,0 cm de diâmetro (PONCE et al., 1991).

Existem áreas endêmicas bem determinadas desta variante não ulcerada (LNCU) as quais são as mesmas onde se apresenta a LV, porém a LCNU é a forma clínica mais comum da doença na região sul do país, e a população afetada é composta principalmente por crianças maiores de cinco anos e adultos jovens (OPS., 2009; PONCE et al., 1991). Do ponto de vista clínico, a leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica é a forma mais benigna, no entanto, para a saúde pública é a mais importante, porque as pessoas com estas lesões podem ser reservatório dos parasitos e fonte de infecção para os flebotomíneos que transmitirão para novos hospedeiros humanos. Além disso, o principal risco desta manifestação clínica da leishmaniose é o processo de visceralização que pode ocorrer em crianças menores de cinco anos de idade com problemas nutricionais (BELLI et al., 1999; PONCE et al., 1991).

No ano de 2010, a Secretaria de Saúde de Honduras, por meio do Programa de Prevenção e Controle das Doenças de Chagas e Leishmaniose, notificou 1372 casos positivos da doença, dos quais 525 correspondiam à forma não ulcerada ou atípica da

doença e 10 casos correspondiam à leishmaniose visceral. No ano de 2011, foram notificados 1937 casos positivos, dos quais 371 correspondiam à forma não ulcerada ou atípica e 7 casos à forma visceral. Um dado interessante é que, ainda quando a LV e LCNU ocorrem na mesma região geográfica, a cada ano são notificados mais casos para a forma benigna da doença, a leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica (Dr. Concepción Zúniga Valeriano, comunicação pessoal¹).

Tendo em vista que existe uma lacuna no conhecimento do padrão de resposta imunológica tecidual da leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, este trabalho visou avaliar a resposta imunológica inflamatória e regulatória *in situ* das lesões de pele e assim, contribuir para a compreensão da relação parasito-hospedeiro na forma clínica rara e atípica da infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi* nas Américas.

¹ Valeriano, C. Z. (Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras); Comunicação pessoal; 2011.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o padrão da resposta imune inflamatória e regulatória *in situ* em lesões de pele causadas por *Leishmania (L.) infantum chagasi* de pacientes com a forma cutânea não ulcerada ou atípica (LCNU) dos municípios de Amapala, (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar as alterações histopatológicas das lesões de pele de pacientes com LCNU.
- Caracterizar o padrão da resposta inflamatória e regulatória *in situ* em lesões de pele causadas por *Leishmania (L.) infantum chagasi* de pacientes com LCNU por imuno-histoquímica utilizando marcadores para linfócito T (CD4 e CD8), T regulatório (FoxP3), e citocinas como: IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ .
- Caracterizar a população de Th17 *in situ* em lesões de pele causadas por *Leishmania (L.) infantum chagasi* de pacientes com LCNU por imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-IL-17 e anti-IL-6.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Foram utilizadas duas regiões endêmicas de leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, município de Amapala e município de Orocuina, localizadas na região sul de Honduras como áreas de estudo (Figura 6). Esta região possui uma estação seca bem marcada (de dezembro a abril), uma temperatura média anual de 30°C, com uma máxima que oscila entre 34°C e 35°C e uma mínima entre 25°C e 26°C, e com uma umidade anual de 65% (“Clima de Honduras”, 2017).

O município de Amapala tem uma extensão territorial de 80 km², está localizado no Estado de Valle no Golfo de Fonseca, com uma altitude média de 44 metros acima do nível do mar. O município é constituído por treze aldeias, e segundo o senso populacional do ano 2013, estima-se uma população de 12.249 habitantes. Por outro lado, o município de Orocuina tem uma extensão territorial de 124 km², está localizado no Estado de Choluteca com uma altitude média de 136 metros acima do nível do mar. O município é formado por nove aldeias, e segundo o senso populacional do ano 2013, estima-se uma população de 18.314 habitantes (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA DE HONDURAS, 2016).

Figura 6 – Mapa da República de Honduras. Os círculos vermelhos sinalizam os Municípios de Amapala e Orocuina.

3.2 CASUÍSTICA

Foram utilizadas 20 biópsias de pele, coletadas para o desenvolvimento de outro projeto de pesquisa, aprovado em 18/03/2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo de Pesquisa nº 051/15, (ANEXO A), e estocadas no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM 50). Neste projeto anterior, foi feita uma busca ativa de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica causada por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, sem tratamento, provenientes de duas áreas endêmicas, município de Amapala (Valle) e município de

Orocuina (Choluteca), Honduras, com diagnóstico parasitológico confirmado por raspado de lesão corado por Giemsa e observado em microscópio ótico. Os pacientes foram informados sobre o protocolo de pesquisa e, os que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

Este projeto de pesquisa foi também aprovado em 28/07/2014 com uma extensão em 19/10/2016 pelo Comitê de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas da Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Protocolo de Pesquisa nº 03-2014 (ANEXO C); e em 21/02/2017 o protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, CAAE: 64223917.1.0000.0065, Número do Parecer: 1.938.092 (ANEXO D).

3.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

As biópsias de lesões de pele dos pacientes, as que se definem como pápula, placa infiltrativa ou nódulo indolor, não ulcerativo, eritematoso ou da cor da pele, na presença ou ausência de halo hipopigmentado, foram coletadas com o auxílio de um punch de 3 mm em condições de assepsia e com anestesia local. Estas biópsias foram mergulhadas em solução formol 10 % tamponado com fosfato 0,01 M e processadas pelas técnicas usuais de histologia para obtenção dos cortes.

Os cortes parafinados corados por hematoxilina-eosina (HE) foram observados em microscópio ótico, com o objetivo de caracterizar as alterações teciduais da epiderme e derme, com ênfase à resposta inflamatória e ao parasitismo tecidual. Para o estudo histopatológico, foi realizada análise comparativa semiquantitativa dos cortes corados pelo HE, atribuindo-se cruzes de acordo com a intensidade dos diferentes processos

caracterizados, onde: (-) negativo, (+) discreto, (++) moderado e (+++) intenso (RIDLEY; RIDLEY, 1983).

3.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

3.4.1 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A resposta inflamatória e regulatória *in situ* foi avaliada por meio da reação de imuno-histoquímica, empregando os seguintes marcadores: anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-6; e anticorpos policlonais anti-FoxP3, anti-IL17, anti-TGF- β 1, anti-IL-10 e anti-IFN- γ . Soro hiperimune de camundongo cronicamente infectado por *Leishmania (L.) amazonensis* foi utilizado para confirmação do parasitismo tecidual (Tabela 1).

Foram obtidos em micrótomo, cortes histológicos de 4 μ m de espessura os quais foram depositados em lâminas previamente tratadas com organosilano. Estes cortes foram desparafinizados em xilol, à 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%, uma passagem em álcool 70% e finalmente duas passagens em água destilada; seguindo-se o bloqueio da peroxidase endógena com imersão em solução de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) 0,5 % por 10 minutos para CD4, e solução de H₂O₂ 3 % com 10 incubações de 3 minutos para os marcadores CD8, IFN- γ , TGF- β 1, IL-10, FoxP3, IL-17 e IL-6 e solução de H₂O₂ 3 % por 10 minutos para *Leishmania*. Todas as incubações foram à temperatura ambiente no escuro.

Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica com: tampão citrato 10 mM pH 6,0 para os marcadores *Leishmania* e FoxP3 utilizando panela de pressão por 3

minutos, para os marcadores IFN- γ , TGF- β 1, IL-10 e IL-6 utilizando o banho-maria por 30 minutos à 96 °C; tampão Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH 9.0 para o marcador CD8 por 30 minutos em banho-maria à 95 °C, tampão EDTA 1 mM pH 8,0 para os marcadores CD4 e IL-17 em banho-maria por 30 minutos a 96 °C. Para o IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-6 deixou-se resfriar por 1 hora a temperatura ambiente, por recomendação do fabricante e para CD4, CD8, TGF- β 1 e FoxP3 deixou-se resfriar lentamente até 55 °C.

Foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com solução de leite desnatado a 6 % (Molico® - Nestlé) em TBS (solução salina tamponada com Tris 0,05 M pH 7,6) por 20 minutos a 37 °C para CD4 e IL-17; e solução de leite desnatado a 6 % em PBS por 30 minutos a 37 °C para o marcador *Leishmania*, e por 45 minutos a 37 °C para os demais marcadores. Para todos os marcadores, exceto CD4, foi feita também uma incubação com solução de PBS com 10 % de soro fetal bovino, por 30 minutos a 37 °C.

