

Joyce Prieto Bezerra de Menezes

**Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose
Tegumentar Americana causada por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*)
*braziliensis***

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria de
Castro Gomes

**São Paulo
2013**

Joyce Prieto Bezerra de Menezes

**Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose
Tegumentar Americana causada por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*)
*braziliensis***

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria de
Castro Gomes

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Menezes, Joyce Prieto Bezerra de

Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Joyce Prieto Bezerra de Menezes. -- São Paulo, 2013.

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

Orientadora: Claudia Maria de Castro Gomes.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Interleucina-23 3.Interleucina-17
4.Foxp3 5.*Leishmania braziliensis* 6.*Leishmania amazonensis*

USP/FM/DBD-272/13

Dedico este trabalho o meu pai, Eduardo Prieto Bezerra de Menezes pelos conselhos,
apoio, carinho e compreensão nesse caminho percorrido até agora
À minha avó, Ruth Prieto Bezerra de Menezes pelo incentivo e pelo enorme carinho
Ao meu avô Francisco Eduardo Bezerra de Menezes (*in memoriam*) por representar meu
referencial de honra, coragem e determinação
Ao meu irmão Eduardo Gomes Prieto Bezerra de Menezes pela amizade e lealdade
Ao meu noivo, Flavio Luiz Nunes de Barros pelo apoio, amor e carinho incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo, me guiando em todas as decisões, pelas oportunidades e pela família maravilhosa que me apoiou em todos momentos.

À minha família, ao meu pai Eduardo e minha avó Ruth, por todo apoio, carinho e por compreenderem a minha ausência. Obrigada pela confiança que depositaram em mim. Ao meu irmão Eduardo e cunhada Fabiana, pela amizade e incentivo.

Ao meu noivo Flavio, por todo carinho, amor, paciência e conselhos durante esta trajetória.

Aos meus queridos sogros, Elizabeth Nunes de Barros e Miguel Flavio de Barros por todo o apoio, amizade, carinho e incentivo.

Aos meus grandes amigos Daniel Felipe Telles Gori e Izabella da Silva Gomes Oliveira, pela amizade de muitos anos, obrigada por fazerem parte da minha vida.

À Profa. Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes, pela orientação desde a iniciação científica. Muito obrigada pela oportunidade de realizarmos juntas mais este projeto, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela paciência e incentivo ao longo desses anos.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira, por compartilhar sua enorme experiência sobre as leishmanioses, contribuindo para o enriquecimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett e a Prof. Dra. Márcia Dalastra Laurenti pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM-50.

À Dr. Áurea Favero, pela ajuda no estudo histológico das lesões, sua experiência e conselhos foram de extrema importância.

Ao Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso, Dra. Márcia Dalastra Laurenti e Dr. Fernando Tobias Silveira pela contribuição com críticas e sugestões durante o exame de qualificação.

À Izildinha Benedita de Moraes, pela amizade que construímos, pela ajuda nas inúmeras reações de imunistoquímica e pelo carinho.

À Marliane Batista Campos por ter concedido às biópsias utilizadas neste trabalho, por me permitir acompanhar o atendimento direto aos pacientes e funcionamento do Serviço de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas e pela ótima recepção durante minha estadia em Belém.

A todos os alunos, professores e funcionários do LIM-50 que tiveram uma participação direta e indireta no desenvolvimento deste projeto. Muito Obrigada. Dr. Felipe, Carol, Thaíse, Edson, Lia, Mariana e Bruno.

À CAPES pela bolsa concedida, a qual serviu de incentivo para a realização do projeto de Mestrado. À FAPESP pelos recursos destinados a compra dos materiais que possibilitaram a realização deste trabalho (Proc.FAPESP 2006/56319-1).