Posteriormente, seguiu-se com a incubação com os anticorpos primários anti-*Leishmania* (soro hiperimune de camundongo, LIM-50/HCFMUSP), diluído a 1/2000 em PBS com 1 % BSA (PBS-BSA) por 50 minutos em temperatura ambiente; anti-IL-10 (policlonal, ab34843, ABCAM), anti-IL-17 (policlonal, (H-132): SC-7927, Santa Cruz Biotechnology) e anti-IL-6 (Monoclonal, (1): SC-130326, Santa Cruz Biotechnology) nas respectivas diluições: 1/1000, 1/200 e 1/200 em PBS-BSA por 1 hora a 37 °C; anti-IFN- γ (policlonal, (H-145): SC-8308, Santa Cruz Biotechnology), anti-TGF- β 1 (policlonal, (V): SC-146, Santa Cruz Biotechnology) e anti-FoxP3 (policlonal, (H-190): SC-28705, Santa Cruz Biotechnology), foram incubados primeiramente por 1 hora a 37 °C e posteriormente, incubados por 15 a 18 horas a temperatura ambiente, nas respectivas diluições: 1/100, 1/100, 1/250 em PBS-BSA; anti-CD8 (monoclonal, NCL-L-CD8-295, Novocastra) foi incubado por 15 a 18 horas a 4°C, diluído 1/100 em PBS-BSA e; anti-CD4 (monoclonal, NCL-L-CD4-1F6, Novocastra) diluído 1/20 em PBS-BSA foi

incubado primeiramente por 1 hora a 37 °C e posteriormente, por 15 a 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 por meio de 2 incubações de 5 minutos com TBS para o marcador CD4 e 3 incubações de 5 minutos com PBS-T (solução salina tamponada com 0,05 % de Tween 20) para os demais marcadores.

Para todos os marcadores, foi utilizado o kit de revelação Novolink (RE7280-K – Leica), incubando-se o reagente pós-primário por 30 minutos a 37 °C para os marcadores *Leishmania*, CD4, IL-10 e IL-17; para os demais marcadores foi incubado por 60 minutos a 37 °C. Para a lavagem, foram realizadas duas incubações com TBS por 5 minutos para o marcador CD4 e três incubações de 5 minutos com PBS-T para os demais marcadores. Seguiu-se então com a incubação do polímero ligado à peroxidase por 45 minutos a 37 °C para todos os marcadores. Posteriormente, foi realizada a lavagem como descrita anteriormente.

O substrato cromogênico, DAB+H₂O₂ (diaminobenzidina com peróxido de hidrogênio – K3468 - DakoCytomation) foi adicionado ao tecido e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem com água corrente, seguida por água destilada. Posteriormente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 2 minutos, seguindo lavagem com água corrente, água destilada e desidratação dos cortes, por passagens consecutivas em cubas com álcool 70 %, duas cubas com álcool 95 %, duas cubas com álcool absoluto, quatro cubas com xilol e então foram montadas com Permount e lamínula de vidro.

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

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 (panela de pressão) por 3 min	1/2000, 50 min a TA	Novolink
Anti-CD4 (Monoclonal NCL-L-CD4-IF6, Novocastra)	Tampão EDTA (banho-maria/96°C) por 30 min	1/20, 1 hora/37°C e 15-18 horas a 4°C	Novolink
Anti-CD8 (Monoclonal NCL-L-CD8-295, Novocastra)	Tampão Tris-EDTA (banho-maria/96°C) por 35 min	1/100, 15-18 horas a 4°C	Novolink
Anti-FoxP3 (Policlonal, (H-190): SC-28705, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato (panela de pressão) por 3 min	1/250, 1 hora/37°C e 15-18 horas a TA	Novolink
Anti-IL-17 (Policlonal, (H-132): SC-7927, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão EDTA (banho-maria/96°C) por 30 min	1/200, 50 min a 37°C	Novolink
Anti-TGF-β (Policlonal, (V): SC-146, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato (banho-maria/96°C) por 30 min	1/100, 1 hora/37°C e 15-18 horas a TA	Novolink
Anti-IL-10 (Policlonal, ab34843, ABCAM)	Tampão Citrato (banho-maria/96°C) por 30 min	1/1000, 50 min a 37°C	Novolink
Anti-IL-6 (Monoclonal, (1): SC-130326, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato (banho-maria/96°C) por 30 min	1/200, 50 min a 37°C em câmara úmida	Novolink
Anti-IFN-γ (Policlonal, (145): SC-8308, Santa Cruz Biotechnology)	Tampão Citrato (banho-maria/96°C) por 30 min	1/100, 1 hora/37°C e 15-18 horas a TA	Novolink

Legenda: °C: graus Celsius; min: minutos; TA: temperatura ambiente

3.4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA MORFOMÉTRICA DAS CÉLULAS IMUNOMARCADAS

Fotomicrografias foram obtidas em microscópio ótico acoplado ao microcomputador, empregando-se o programa AxioVision 4.8. Para isto, para os diferentes marcadores, foram fotografados 10 campos de cada corte histológico em objetiva de 40× e as células imunomarcadas em castanho foram quantificadas utilizando o software ImageJ. Para determinação da densidade de células marcadas (número de células por milímetro quadrado) foi calculada a razão entre as células imunomarcadas e a área de cada foto.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o software 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 realizado 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 construídos utilizando o Origin 8.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES

Dos 20 pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica provenientes de área endêmica de Honduras, 55% (11/20) pertenciam ao Município de Amapala, 35% (7/20) ao Município de Orocuina (Figura 6) e 10% (2/20) não se tem informação. Dentre estes pacientes, 65% (13/20) são do sexo feminino, 20% (4/20) do sexo masculino e 15% (3/20) não se tem informação. A idade média dos pacientes foi de 33,4 anos, variando de 9 a 70 anos. Os diâmetros das lesões variaram entre 3 e 5 mm em 70% (14/20) dos casos (Figura 7A) e de 30% (6/20) não se tem informação; 60% (12/20) apresentavam lesão única, 25% (5/20) dos casos apresentavam múltiplas lesões e de 15% (3/20) não se tem informação. Quanto ao tempo de evolução da lesão, 40% (8/20) dos casos apresentavam lesões há menos de 6 meses (Figura 7B), 25% (5/20) dos casos há 6 meses ou mais (Figura 7C) e 35% (7/20) dos casos, não foi informado o tempo de evolução das lesões. Estes dados estão sintetizados na Tabela 2 e mostrados no ANEXO E.

Tabela 2 – Aspectos clínico e epidemiológicos dos pacientes acometidos por Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica, Honduras

	Município			Idade média (anos)	Sexo			Número de lesões			Diâmetro da lesão		Tempo de evolução		
	Amapala	Orocuina	Não Informado		Feminino	Masculino	Não Informado	Única	Múltiplas	Não Informado	3-5 mm	Não Informado	<6 meses	>6 meses	Não Informado
Número	11/20	7/20	2/20	33,41	13/20	4/20	3/20	12/20	5/20	3/20	14/20	6/20	8/20	5/20	7/20
Porcentagem (%)	55	35	10		65	20	15	60	25	15	70	30	40	25	35

Figura 7 – Aspecto clínico da lesão de leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica: (A) diâmetro da lesão, (B) lesão de evolução recente, aproximadamente 7 meses e (C) lesão de evolução crônica, aproximadamente 180 meses.

4.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

No exame parasitológico direto, os esfregaços de raspado das lesões cutâneas de pacientes com diagnóstico clínico para LCNU corados pelo Giemsa mostraram a presença da forma amastigota de *Leishmania* em 100% (20/20) dos casos (Figura 8). Porém, no exame dos cortes histológicos utilizando anticorpo específico anti-*Leishmania* para reação de imuno-histoquímica, foi possível observar a presença de formas amastigotas coradas somente em 55% (11/20) dos casos (Figura 9).

Figura 8 – Fotomicrografia de esfregaço de raspado de lesão de pacientes com diagnóstico clínico para leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, evidenciando no interior do círculo vermelho, forma amastigota de *Leishmania* spp. (Giemsa, $\times 1000$).

Figura 9 – Reação de imuno-histoquímica para *Leishmania* spp. em pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica ($\times 400$). As setas vermelhas evidenciam as formas amastigotas de *Leishmania* spp imunomarcadas.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As alterações morfológicas da derme e epiderme observadas nas 20 biópsias de pele de pacientes com diagnóstico clínico e parasitológico de leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica causada por *Leishmania (L.) infantum chagasi* estão sintetizadas nas Tabelas 3 e 4. As alterações histopatológicas mais significativas foram observadas na derme e se caracterizaram por um infiltrado inflamatório predominantemente linfohistiocitário de intensidade variável com arranjo difuso e, por vezes, associado à formação de granulomas epitelioides (Tabela 3). Já as alterações histopatológicas identificadas na epiderme mostraram-se mais leves e correspondem a leve adelgaçamento visto em 40% (8/20) (Figura 10A), leve acantose em 10% (2/20) (Figura 10B) e exocitose focal linfohistiocitária em 20% (4/20) (Figura 10C) dos casos (Tabela 4) (ANEXO F).

O infiltrado inflamatório da derme era constituído principalmente por linfócitos, macrófagos e plasmócitos em intensidades variáveis (Figura 11A) (Tabela 4), sendo discreto em 40% (8/20) (Figura 12) dos casos, moderado em 30% (6/20) (Figura 13) e intenso em 30% (6/20) (Figura 14). As células predominantes no infiltrado inflamatório eram os linfócitos, seguido pelos macrófagos, sendo que, em 55% (11/20) dos casos, a presença destes tipos celulares era equivalente. Nestes casos, os macrófagos se mostraram frequentemente vacuolizados (Figura 15). A presença de reação granulomatosa, quer seja na forma de granulomas frouxos ou granulomas epitelioides bem formados (Figura 16) foi observada em 60% (12/20) dos casos que apresentavam um infiltrado inflamatório variando de moderado 50% (6/12) a intenso 50% (6/12), principalmente difuso, com evidência de células gigantes (Figura 11B) em 66,7% (8/12), e necrose discreta e focal (Figura 17) em 25% (3/12) dos casos. Infiltrado inflamatório mais leve, discreto e focal,

foi observado preferencialmente na derme superficial com tendência a distribuição perivascular (Figura 12).