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Considerações gerais | 2 |
| 1.2. Formas Clínicas da LTA..... | 7 |
| 1.3. Interação parasito-hospedeiro..... | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1. Objetivo Geral | 18 |
| 2.2. Específicos..... | 18 |
| 3. METODOLOGIA | 19 |
| 3.1 Casuística..... | 20 |
| 3.2. Exame parasitológico | 20 |
| 3.2.1. <i>Esfregação corado pelo Giemsa</i> | 20 |
| 3.2.2. <i>Biópsias de lesões cutâneas e/ou mucosa</i> | 21 |
| 3.3. Isolamento e caracterização do parasita | 21 |
| 3.4. Análise histopatológica | 21 |
| 3.5. Avaliação imunopatológica | 22 |
| 3.5.1. <i>Reação de imunoistoquímica</i> | 22 |
| 3.5.1.1. Anti-Foxp3 | 23 |
| 3.5.1.2. Anti-IL-17..... | 23 |
| 3.5.1.3. Anti-IL-23..... | 23 |
| 3.5.2. <i>Determinação da densidade celular</i> | 23 |
| 3.6. Teste intradérmico de Montenegro (IDRM)..... | 23 |
| 3.7. Análise dos dados | 24 |
| 4. RESULTADOS | 25 |
| 4.1 Aspectos clínico-epidemiológicos dos pacientes | 26 |
| 4.2. Análise histopatológica das lesões cutâneas de LTA | 27 |
| 4.3. Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 no amplo espectro de LTA..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.4. Análise de correlação entre os marcadores imunológicos..... | 37 |
| 5. DISCUSSÃO | 38 |
| 6. CONCLUSÕES | 46 |
| 7. ANEXOS | 49 |
| ANEXO A: LOCALIZAÇÃO E TIPOS DE LESÕES | 50 |
| ANEXO B: FICHA CLÍNICA | 51 |
| ANEXO C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 53 |
| ANEXO D: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-FMUSP | 55 |
| ANEXO E: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FMUSP | 56 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| BSA | = Albumina sérica bovina |
| CAPPesq | = Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa |
| CONEP | = Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| DAB | = Diaminobenzidina |
| Foxp3 | = <i>forkhead Box protein 3</i> |
| H2O2 | = Peróxido de hidrogênio |
| IDRM | = Intradermorreação de Montenegro |
| IFN- γ | = <i>Interferon – gamma</i> |
| IL | = Interleucina |
| iNOS | = <i>Enzyme inducible oxide nitric synthase</i> |
| iTreg | = Célula T reguladora induzida |
| LL | = Lepromatosa-lepromatosa |
| LCAD | = Leishmaniose cutânea anérgica difusa |
| LCDB | = Leishmaniose cutânea disseminada borderline |
| LCL | = Leishmaniose cutânea localizada |
| LCM | = Leishmaniose cutâneo-mucosa |
| LTA | = Leishmaniose tegumentar americana |
| <i>L. (L.)</i> | = <i>Leishmania (Leishmania)</i> |
| <i>L. (V.)</i> | = <i>Leishmania (Viannia)</i> |
| mm ² | = Milímetro quadrado (unidade de medida) |
| MHC II | = <i>Major histocompatibility complex class II</i> |
| NO | = <i>Nitric oxide</i> |
| nTreg | = Célula T regulatória natural |
| OMS | = Organização Mundial da Saúde |
| p | = p valor, nível de significância |
| PBMC | = <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> |
| PBS | = Tampão salino fosfatado |
| pH | = Potencial hidrogênio |
| RNA _m | = <i>Messenger Ribonucleic acid</i> |

| | |
|----------------|---|
| ROR γ t | = Receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico |
| SC | = Santa Cruz |
| SINAN | = Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| SVS | = Secretaria de Vigilância em Saúde |
| STAT | = <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| TT | = Tuberculóide-tuberculóide |
| Tfh | = <i>Lymphocyte T helper follicular</i> |
| Th1 | = <i>Lymphocyte T helper 1</i> |
| Th2 | = <i>Lymphocyte T helper 2</i> |
| Th9 | = <i>Lymphocyte T helper 9</i> |
| Th17 | = <i>Lymphocyte T helper 17</i> |
| TGF- β | = <i>Transforming growth factor-beta</i> |
| TNF- α | = <i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i> |
| Treg | = Célula T Reguladora |
| WHO | = <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde) |
| μ m | = Micrometro (unidade de medida) |
| μ M | = Micro Molar (unidade de medida de concentração) |
| % | = Porcentagem |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Distribuição de casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas. Média de casos anuais notificados por país de 2001 a 2010. | 3 |
| Figura 2: Número de casos de LTA notificados no Brasil de acordo com a região geográfica no período de 2000 a 2008..... | 4 |
| Figura 3: Casos de LTA do Estado do Pará notificados e confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 2013. | 4 |
| Figura 4: Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> . A: Formas promastigotas. B: Formas amastigotas no interior do macrófago. | 5 |
| Figura 5: Ciclo evolutivo dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i> , com especial referência ao ciclo da LTA. | 6 |
| Figura 6: Espectro clínico e imunopatológico da LTA de acordo com Silveira et al., 2004. | 8 |
| Figura 7: Aspectos clínicos da LTA. Leishmaniose cutânea localizada (LCL) causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> (A) e <i>L. (V.) braziliensis</i> (B). Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Silveira. | 8 |
| Figura 8: Aspectos clínicos da LTA. (C) Leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) (D) e Leishmaniose cutânea anérgica difusa causadas por <i>L. (L.) amanozensis</i> . Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando T. Silveira..... | 9 |
| Figura 9: Aspectos da LTA. Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) causada por <i>L. (V.) braziliensis</i> . Lesão de palato. Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Silveira..... | 10 |
| Figura 10: Resposta imune do homem frente à infecção por <i>Leishmania</i> sp..... | 11 |
| Figura 11: Aspectos histopatológicos das diferentes formas clínicas da LTA (40x).... | 29 |
| Figura 12: Densidade de células Tregs Foxp3+ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> | 30 |
| Figura 13: Imunomarcção de células Tregs Foxp3+ nas diferentes formas clínicas de LTA. | 31 |
| Figura 14: Densidade de células IL-17+ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> | 32 |
| Figura 15: Imunomarcção de células IL-17 ⁺ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA | 33 |

Figura 16: Densidade de células IL-23+ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. 34

Figura 17: Imunomarcção de células IL-23+ nas diferentes formas clínicas de LTA. 35

Figura 18: Imunomarcção de células Tregs Foxp3+ (A), IL-17+ (B) e IL-23+ (C) em pele humana normal (40x). 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com as diferentes formas clínicas de LTA causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*..... 26

Tabela 2: Densidade de células imunomarcadas (Foxp3+, IL-17+ e IL-23+) em lesão de pacientes com LTA, causada por *L.(L.) amazonensis (La)* e *L.(V.) braziliensis (Lb)*, oriundos do Estado do Pará. 36

Resumo

MENEZES, JPB. Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2013.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e imunopatológicas resultante da interação entre as diferentes espécies de *Leishmania* e os mecanismos de resposta imune do hospedeiro. *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as espécies de maior potencial patogênico para o homem e de importância médica no Brasil. As células TCD4, quando ativadas por antígenos via MHC II podem se diferenciar em linhagens de células efetoras como Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg). IL-23 é indispensável para as funções efetoras e manutenção de células Th17. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 em lesões cutâneas de pacientes com diferentes formas clínicas da LTA. Biópsias parafinadas de 44 pacientes foram submetidas à imunohistoquímica, sendo 6 casos de leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD^{IDRM⁻}) e leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB^{IDRM⁻}), ambas causadas por *L.(L) amazonensis* e 16 casos de leishmaniose cutânea localizada (LCL^{IDRM⁺}) também causada por *L.(L.) amazonensis*; 9 casos de LCL^{IDRM⁺}, 2 casos de LCDB^{IDRM⁻} e 5 casos de leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM^{IDRM⁺}), todos causados por *L.(V.) braziliensis*. A densidade de células Tregs Foxp3⁺ no espectro clínico da LTA mostrou um aumento progressivo partindo das formas centrais LCL causadas por *L.(V.) braziliensis* (170mm²) e *L.(L) amazonensis* (140mm²) para as formas polares, LCAD^{IDRM⁻} (289mm²) e LCDB^{IDRM⁻} (183mm²) causada por *L.(L) amazonensis*, LCDB^{IDRM⁻} (189mm²) e LCM^{IDRM⁺}, causadas por *L.(V.) braziliensis* (158mm²). A comparação entre as densidades de células IL-17⁺ nas diferentes formas clínicas da LTA mostrou um perfil semelhante também com um aumento progressivo da expressão de IL-17 partindo das formas centrais LCL^{IDRM⁺} causadas por *L.(V.) braziliensis* (232mm²) e *L.(L) amazonensis* (197mm²) em direção as formas polares, LCAD^{IDRM⁻} (470mm²) e LCDB^{IDRM⁻} (340mm²) causada por *L.(L.) amazonensis*, LCDB^{IDRM⁻} (431mm²) e LCM^{IDRM⁺} (372mm²) causada por *L.(V.) braziliensis*. A densidade de células IL-23⁺ mostrou perfil similar ao de IL-17 como no espectro de doença causada por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*: LCAD^{IDRM⁻} (687mm²), LCDB^{IDRM⁻} (518mm²) e LCL^{IDRM⁺} (348mm²) por *L.(L.) amazonensis*, LCL^{IDRM⁺} (457mm²), LCDB^{IDRM⁻} (609mm²) e LCM^{IDRM⁺} (568mm²) *L. (V.) braziliensis*. Diante dos nossos achados, observa-se que as células Foxp3⁺, IL-17⁺ e IL-23⁺ desempenham um papel importante na imunopatogênese das diferentes formas clínicas da LTA causadas por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*, caracterizada por uma resposta imune polarizada de diferente expressão patológica.