Formas sugestivas do parasito nos cortes histológicos corados pelo HE (Figura 15), e confirmados por imuno-histoquímica, só estavam presentes em 55% (11/20) dos casos, apesar de todos os esfregaços de raspado das lesões de pele corados por Giemsa terem mostrado a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Tabela 3 – Síntese das alterações histopatológicas caracterizadas da derme de pacientes com Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica em Honduras

	Derme - Infiltrado inflamatório											
	Intensidade			Distribuição		Tipo celular			Granuloma / esboço de granuloma	Células gigantes	Necrose	Parasitismo
	Discreta	Moderada	Intensa	Focal	Difusa	Linfócito	Macrófago	Plasmócito				
Número	8/20	6/20	6/20	10/20	10/20	0/20 (-)	2/20 (-)	6/20 (-)	12/20	8/20	3/20	9/20 (-)
						4/20 (+)	6/20 (+)	14/20 (+)				11/20 (+)
						4/20 (++)	5/20 (++)	0/20 (++)				
						12/20 (+++)	7/20 (+++)	0/20 (+++)				
Porcentagem (%)	40	30	30	50	50	0 (-)	10 (-)	30 (-)	60	40	15	45 (-)
						20 (+)	30 (+)	70 (+)				55 (+)
						20 (++)	25 (++)	0 (++)				
						60 (+++)	35 (+++)	0 (+++)				

Tabela 4 – Síntese das alterações histopatológicas caracterizadas na epiderme de pacientes com Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica em Honduras

	Epiderme		
	Acantose	Adelgaçamento	Exocitose
Número	2/20	8/20	4/20
Porcentagem (%)	10	40	20

Figura 10 – Cortes histológicos de biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando alterações histopatológicas da epiderme: (A) leve adelgaçamento (seta branca), (B) leve acantose (seta vermelha) e (C) exocitose focal linfohistocitária (seta vermelha). (HE $\times 200$, $\times 400$ e $\times 400$, respectivamente).

Figura 11 – Cortes histológicos de biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando infiltrado inflamatório na derme: (A) Infiltrado difuso linfohistiocitário na derme e (B) presença de células gigantes (seta vermelha). (HE $\times 100$ e $\times 400$, respectivamente).

Figura 12 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando discreto infiltrado inflamatório mononuclear perivascular na derme. (HE $\times 100$).

Figura 13 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando a presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear na derme. (HE $\times 200$).

Figura 14 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando a presença de intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares na derme. (HE $\times 200$).

Figura 15 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando a presença de linfócitos, macrófagos vacuolizados e raras formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* spp. (Seta vermelha) na derme. (HE $\times 400$).

Figura 16 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando presença de granuloma epitelióide em meio ao infiltrado inflamatório da derme. (HE $\times 200$).

Figura 17 – Corte histológico de biópsia de pele de paciente com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica evidenciando área focal de necrose na derme. (HE $\times 400$).

4.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.4.1 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA

As lesões de pele dos pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostraram a presença de linfócitos T-CD4⁺ (Figura 18A) e T-CD8⁺ (Figura 18B) e células IL-17⁺ (Figura 18C), IL-6⁺ (Figura 18D) e IFN- γ ⁺ (Figura 18E), que foram evidenciadas pela reação de imuno-histoquímica.

Figura 18 – Cortes histológicos de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica mostrando reação de imuno-histoquímica positiva para (A) CD4⁺; (B) CD8⁺ (C) IL-17⁺, (D) IL-6⁺ e (E) IFN-γ⁺. (×400). As setas vermelhas sinalizam células imunomarcadas para os diferentes marcadores.

A análise morfométrica quantitativa mostrou que a densidade (média $\pm$ erro padrão) de linfócitos T CD4⁺ foi de $296,6 \pm 53,47$ células/mm², para linfócitos T CD8⁺ foi de $785,8 \pm 169,7$, para células IL-17⁺ foi de $185,5 \pm 21,43$, para células IL-6⁺ foi de

298,1 $\pm$ 62,49 e para células IFN- γ^+ foi de 671,4 $\pm$ 124,9 células/mm² nas biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea atípica. A distribuição das densidades destes tipos celulares está apresentada na Figura 19. Não houve diferença estatística entre os marcadores inflamatórios avaliados na pele dos pacientes com LCNU.

Figura 19 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores (A) CD4⁺, IL-17⁺ e IL-6⁺ e (B) CD8⁺ e IFN- γ^+ nas biópsias de lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras.

Já a análise morfométrica quantitativa dos controles de pele saudável mostrou que a densidade (média $\pm$ erro padrão) de linfócitos T CD4⁺ foi de 46,25 $\pm$ 11,55 células/mm², para linfócitos T CD8⁺ foi de 15,87 $\pm$ 6,147, para células IL-17⁺ foi de 18,64 $\pm$ 5,031, para células IL-6⁺ foi de 7,306 $\pm$ 2,136 e para células IFN- γ^+ foi de 7,216 $\pm$ 3,827 células/mm². Observamos que a densidade de células T CD4⁺ foi maior que as células

IFN- γ^+ ($p < 0,05$). A distribuição das densidades destes tipos celulares está apresentada na Figura 20.

Figura 20 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4⁺, IL-17⁺, IL-6⁺, CD8⁺ e IFN- γ ⁺ nos controles de pele saudável. * $p < 0,05$

4.4.1.1 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA

Foi realizada a análise de correlação entre os diferentes marcadores inflamatórios, por meio do teste de correlação de Pearson e Spearman, onde ρ é o coeficiente de correlação de Pearson e r_s é o coeficiente de correlação de Spearman.

Foi verificada correlação positiva entre a densidade de células T-CD4⁺ e todos os outros marcadores. A correlação entre a densidade de células T-CD4⁺ e CD8⁺ foi positiva

e forte ($\rho = 0,8328$, $p = 0,00001$) (Figura 21A), assim como com IFN- γ ($r_s = 0,7206$, $p = 0,0011$) (Figura 21B). A correlação entre T-CD4⁺ e IL-17⁺ foi positiva e moderada ($\rho = 0,6976$, $p = 0,00129$) (Figura 21C), assim como com IL-6⁺ ($r_s = 0,5035$, $p = 0,02797$) (Figura 21D).

Figura 21 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) CD4⁺ e CD8⁺, (B) CD4⁺ e IFN- γ ⁺, (C) CD4⁺ e IL-17⁺ e (D) CD4⁺ e IL-6⁺. O valor de ρ é o coeficiente de correlação de Pearson, r_s é o coeficiente de correlação de Spearman e p é o p-valor.

Foi observada uma correlação positiva e forte entre as densidades de células T- $CD8^+$ e $IL-17^+$ ($\rho = 0,7239$, $p = 0,00102$) (Figura 22A), assim como com $IL-6^+$ ($r_s = 0,7090$, $p = 0,00099$) (Figura 22B) e $IFN-\gamma^+$ ($r_s = 0,8794$, $p = 0,00001$) (Figura 22C).

Figura 22 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) $CD8^+$ e $IL-17^+$, (B) $CD8^+$ e $IL-6^+$ e (C) $CD8^+$ e $IFN-\gamma^+$. O valor de ρ é o coeficiente de correlação de Pearson, r_s é o coeficiente de correlação de Spearman e p é o p-valor.

A densidade de células $IL-17^+$ e $IFN-\gamma^+$ apresentou correlação positiva e moderada ($r_s = 0,6691$, $p = 0,00331$) (Figura 23). A densidade de células $IL-17^+$ não apresentou correlação com $IL-6^+$ ($r_s = 0,4338$, $p = 0,08189$).

Figura 23 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células IL-17⁺ e IFN-γ⁺. O valor de r_s é o coeficiente de correlação de Spearman e p é o p-valor.

Foi observada correlação positiva e moderada entre a densidade de células IL-6⁺ e IFN-γ⁺ ($r_s = 0,6176$, $p = 0,00824$) (Figura 24).

Figura 24 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células IL-6⁺ e IFN-γ⁺. O valor de r_s é o coeficiente de correlação de Spearman e p é o p-valor.

4.4.1.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MARCADORES IMUNOLÓGICOS CONSIDERANDO OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E OS CONTROLES DE PELE SAUDÁVEL NA REPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA

Considerando que 40 % (8/20) dos casos apresentava um infiltrado inflamatório discreto e focal e os outros 60 % (12/20) mostrava uma inflamação moderada, intensa e difusa associada à formação de granulomas, foi realizada uma análise comparativa entre as densidades dos marcadores imunológicos e os aspectos histopatológicos das lesões, considerando ausência e presença de granuloma. Estes resultados foram também comparados em relação aos controles de pele saudável.