Descritores: Leishmaniose cutânea; Interleucina-23; Interleucina-17; Foxp3; *Leishmania braziliensis*; *L amazonensis*.

Summary

MENEZES, JPB. Expression of Foxp3, IL-17 and IL-23 in American cutaneous leishmaniasis due *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Medical School, 2013.

The American cutaneous leishmaniasis (ACL) presents a wide spectrum of clinical and immunopathological manifestations resulting from the interaction between the different species of *Leishmania* and the mechanisms of the host immune response. *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* are the species with the largest pathogenic potential for humans and medical importance in Brazil. The CD4⁺ T cells can be differentiated into effector cell lines as Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells (Treg). IL-23 is essential for effector functions and maintenance of Th17 cells, that produces IL-17. The aim of this study was to evaluate the expression of Foxp3, IL-17 and IL-23 in cutaneous lesions of patients with different clinical forms of ACL. Paraffin embedded biopsies from 44 patients were submitted to immunohistochemistry, there were 6 cases of anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (ADCL^{DTH-}) and borderline disseminated cutaneous leishmaniasis (BDCL^{DTH-}) both caused by *L. (L.) amazonensis* 16 cases of cutaneous leishmaniasis (LCL^{DTH+}) caused by *L. (L.) amazonensis*, 9 cases of LCL^{DTH+}, 2 cases of BDCL^{DTH-} and 5 cases of mucocutaneous leishmaniasis (MCL^{DTH+}) all caused by *L. (V.) braziliensis*. The density of Treg Foxp3⁺ cells in the clinical spectrum of ACL showed a progressive increase starting from the central forms LCL^{DTH+} caused by *L. (V.) braziliensis* (170mm²) and *L. (L.) amazonensis* (140mm²) towards the polar forms ADCL^{DTH-} (289mm²). The intermediate clinical forms BDCL^{DTH-} (183mm²) caused by *L. (L.) amazonensis* and BDCL^{DTH-} (189mm²) by *L. (V.) braziliensis* as well as, MCL^{DTH+} (158mm²) did not present any significant differences. The comparison between the densities of IL-17⁺ cells in different clinical forms of ACL showed progressive increasing starting from the central forms LCL^{DTH+} caused by *L. (V.) braziliensis* (232mm²) and *L. (L.) amazonensis* (197mm²) towards the polar forms, ADCL^{DTH-} (470mm²) and BDCL^{DTH-} (340mm²) caused by *L. (L.) amazonensis* BDCL^{DTH-} (431mm²) and MCL^{DTH+} (372mm²) caused by *L. (V.) braziliensis*. The density of IL-23⁺ cells showed a similar profile to that of IL-17 at the disease spectrum caused by *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*: ADCL^{DTH-} (687mm²) BDCL^{DTH-} (518mm²) and LCL^{DTH+} (348mm²) by *L. (L.) amazonensis*; LCL^{DTH+} (457mm²) LCDB^{DTH-} (609mm²) and MCL^{DTH+} (568mm²) *L. (V.) braziliensis*. In view of our findings, we notice that the Foxp3⁺, IL-17⁺ and IL-23⁺ cells play an important role in the immunopathogenesis of different clinical forms of ACL caused by *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*, characterized by an immune polarized response with different pathological expression.