A análise morfométrica quantitativa, entre os grupos com presença de granuloma, sem presença de granuloma e o controle de pele saudável, mostrou que a densidade celular (média $\pm$ erro padrão) para linfócitos T CD4⁺ foi 436,6 $\pm$ 58,79 células/mm², 86,53 $\pm$ 27,33 e 46,25 $\pm$ 11,55 células/mm², respectivamente; para células IL-17⁺ foi 227,0 $\pm$ 21,94, 102,4 $\pm$ 22,5 e 18,64 $\pm$ 5,031, respectivamente, para células IL-6⁺ foi 413,4 $\pm$ 82,04, 100,6 $\pm$ 18,53 e 7,306 $\pm$ 2,136 células/mm², respectivamente. Observamos que a densidade de células T CD4⁺ foi maior no grupo com presença de granuloma quando comparado ao grupo sem presença de granuloma ($p < 0,01$) e ao controle de pele saudável ($p < 0,001$); assim como a densidade de células IL-6⁺ foi maior no grupo com presença de granuloma quando comparado ao grupo sem presença de granuloma ($p < 0,05$) e ao controle de pele saudável ($p < 0,001$). A distribuição das densidades destes tipos celulares está apresentada na Figura 25.

Figura 25 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo em densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4⁺, IL-17⁺ e IL-6⁺ entre a resposta tecidual com a presença de granuloma (cor vermelho), ausência de granuloma (cor azul) nas biópsias de lesões de pele pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras e controle de pele saudável (cor preta). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

A densidade de linfócitos T CD8⁺ foi maior no grupo com presença de granuloma quando comparado ao grupo sem presença de granuloma e ao grupo controle de pele saudável, $1180 \pm 188,8$ células/mm², $110,3 \pm 45,2$ e $15,87 \pm 6,147$ células/mm², respectivamente. A densidade de células IFN- γ ⁺ também foi maior no grupo com presença de granuloma $873,8 \pm 139,3$, quando comparado ao grupo sem granuloma $185,6 \pm 23,01$ e ao grupo controle de pele saudável $7,216 \pm 3,827$ células/mm² (p < 0,001). A distribuição das densidades destes tipos celulares está apresentada na Figura 26.

Figura 26 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo em densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD8⁺ e IFN- γ ⁺ entre a resposta tecidual com a presença de granuloma (cor vermelha), ausência de granuloma (cor azul) nas biópsias de lesões de pele pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras e os controles de pele saudável (cor preta). *** $p < 0,001$.

Seguem abaixo ilustrações das reações de imuno-histoquímica para os casos com formação de granuloma e sem formação de granuloma, para os marcadores CD4⁺ (Figura 27A e B), CD8⁺ (Figura 27C e D), IL-17⁺ (Figura 27E e F), IL-6⁺ (Figura 28A e B) e IFN- γ ⁺ (Figura 28C e D).

Figura 27 – Reação de imuno-histoquímica em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) e (B) CD4⁺; (C) e (D) CD8⁺ e (E) e (F) IL-17⁺; sendo (A), (C) e (E) com padrão granulomatoso; e (B), (D) e (F) não granulomatoso. (×400). As setas vermelhas sinalizam células imunomarcadas para cada marcador.

Figura 28 – Reação de imuno-histoquímica em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) e (B) IL-6⁺ e (C) e (D) IFN-γ⁺; sendo (A) e (C) com padrão granulomatoso; e (B) e (D) não granulomatoso. (×400). As setas vermelhas sinalizando células imunomarcadas.

4.4.2 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE REGULATÓRIA

As lesões de pele dos pacientes com LCNU mostraram a presença de linfócitos T-CD4⁺ (Figura 29A), FoxP3⁺ (Figura 29B), células IL-10⁺ (Figura 29C) e TGF-β⁺ (Figura 29D), que foram evidenciadas pela reação de imuno-histoquímica.

Figura 29 – Reação de imuno-histoquímica positiva em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) CD4⁺; (B) FoxP3⁺ (C) IL-10⁺ e (D) TGF-β⁺. (×400). As setas vermelhas sinalizam células imunomarcadas para os diferentes marcadores.

A análise morfométrica quantitativa mostrou que a densidade (média $\pm$ erro padrão) de linfócitos T CD4⁺ foi de $296,6 \pm 53,47$ células/mm², para células FoxP3⁺ foi de $168,4 \pm 28,71$, para células IL-10⁺ foi de $63,72 \pm 9,698$ e para células TGF-β⁺ foi de $78,63 \pm 16,54$ células/mm² nas biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea atípica; onde pudemos observar que a densidade de células T CD4⁺ foi maior que das células IL-10⁺ ($p < 0,05$). A distribuição das densidades destes tipos celulares está apresentada na Figura 30.

Figura 30 - Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4⁺, FoxP3⁺, IL-10⁺ e TGF-β⁺ nas biópsias de lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras.

Já a análise morfométrica quantitativa dos controles de pele saudável mostrou que a densidade (média $\pm$ erro padrão) de linfócitos T CD4⁺ foi de $46,25 \pm 11,55$ células/mm², para células FoxP3⁺ foi de $3,788 \pm 1,721$, para células IL-10⁺ foi de $13,26 \pm 5,046$ e para células TGF-β⁺ foi de $0,11 \pm 0,11$ células/mm²; onde observamos que a densidade de células T CD4⁺ foi maior que das células FoxP3⁺ ($p < 0,01$) e que das células TGF-β⁺ ($p < 0,001$), conforme mostrado na Figura 31.

Figura 31 - Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo da densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4⁺, FoxP3⁺, IL-10⁺ e TGF-β⁺ nos controles de pele saudável. **p< 0,01; *** p< 0,001.

4.4.2.1 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE REGULATÓRIA

Foi realizada a análise de correlação entre os diferentes marcadores imunológicos, por meio do teste de correlação de Pearson e Spearman, onde ρ é o coeficiente de correlação de Pearson e r_s é o coeficiente de correlação de Spearman.

Foi verificada correlação positiva entre a densidade de células T-CD4⁺ e todos os outros marcadores, exceto com as células IL-10⁺. A correlação entre a densidade de células T-CD4⁺ e FoxP3⁺ foi positiva e forte ($\rho = 0,7078$, $p = 0,0007$) (Figura 32A), assim

como com TGF- β^+ ($\rho = 0,8047$, $p = 0,0001$) (Figura 32B). IL-10 $^+$ não mostrou correlação ($\rho = 0,3401$, $p = 0,15428$).

Figura 32 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) CD4 $^+$ e FoxP3 $^+$ e (B) CD4 $^+$ e TGF- β^+ . O valor de ρ é o coeficiente de correlação de Pearson e p é o p-valor.

Foi observada uma correlação positiva e moderada entre a densidade de células FoxP3 $^+$ e TGF- β^+ ($\rho = 0,6684$, $p = 0,00465$) (Figura 33); e não houve correlação entre densidades de células FoxP3 $^+$ e IL-10 $^+$ ($\rho = 0,1562$ $p = 0,53585$).

Figura 33 – Gráfico de dispersão correlacionando a densidade de células FoxP3⁺ e TGF-β⁺. O valor de ρ é o coeficiente de correlação de Pearson e p é o p-valor.

Não houve correlação entre a densidade de células IL-10⁺ e TGF-β⁺ ($\rho = 0,323$, $p = 0,22231$).

4.4.2.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MARCADORES IMUNOLÓGICOS CONSIDERANDO OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E OS CONTROLES DE PELE SAUDÁVEL DA RESPOSTA IMUNE REGULATÓRIA

A análise morfométrica quantitativa, entre os grupos com presença de granuloma, sem presença de granuloma e o controle de pele saudável, mostrou que a densidade celular (média $\pm$ erro padrão) para linfócitos T CD4⁺ foi $436,6 \pm 58,79$, $86,53 \pm 27,33$ e $46,25 \pm 11,55$ células/mm², respectivamente; para células FoxP3⁺ foi $227,9 \pm 34,70$, $66,53 \pm 13,64$ e $3,788 \pm 1,721$ células/mm², respectivamente; para células IL-10⁺ foi $80,32 \pm 12,59$, $35,26 \pm 7,365$ e $13,26 \pm 5,046$ células/mm², e para células TGF-β⁺ foi $107,5 \pm 20,53$,

$25,67 \pm 8,238$ e $0,0 \pm 0,0$ células/mm², respectivamente. Observamos que a densidade de células T CD4⁺ foi maior no grupo com presença de granuloma quando comparado ao grupo sem presença de granuloma ($p < 0,01$) e ao controle de pele saudável ($p < 0,001$). A distribuição das densidades destes tipos celulares está apresentada na Figura 34.