Descriptors: Cutaneous leishmaniasis; Interleukin-23; Interleukin-17; Foxp3; *Leishmania braziliensis*; *Leishmania amazonensis*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

As leishmanioses representam um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Estas se apresentam no homem sob duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) (Desjeux, 2004). As leishmanioses constituem um importante problema de saúde pública com ampla distribuição geográfica, apresentando caráter endêmico-epidêmico em muitas regiões, e estão entre as seis doenças tropicais de maior interesse mundial pela Organização Mundial da Saúde. Estima-se que 12 milhões de pessoas são afetadas em aproximadamente 98 países. Apesar da subnotificação da doença, cerca de 2 milhões de casos novos surgem a cada ano, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 de leishmaniose visceral (OMS, 2010; OPS-OMS, 2013).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de pele e/ou mucosa, agente etiológico pertence à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgêneros *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987) e *Leishmania* (Ross, 1903). [WHO, 2007]. Nas Américas, a LTA ocorre desde o sul dos Estados Unidos, até o norte da Argentina (Figura 1), abrangendo 18 países das Américas, sendo que em 2011 foram registrados 57.287 casos, o que representa uma taxa de incidência de 16 casos por 100.000 habitantes (Da-Cruz & Pirmez, 2005; OPS-OMS, 2013).

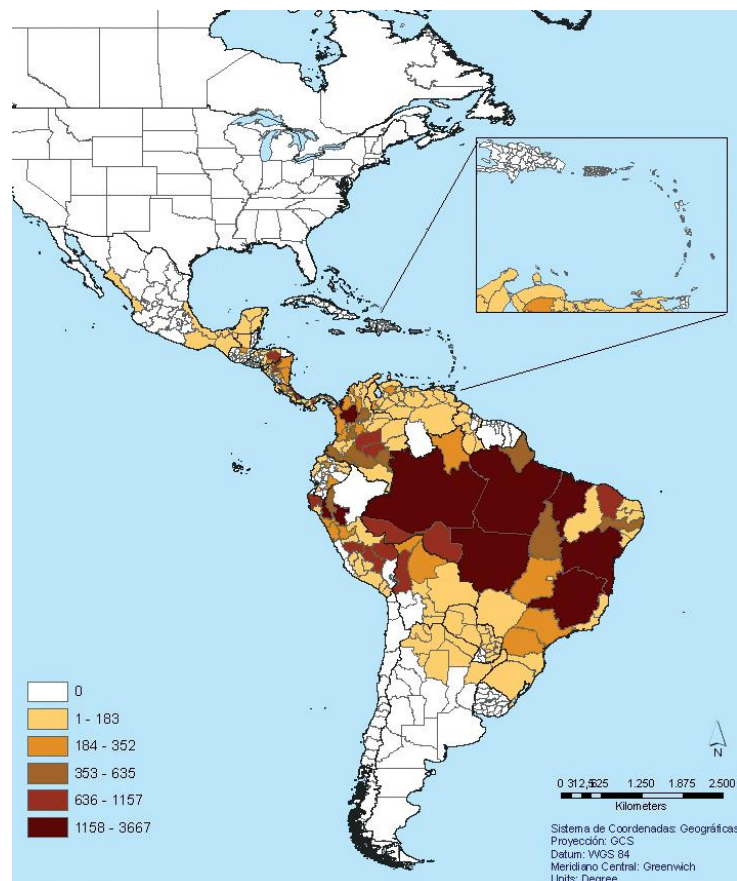


Figura 1: Distribuição de casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas. Média de casos anuais notificados por país de 2001 a 2010. Fonte: OPS-OMS, 2011.

No Brasil, a LTA está em franca expansão geográfica (Figura 2). No período de 1988 a 2009, apresentou média anual de 27.093 casos registrados. Em relação à distribuição geográfica nos estados da federação, no início da década de 80, foram registrados casos em 19 estados e, em 2003, todos os estados apresentaram autoctonia da doença. As regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo ao longo dos anos, com os maiores percentuais de casos do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% ocorreram na região Norte (Boletim eletrônico epidemiológico SVS/MS, 2010).