Figura 34 – Gráfico em dot-plot mostrando a distribuição e em box-plot mostrando a mediana, média, primeiro e terceiro quartil, valor máximo e valor mínimo em densidade de células positivas por milímetro quadrado para os marcadores CD4⁺, FoxP3⁺, IL-10⁺ e TGF-β⁺ entre a resposta tecidual com a presença de granuloma (cor vermelho), ausência de granuloma (cor azul) nas biópsias de lesões de pele pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica de Honduras e controle de pele saudável (cor preta). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Segue abaixo ilustrações das reações de imuno-histoquímica, para os casos com formação de granuloma e sem formação de granuloma, para os marcadores CD4⁺ (Figura 35A e B), FoxP3⁺ (Figura 35C e D), IL-10⁺ (Figura 35E e F) e TGF-β⁺ (Figura 35G e H).

Figura 35 – Reação de imuno-histoquímica em pele de pacientes com leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica para os marcadores (A) e (B) CD4⁺; (C) e (D) FoxP3⁺, (E) e (F) IL-10⁺ e (G) e (H) TGF-β⁺; sendo (A), (C), (E) e (G) com padrão granulomatoso; e (B), (D), (F) e (H) não granulomatoso. (×400). As setas vermelhas sinalizam células imunomarcadas para os diferentes marcadores.

4.4.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA E REGULATÓRIA

Foi realizada análise de correlação entre os diferentes marcadores imunológicos, da resposta imune inflamatória e regulatória, por meio do teste de correlação de Pearson e Spearman, onde ρ é o coeficiente de correlação de Pearson e r_s é o coeficiente de correlação de Spearman.

Foi observada correlação positiva e forte entre as células FoxP3⁺ e IL-17⁺ ($\rho = 0,7282$, $p = 0,00092$) (Figura 36A); e correlação positiva e moderada entre as densidades de células IL-10⁺ e IFN- γ ⁺ ($r_s = 0,5343$, $p = 0,02714$) (Figura 36B), células TGF- β ⁺ e IL-17⁺ ($\rho = 0,5763$, $p = 0,01947$) (Figura 36C) e TGF- β ⁺ e IFN- γ ⁺ ($r_s = 0,5993$, $p = 0,01822$) (Figura 36D).

Figura 36 – Gráficos de dispersão correlacionando a densidade de células (A) FoxP3⁺ e IL-17⁺, (B) IL-10⁺ e IFN- γ ⁺, (C) TGF- β ⁺ e IL-17⁺ e (D) TGF- β ⁺ e IFN- γ ⁺. O valor de ρ é o coeficiente de correlação de Pearson, r_s é o coeficiente de correlação de Spearman e p é o p-valor.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Indivíduos apresentando lesões cutâneas não ulceradas, causada por *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, têm sido descritos recentemente na América Central, em países como Honduras, El Salvador, Nicarágua e Costa Rica, e foram nomeadas como leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica (LCNU). Em Honduras, existem áreas endêmicas bem identificadas desta variante não ulcerada, as quais são as mesmas onde ocorre a LV clássica, sendo a LCNU a forma mais comum da doença na região sul do país; e a população afetada é, principalmente, crianças maiores de 5 anos e adultos jovens (OPS., 2009; PONCE et al., 1991). Um fato intrigante é que mesmo a LV e LCNU ocorrendo na mesma região geográfica, a cada ano são notificados mais casos para a forma benigna da doença, a leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica e menos da forma visceral da doença (Dr. Concepción Zúniga Valeriano, comunicação pessoal²), sugerindo uma forte adaptação do parasito ao seu hospedeiro, levando à uma relação equilibrada entre eles.

Dos 20 pacientes avaliados neste estudo, em 70% dos casos as lesões eram pequenas, apresentando um diâmetro entre 3 e 5 mm, independentemente do tempo de evolução, como já descrito em um estudo desenvolvido em 1991 por Ponce e colaboradores (PONCE et al., 1991). O fato de 65% dos casos ser do sexo feminino pode sugerir uma transmissão intra ou peri domiciliar (LAINSON, 1989), já que a permanência das mulheres na casa durante todo o dia é muito mais frequente que dos homens, que exercem suas atividades, principalmente fora do domicílio.

² Valeriano, C. Z. (Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras); Comunicação pessoal; 2011.

No exame parasitológico direto, foi observada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em 100% dos casos, porém na reação de imuno-histoquímica foi possível visualizar parasitos somente em 55% dos casos. Embora a reação de imuno-histoquímica tenha sido descrita como mais sensível que o exame direto (MOREIRA et al., 2007), nossos resultados não mostraram isto, provavelmente, devido ao baixo parasitismo observado na leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, o que comprometeu a sensibilidade da técnica.

As alterações histopatológicas mais significativas foram observadas na derme e caracterizadas por um infiltrado inflamatório linfohistiocitário de intensidade variável e associado à formação de granulomas epitelioides. A presença de reação granulomatosa foi associada a um infiltrado inflamatório variando de moderado a intenso, principalmente difuso, com evidência de células gigantes e necrose focal em alguns casos. As células predominantes no infiltrado inflamatório são os linfócitos, seguidos pelos macrófagos, sendo que em alguns casos a presença destes tipos celulares era equivalente. Nestes casos, os macrófagos se mostram frequentemente vacuolizados, o que sugere que estas células estão ativadas (KAYE; SCOTT, 2011; LIU; UZONNA, 2012). O infiltrado inflamatório mais leve, discreto e focal, foi observado preferencialmente na derme superficial, com tendência a distribuição perivascular. Já as alterações histopatológicas identificadas na epiderme mostraram-se mais leves e correspondem a leve adelgaçamento, leve acantose e exocitose focal linfohistiocitária. Vale salientar que formas sugestivas do parasito só foram observadas em 55% dos casos, nos cortes corados pelo HE e confirmados por imuno-histoquímica; apesar de todos os esfregaços de raspado das lesões de pele terem mostrado a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Estes achados histopatológicos diferem do que tem sido descrito na literatura para a leishmaniose tegumentar causada por espécies dermatrópicas do parasito como *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (SILVEIRA et al., 2008), o que reforça o papel do parasito na modulação do espectro clínico, histopatológico e imunológico da infecção (SILVEIRA et al., 2009). As alterações histopatológicas em lesões cutâneas causadas por *Leishmania (L.) amazonensis* são caracterizadas por um infiltrado denso de macrófagos vacuolizados na derme, ricamente parasitados, dando a aparência de granuloma macrofágico, junto ao infiltrado celular linfoplasmocitário discreto com áreas incipientes de necrose, cercadas por células epitelioides. Por outro lado, as lesões cutâneas causadas por *Leishmania (V.) braziliensis* são caracterizadas por um infiltrado linfoplasmocitário no qual macrófagos e parasitos são geralmente escassos, linfócitos e plasmócito são frequentes no infiltrado, assim como a presença de granulomas epitelioides (SILVEIRA et al., 2008; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Além disso, também difere dos achados nas lesões cutâneas no Velho Mundo, uma vez que a PKDL causada por *Leishmania (L.) donovani* é caracterizada por um infiltrado inflamatório difuso linfoplasmohistiocitário sem formação de granuloma, ou em outros casos por um infiltrado nodular e difuso de granulomas bem formados, compostos de macrófagos epitelioides, linfócitos e plasmócitos, além de células gigantes tipo Langhans, com número variável de parasitos (MEHREGAN; MEHREGAN; MEHREGAN, 1999). Já, a leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (L.) infantum* mostra na fase inicial, um infiltrado inflamatório denso e difuso na derme, composto de histiócitos, linfócitos e plasmócitos; parasitos podem ser visualizados dentro dos histiócitos, eosinófilos e neutrófilos são raros. Na fase crônica, o infiltrado inflamatório é granulomatoso com parasitismo discreto (AGUADO et al., 2013; DEL GIUDICE et al., 1998).

A análise imuno-histoquímica das lesões cutâneas de pacientes com LCNU mostrou no infiltrado inflamatório a presença de todos os marcadores utilizados neste estudo, linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e células T_{reg} FoxP3⁺, e a expressão de citocinas TGF-β⁺, IL-10⁺, IL-17⁺, IL-6⁺ e IFN-γ⁺.

Na resposta inflamatória das lesões de leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica observamos uma correlação positiva e forte entre a densidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, interessante, foi observada também uma correlação positiva e forte entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com IFN-γ⁺, sugerindo que esta citocina poderia estar sendo secretada por ambos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, principalmente por linfócitos T CD8⁺; uma vez que os linfócitos T CD8⁺ são a célula predominante no infiltrado inflamatório, sugerindo que os linfócitos T CD8 têm um papel protetor na LCNU. Na leishmaniose cutânea, a habilidade de células T CD8 na contribuição dos mecanismos protetores ou patológicos está diretamente relacionada com suas funções efetoras; são protetoras quando produzem IFN-γ, o qual além de ativar macrófagos para lise parasitária, também promove a diferenciação de células Th0 em células Th1. Por outro lado, as células T CD8 exercem um papel patológico quando apresentam um fenótipo citotóxico ou citolítico no qual incrementam a morte celular, levando a uma resposta inflamatória exacerbada que promove o dano tecidual (NOVAIS; SCOTT, 2015; RUIZ; BECKER, 2007). Estudos mostram que na leishmaniose cutânea e mucocutânea causada por *Leishmania braziliensis* as células T CD8 contribuem na exacerbação da doença devido a sua função citolítica e a severidade da doença nestes pacientes está diretamente associada com o aumento do número de células T CD8 expressando granzima (DA SILVA; BRODSKYN, 2014; NOVAIS et al., 2013; NOVAIS; SCOTT, 2015; STÄGER; RAFATI, 2012). Por outro lado, na LC, LCM e na leishmaniose visceral experimental murina, se tem

evidências de que as células T CD8 são essenciais para o controle da infecção primária e secundária, as células T CD8 são ativadas, produzem quimiocinas, são uma fonte importante de IFN- γ que auxiliam na formação de granulomas e redução da carga parasitária (NOVAIS; SCOTT, 2015; STÄGER; RAFATI, 2012).

Um dado interessante, é que nosso estudo mostrou uma correlação positiva e moderada entre as células IFN- γ^+ e células iNOS $^+$ (dados não mostrados) o que sugere ativação celular, produção de óxido nítrico e lise parasitária. Estudos mostram que, na leishmaniose, a produção de IFN- γ e a expressão de iNOS estão diretamente correlacionadas com a redução de células parasitadas no sítio da infecção (CASTELLANO et al., 2009; HERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2010)

Em relação a resposta imune regulatória, observamos uma correlação positiva e forte entre a densidade de células T CD4 $^+$ e a densidade de células FoxP3 $^+$, o que nos sugere que uma parte substancial da população de linfócitos T CD4 podem ser células T_{reg}. Observamos também uma correlação positiva e moderada entre as células FoxP3 $^+$ e TGF- β^+ , porém entre células FoxP3 $^+$ e IL-10 $^+$ não houve correlação, o que nos sugere que na LCNU, as células T_{reg} estão regulando o processo inflamatório, principalmente através da produção de TGF- β^+ , citocina que, dependendo do ambiente e da concentração em que é produzida, pode apresentar propriedades pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (OMER; KURTZHALS; RILEY, 2000). Além disso, sugere que a presença de células T_{reg}, TGF- β^+ e IL-10 $^+$, embora em pequenas quantidades, são importantes para manter um balanço na resposta imune celular, evitando danos teciduais e levando à baixa persistência parasitária no tecido, necessária para a manutenção de uma imunidade protetora e duradoura (BELKAID, 2003; CAMPANELLI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014).

Em nosso estudo, o papel das células Th17 na LCNU foi avaliado pela produção da citocina IL-17. Observamos uma correlação positiva e moderada entre linfócitos T CD4⁺ e células IL-17⁺, o que pode sugerir que uma parte da população de linfócitos T CD4⁺ pode ser de linfócitos Th17. A diferenciação de células Th17 e T_{reg} estão reciprocamente interligadas, uma vez que ambas necessitam de TGF- β para seu desenvolvimento. A sinergia entre TGF- β e IL-6 é necessária para uma produção adequada de IL-17 (BETTELLI et al., 2008; KORN et al., 2009; MARTINEZ et al., 2008), em nossos resultados, observamos uma correlação positiva e moderada entre as células IL-17⁺ e TGF- β ⁺, porém não houve correlação entre células IL-6⁺ e células IL-17⁺ assim como células TGF- β ⁺, o que nos sugere que IL-6 nesta forma clínica de leishmaniose poderia estar exercendo um papel pró-inflamatório. A literatura mostra que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida na resposta imune inata e adaptativa, produzida por uma grande variedade de células como: células dendríticas, monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos B e T, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, entre outras, no sítio de infecção e contribui na inflamação local por induzir a ativação de células T e B (FUJIMOTO et al., 2011; KLING et al., 2011; KORN et al., 2009).

Um dado interessante de se ressaltar é que quando somamos as densidades celulares das populações de células FoxP3⁺ e IL-17⁺ o número é maior à população de linfócitos T CD4⁺, sugerindo que outras células inflamatórias poderiam ser as responsáveis pela produção de IL-17 (Th17) no tecido, tais como linfócitos T CD8⁺, células T $\gamma\delta$, células NK, monócitos e neutrófilos (BACELLAR et al., 2009; BETTELLI et al., 2008; KORN et al., 2009) na LCNU. Por outro lado, observamos uma correlação positiva entre células FoxP3⁺ e IL-17⁺, relatos na literatura mostram que existe uma

relação recíproca entre células T_{reg} (FoxP3) e células Th17, como mencionado anteriormente ambas populações celulares necessitam de TGF- β para sua diferenciação e um balanço eficiente entre células T_{reg} (FoxP3) e células Th17 poderia fornecer um equilíbrio entre tolerância e imunidade (BETTELLI et al., 2008; KORN et al., 2009).

Os dados obtidos neste estudo sugerem que os linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e as células T_{reg} FoxP3 $^+$; assim como a expressão das citocinas TGF- β^+ , IL-10 $^+$, IL-17 $^+$, IL-6 $^+$ e IFN- γ^+ tem um papel importante na imunopatogênese da LCNU, modulando o balanço entre a resposta imune do hospedeiro e o parasito, resultando na manutenção de um baixo parasitismo e controlando o tamanho da lesão (BELKAID, 2007).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a participação de células FoxP3⁺, TGF- β ⁺ e IL-10⁺ foi discreta, assim como das células IL-17⁺; com uma participação maior da resposta inflamatória (linfócitos T-CD8⁺ e células IFN- γ ⁺) na leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica, capaz de controlar o parasitismo e, conseqüentemente, a evolução do tamanho da lesão, porém, embora mais discreta, a resposta imune regulatória pode ser responsável para manter um balanço na resposta imune celular evitando danos teciduais e levando à baixa persistência parasitária no tecido, necessária para a manutenção de uma imunidade protetora e duradoura.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1 ANEXO A - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/03/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 051/15 intitulado: “**LEISHMANIOSE CUTÂNEA NÃO ULCERADA OU ATÍPICA CAUSADA PELA LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI NO MUNICÍPIO DE AMAPALA, VALLE, HONDURAS: CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES DE PELE.**” 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 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Marcia Dalastra Laurenti

Pesquisador (a) Executante: Carmen Maria Sandoval Pacheco

CEP-FMUSP, 18 de Abril de 2015.

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

7.2 ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Asentimiento

Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)
Secretaría de Salud de Honduras
Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de São Paulo,
Brasil.

Infección humana por *Leishmania (L) infantum/chagasi* en Centro América, con énfasis en la caracterización clínico-inmunológica en Honduras, expresión génica y el diagnóstico molecular en Brasil, años 2014 - 2017.

Queremos contarle acerca de un estudio de investigación que estamos realizando. Un estudio de investigación, que es una manera de aprender acerca de algo que no sabemos. Quisiéramos conocer más sobre *Leishmania*, que es un parásito que puede causarle lesiones (granos) en la piel o una inflamación en su abdomen. Queremos saber cuántos niños están infectados por este parásito. Le estamos preguntando si quiere participar de este estudio, ya que con su ayuda podríamos entender más esta enfermedad.

Quisiéramos saber si usted tiene el parásito *de Leishmania*. Usted puede elegir si desea o no participar en este estudio de investigación. Si elige participar, nosotros vamos a realizar unas pequeñas pruebas que nos ayudarían a diagnosticar si tiene o no Leishmaniasis. Lo primero es aplicarle la prueba de Montenegro que consiste en una inyección en su brazo que luego será revisada por el personal de salud dos días después. También se le tomara parte de su lesión con un instrumento de laboratorio y una muestra de sangre de su brazo izquierdo o derecho. Estas muestras las llevaremos a un laboratorio, donde realizaremos todos los estudios que nos dirán si usted tiene el parásito o no. Si tiene el parásito, le avisaremos a sus padres y ellos le traerán al doctor para que reciba el tratamiento adecuado.

A veces les pasan cosas a las personas que participan en estudios de investigación que pueden lastimarlas o hacer que se sientan mal. Estas cosas se llaman riesgos. Los riesgos de este estudio son que le puede doler el brazo y/o enrojecimiento en el lugar donde lo pinchamos. También puede ponerse morado el lugar donde le tomemos la muestra. Donde le tomemos parte de su lesión se puede producir un pequeño sangrado cuando se le tome la muestra para evitar esta situación cubriremos la lesión con una gaza y esparadrapo. Si usted se siente enferma/o y/o dolorida/o, debe decirle a sus padres.

Este estudio nos ayudará a saber si usted tiene este parásito. Si lo tuviese recibirá los remedios necesarios para que no se enferme. Además, aprenderemos cosas que nos ayudarán a que otros niños no se infecten con este parásito. Este estudio enseñará a la gente la importancia que tiene esta enfermedad gracias a tu participación.

Puede hacer preguntas en cualquier momento. Puede también preguntar ahora si lo desea. O después. Puede preguntarme a mí o puede hablar con cualquier otra persona en cualquier momento que dure el estudio.

Si tiene preguntas sobre el estudio o cualquier problema que tenga usted o sus padres puede llamar al Dr. Concepción Zúniga al celular # 99322424 o con el Dr. Wilfredo Sosa al teléfono del trabajo-Universidad Nacional Autónoma de Honduras # 2232-5836, ó celular # 99633525.

Usted no tiene obligación de participar en el estudio si no quiere. Nadie se va a enojar con usted si no participa. Solamente le pedimos que nos lo diga. Y, en el caso que acepte participar, recuerde que puede cambiar de opinión si decide que no quiere estar más.

Declaración de Consentimiento:

He leído el formulario y he decidido participar en este proyecto de investigación. Me han explicado en forma satisfactoria sus objetivos, aspectos sobre mi participación y los posibles riesgos e inconvenientes. Entiendo que puedo abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee. Mi firma también indica que he recibido copia de este formulario de consentimiento.

_____	_____
Nombre del participante	Fecha
_____	_____
Pariente/Persona legalmente autorizada (si aplica)	Fecha
_____	_____
Persona que obtiene el consentimiento	Fecha

Firma de los Investigadores o Responsables:

“He explicado y discutido lo mejor que he podido todos los contenidos del estudio, incluyendo toda la información contenida en este consentimiento. Han sido respondidas con veracidad todas las preguntas que los sujetos del estudio, sus padres o tutores han realizado.”

Investigador/Persona que obtiene el consentimiento

_____	_____
Firma	Fecha

7.3 ANEXO C - Comitê de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas da Universidad Nacional Autónoma de Honduras

UNAH

FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

CONSTANCIA DE EXTENSIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 03-2014

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

Título del proyecto: "Infección humana por Leishmania (L) infantum/chagasi en las Américas, con énfasis en la caracterización clínico-inmunológico en Honduras (América Central), expresión génica y el diagnóstico molecular en Brasil (Sur), años 2014-2017"

Equipo de Investigación: Márcia Dalastra Laurenti (Investigadora principal, Brasil), Concepción Zúniga Valeriano (Investigador principal, Honduras), Wilfredo Humberto Sosa (Co-investigador), Carmen María Sandoval Pacheco (Estudiante co-investigador) y Gabriela Venicia Araujo Flores (Estudiante co-investigador).

Institución (es): Laboratorio de Patología en Enfermedades Infecciosas (LIM50), Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Sao Paulo (USP); Ministerio de Salud Pública de Honduras; Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH); Laboratorio de Leishmaniosis, Instituto Evandro Chagas (IEC, SVS, MS), Ananindeua, Pará; y Núcleo de Medicina Tropical, Universidad Federal de Pará (UFPA), Belém, Pará.

Fecha de presentación al comité: 14 / 10 / 2016

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis para extender la fecha de aprobación, en vista que el protocolo de investigación no ha sido modificado, este comité resuelve **APROBAR** la extensión.

Duración de la extensión: 19 / 10 / 2016 al 19 / 10 / 2017

Para los fines de los interesados se les extiende la presenta a los diecinueve días del mes de octubre del 2016.

Dra. Wendy Murillo
Presidente CEI-MEIZ

Dr. Jafet Ortiz
Secretario Suplente CEI-MEIZ

7.4 ANEXO D - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LEISHMANIOSE CUTÂNEA NÃO ULCERADA OU ATÍPICA NOS MUNICÍPIOS DE AMAPALA (VALLE) E OROCUINA (CHOLUTeca), HONDURAS: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA REGULATÓRIA in situ EM LESÕES DE PÉLE.

Pesquisador: Marcia Dalastra Laurenti

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64223917.1.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.938.092

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa que servirá de base para mestrado acadêmico, envolvendo enfermidade muco-cutânea endêmica na América latina, a leishmaniose. O estudo envolverá formas atípicas da leishmaniose, cujos aspectos patológicos são ainda pouco conhecidos, e incluirá pacientes oriundos de Honduras.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos da pesquisa incluem a avaliação das alterações histopatológicas das lesões de pele causadas por *Leishmania* (L.) infantum chagasi de pacientes com a forma cutânea não ulcerada ou atípica dos municípios de Amapala, (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras, com caracterização do padrão da resposta regulatória in situ em lesões de pele causadas por *Leishmania* (L.) infantum chagasi de pacientes com a forma cutânea não ulcerada ou atípica dos municípios de Amapala, (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras, por imunoistoquímica utilizando marcadores para linfócito T (CD4), T regulatório (FoxP3), e antígenos intracelulares como: IL-10, TGF- β , IFN- γ e IL-17.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa poderá proporcionar benefícios futuros com relação ao diagnóstico precoce da

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.938.092

enfermidade, e intervenção terapêutica específica igualmente precoce, a fim de se minimizarem os riscos de leishmaniose visceral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Existe uma lacuna no conhecimento da relação parasita-hospedeiro na leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica. Assim, o melhor conhecimento da resposta imune regulatória *in situ* das lesões cutâneas desta forma clínica atípica da infecção causada por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na América Central possui relevância. Sob o ponto de vista clínico, a leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica é benigna; entretanto, para a saúde pública, estes pacientes com esta forma são reservatórios do parasita e fonte de infecção para os flebotomíneos, que os repassarão a novos hospedeiros humanos. O principal risco desta forma de manifestação clínica da leishmaniose é o processo de visceralização, que pode ocorrer em crianças menores de cinco anos de idade com problemas nutricionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. Sugere-se inclusão de informação sobre recursos financeiros destinados à pesquisa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de interesse e de relevância para o estudo de zooparasitoses

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_852855.pdf	31/01/2017 13:59:47		Aceito
Outros	Comite_etica_Brazil.pdf	30/01/2017 20:39:55	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Brochura Pesquisa	CEP_FMUSP.pdf	30/01/2017 20:30:15	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostro.pdf	30/01/2017 20:29:39	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_espanhol_portugues.pdf	12/01/2017 14:51:37	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.938.092

Ausência	TCLE_espanhol_portugues.pdf	12/01/2017 14:51:37	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Outros	comite_honduras_2016.pdf	12/01/2017 14:46:11	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Resposta_regulatoria_na_pele.p df	12/01/2017 14:40:28	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

7.5 ANEXO E - Aspectos clínico e epidemiológicos dos pacientes acometidos por Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica, Honduras

Nº de caso	Município	Idade (anos)	Sexo	Número de lesões	Diâmetro da lesão (mm)	Localização	Tempo de evolução (meses)
1	Amapala	9	F	1	4	Extremidade superior esquerda	1
2	Amapala	33	F	2	NI	Peito direito, testa	5
3	Amapala	14	F	1	4	Extremidade superior direita	NI
4	Amapala	33	M	1	NI	Extremidade superior esquerda	5
5	Amapala	52	F	1	3	Extremidade superior esquerda	180
6	Amapala	30	F	1	3	Extremidade superior direita	48
7	Amapala	43	F	15	4	Extremidade superior direito e esquerdo	240
8	Amapala	30	F	1	4	Extremidade inferior direita	2
9	Amapala	53	M	2	4	Extremidade inferior esquerdo e superior direito	NI
10	Amapala	NI	NI	NI	NI	NI	NI
11	Amapala	28	F	1	5	Extremidade inferior esquerdo	12
12	Orocuina	70	F	1	3	Peito direito	6
13	Orocuina	43	F	1	3	Peito direito	4
14	Orocuina	40	F	3	3	Peito direito e extremidade superior esquerda e direita	2
15	Orocuina	19	F	1	4	Extremidade superior direita	NI
16	Orocuina	11	M	1	NI	Costas	NI
17	Orocuina	50	F	1	3	Peito esquerdo	24
18	Orocuina	10	M	3	3	Costas	36
19	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
20	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Legenda: F: feminino; M: masculino; mm: milímetro; Nº: número; NI: não informado

7.6 **ANEXO F** - Alterações histopatológicas caracterizadas na epiderme e derme de pacientes com Leishmaniose Cutânea não Ulcerada ou Atípica em Honduras

Epiderme			Derme										
Nº	Casos	Acanthose	Aflamento	Exocitose	Intensidade do infiltrado	Diferencial			Localização do infiltrado	Granuloma	Célula gigante	Necrose	Parasita
						Linfócito	Macrófago	Plasmócito					
1	AM-01	Leve	-	-	++	+++	++	+	Difuso	✓	-	-	+
2	AM-02	-	Leve	-	+++	+++	++	+	Difuso	✓	-	-	+
3	AM-05	-	-	-	+	+	+	+	Focal	-	-	-	-
4	AM-06	-	-	-	+	++	-	-	Focal	-	-	-	+
5	AM-07	-	Leve	-	+++	+++	++	+	Difuso	✓	✓	✓	+
6	AM-08	-	Leve	-	++	+++	++	+	Difuso	✓	✓	✓	+
7	AM-09	-	Leve	-	+	+++	+	+	Focal	-	-	-	-
8	AM-10	Leve	Leve	-	++	+++	++	+	Focal	✓	✓	-	-
9	AM-11	-	Leve	Focal	+++	+++	++	+	Difuso	✓	✓	✓	+
10	AM-12	-	Leve	Focal	++	+++	++	+	Difuso	✓	-	✓	+
11	AM-13	-	-	-	++	+++	++	-	Focal	✓	✓	-	+
12	CHO-001	-	-	-	+	+	+	-	Difuso	-	-	-	-
13	CHO-002	-	-	-	+	++	+	-	Focal	-	-	-	-
14	CHO-003	-	-	-	+	++	+	+	Focal	-	-	-	-
15	CHO-005	-	-	-	+	+	-	-	Focal	-	-	-	-
16	CHO-006	-	Leve	Focal	++	+++	++	+	Difuso	✓	✓	-	+
17	CHO-010	-	-	-	+	+	+	-	Focal	-	-	-	-
18	CHO-011	-	Leve	-	+++	+++	++	+	Difuso	✓	✓	-	+
19	22 Sin rot	-	-	-	++	++	++	+	Focal	✓	-	-	-
20	23 Sin rot	-	Leve	Focal	+++	+++	++	+	Difuso	✓	✓	-	+

Legenda: - Negativo; + Discreto; ++ moderado; +++ intenso; ✓ presença

Legenda: - Negativo; + Discreto; ++ moderado; +++ intenso; ✓ presença

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUADO, M. et al. Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, v. 104, n. 4, p. 334–342, maio 2013.

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. 341–8, maio 2004.

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

ASKENASY, N.; KAMINITZ, A.; YARKONI, S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, n. 5, p. 370–375, maio 2008.

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, 1 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.

BELKAID, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert opinion on biological therapy*, v. 3, n. 6, p. 875–85, set. 2003.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature reviews. Immunology*, v. 7, n. 11, p. 875–88, nov. 2007.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annual review of immunology*, v. 27, p. 551–89, 2009.

BELLI, A. et al. Widespread atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Nicaragua. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 61, n. 3, p. 380–385, 1999.

BERNAL, I. D. V. D. V. et al. Manual de procedimientos para el diagnostico y control de la leishmaniasis en Centro America. Medellin, Colombia, Colombia: Universidad de Antioquia, 2010.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, v. 453, n. 7198, p. 1051–7, 19 jun. 2008.

BRUZUAL, E.; ARCAY, L.; DE LA PARTE-PÉREZ, M. A. Diseminación tisular y efectos histopatológicos producidos por *Leishmania mexicana amazonensis* en roedores infectados experimentalmente. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 28, n. 2, p. 139–144, 2008.

CAMPANELLI, A. P. et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *The Journal of infectious diseases*, v. 193, n. 9, p. 1313–22, 1 maio 2006.

CAMPINO, L. et al. Cutaneous leishmaniosis in Portugal due to *Leishmania infantum* MON-1. *Acta medica portuguesa*, v. 18, n. 6, p. 475–7, 2006.

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.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, v. 3, p. 301, 2012.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Human Immunology*, v. 70, n. 6, p. 383–390, jun. 2009.

CEDILLOS, R. A.; ROMERO CHÉVEZ, J. E.; GAVIDIA, M. E. Leishmaniasis en El Salvador. *Minerva Revista en línea CIC-UES Enero-Julio*, v. 4, 2014.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*, v. 2010, p. 719361, 2010.

Clima de Honduras. Disponível em: <http://www.clima-de.com/honduras/#Clima_deHonduras_Zona_Sur>. Acesso em: 4 jul. 2017.

DA SILVA, C. S.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in public health*, v. 2, p. 1–6, 2014.

DE LIMA, L. F. A. Influência do gênero e da infecção materna na resposta à *Leishmania braziliensis* em filhotes de hamster. Universidade Federal do Ceará, 2008.

DEL GIUDICE, P. et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case reports and literature review. *Archives of dermatology*, v. 134, n. 2, p. 193–8, fev. 1998.

EZQUERRA, A. J. P. La leishmaniasis: de la biología al control. Segunda ed. Madrid, España: Instituto de Salud Carlos III, 2001.

FUJIMOTO, M. et al. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 1, p. 32–40, 1 jan. 2011.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Cutaneous leishmaniasis. *Actas dermo-sifiliográficas*, v. 96, n. 1, p. 1–24, 2005.

GOVINDARAJ, C. et al. TNFR2 expression on CD25^{hi}FOXP3⁺ T cells induced upon TCR stimulation of CD4 T cells identifies maximal cytokine-producing effectors. *Frontiers in Immunology*, v. 4, p. 233, 6 ago. 2013.

HALL, B. M. et al. Distinct regulatory CD4⁺T cell subsets; differences between naïve and antigen specific T regulatory cells. *Current Opinion in Immunology*, v. 23, n. 5, p. 641–647, out. 2011.

HERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS*

Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 11, p. e871, 2 nov. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA DE HONDURAS. Instituto Nacional de Estadística (INE), Honduras. Disponível em: <<http://181.189.226.83/binhnd/RpWebEngine.exe/Portal>>. Acesso em: 4 jul. 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–15, 11 jul. 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.

KLING, J. et al. Redundancy of interleukin-6 in the differentiation of T cell and monocyte subsets during cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 129, n. 3, p. 270–276, nov. 2011.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, v. 27, n. 1, p. 485–517, abr. 2009.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: *Demographic and Vector-Borne Diseases*. M. W. Serv ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1989. p. 85–106.

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. 13–32, jun. 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: WALLACE PETERS, R. K.-K. (Ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. Volume I. Biology and epidemiology. illustrate ed. Londres: Academic Press, 1987. p. 120.

LAURENTI, M. D. *Patologia e Patogenia das Leishmanioses*. Universidade de São Paulo, 2010.

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. 1898–909, dez. 2011.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 83, 2012.

LÓPEZ, S. DEL P. A.; RESTREPO, S. M. R. Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. *Iatreia*, v. 13, n. 3, p. 167-178, 2000.

MARTINEZ, G. J. et al. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008.

MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology and immunology*, v. 51, n. 12, p. 1139–47, 2007.

MATUTE, N. et al. Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con leishmaniasis atendidos en el Hospital Escuela. *Revista Medica HONDUR*, v. 77, n. 1, p. 7–15, 2009.

MEHREGAN, D. R.; MEHREGAN, A. H.; MEHREGAN, D. A. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*, v. 17, n. 3, p. 297–304, 1999.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.*, v. 32, n. 5, p. 184–188, 2009.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary parasitology*, v. 145, n. 3–4, p. 245–52, 30 abr. 2007.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 132, n. 3, p. 1501–5, mar. 1984.

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

NAVIN, T. R. et al. Epidemiologic study of visceral leishmaniasis in Honduras, 1975–1983. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 34, n. 6, p. 1069–1075, 1985.

NOVAIS, F. O. et al. Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 7, p. e1003504, 18 jul. 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.

NOYES, H. et al. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Experimental parasitology*, v. 85, p. 264–273, 1997.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, v. 2, n. 2, p. 135–46, maio 2010.

O.M.S. Control de la leishmaniasis. Serie de informes técnicos 949, p. 200, 2010.

OMER, F. M.; KURTZHALS, J. A.; RILEY, E. M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitology today* (Personal ed.), v. 16, n. 1, p. 18–23, jan. 2000.

OPS. Manual de manejo de enfermedades parasitarias prioritarias en Honduras. Segunda ed. Tegucigalpa: OPS (Organizacion Panamericana de la Salud), 2009.

OPS/OMS. OPS OMS | Información general: Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=es>. Acesso em: 14 dez. 2016.

PONCE, C. et al. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous

leishmaniasis in Honduras. *Lancet* (London, England), v. 337, n. 8733, p. 67–70, 12 jan. 1991.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *Journal de Pediatria*, v. 80, n. 2, p. 141–146, 2004.

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.

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.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 29, n. 12, p. 671–678, dez. 2007.

RUSSELL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunology today*, v. 10, n. 10, p. 328–33, out. 1989.

SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*, v. 7, n. 12, p. 1707–1713, dez. 2005.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina*, v. 22, n. 1, p. 9–20, 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. 423–431, ago. 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 104, n. 8, p. 529–535, ago. 2010.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239–251, maio 2004.

SINGH, A.; RAMESH, V.; RAMAM, M. Histopathological characteristics of post kala-azar dermal leishmaniasis: A series of 88 patients. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, v. 81, n. 1, p. 29, 2015.

SOUZA, M. A. et al. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scandinavian journal of immunology*, v. 76, n. 2, p. 175–80, ago. 2012.

STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8⁺ T cells in *Leishmania* infections: friends or foes? 2012.

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*, v. 13, n. 2, p. 139–145,

fev. 2007.

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.

VALLADEAU, J.; SAELAND, S. Cutaneous dendritic cells. Seminars in immunology, v. 17, n. 4, p. 273–83, ago. 2005.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. BMB reports, v. 42, n. 12, p. 776–87, 31 dez. 2009.

WAN, Y. Y. Regulatory T cells: immune suppression and beyond. Cellular & Molecular Immunology, v. 7, p. 204–210, 2010.

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.

YOUNG, D.; DUCAN, M. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the west indies, central and south America (Diptera: Psychodidae). Florida, USA: American Entomological Institute, 1994.

ZELEDÓN, R. et al. Atypical cutaneous leishmaniasis in a semiarid region of north-west Costa Rica. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 83, n. 6, p. 786, 1989.

ZENG, W.-P.; CHANG, C.; LAI, J.-J. Immune suppressive activity and lack of T helper differentiation are differentially regulated in natural regulatory T cells. The Journal of Immunology by guest on, v. 183, p. 3583–3590, 2017.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). Parasites & Vectors, v. 9, n. 1, p. 464, 23 dez. 2016.