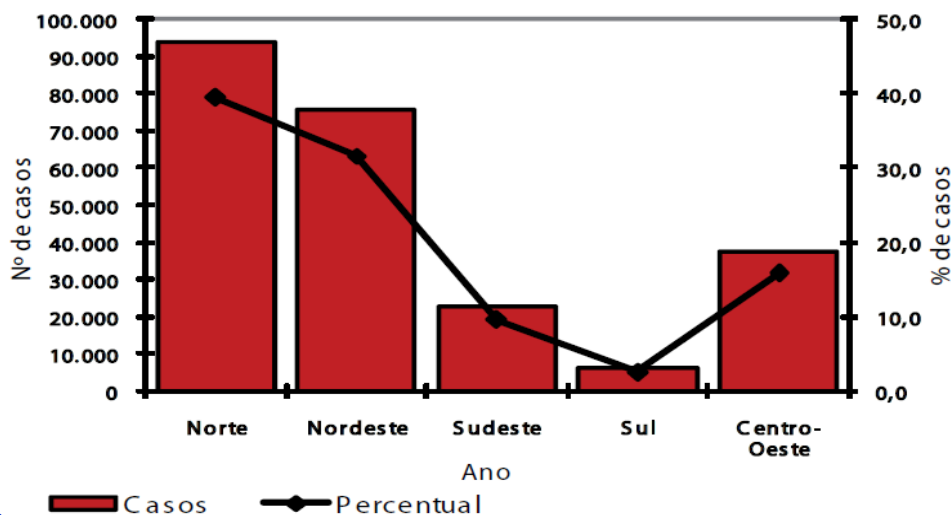


Figura 2: Número de casos de LTA notificados no Brasil de acordo com a região geográfica no período de 2000 a 2008. Fonte: Sinan/SVS/MS, 2010.

O Estado do Pará registrou, entre os anos de 2007 e 2012 cerca de 17.800 casos de LTA (Figura 3), sendo o maior número de casos detectados em 2007 e 2011 (SINAN, 2013).

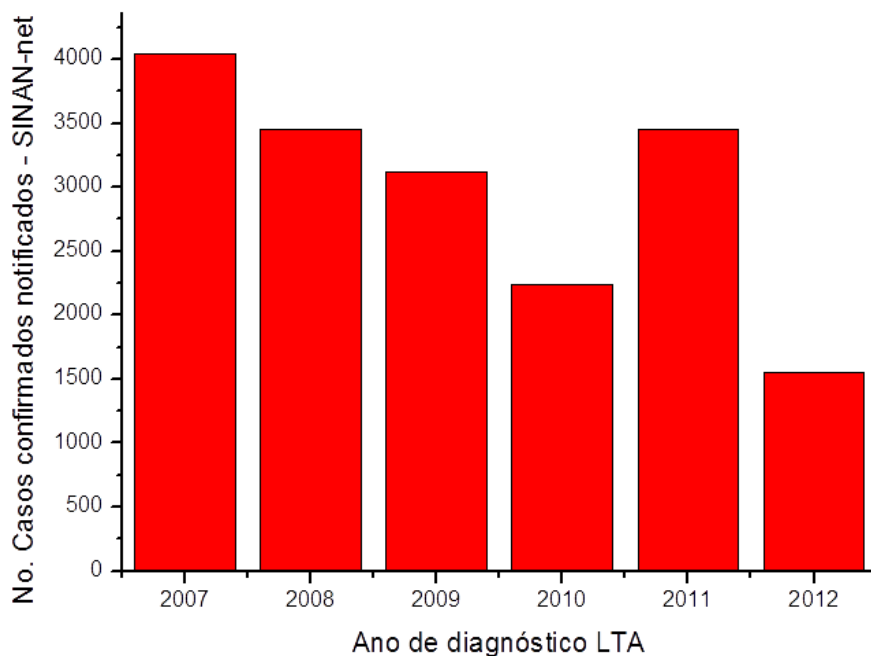


Figura 3: Casos de LTA do Estado do Pará notificados e confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 2013.

O protozoário *Leishmania* apresenta-se sob duas formas evolutivas: promastigotas (Figura 4A), forma flagelada livre, encontrada no tubo digestório do hospedeiro invertebrado e amastigotas (Figura 4B), intracelular, predominante no hospedeiro vertebrado, cujo flagelo está restrito a bolsa flagelar (Lainson; Shaw, 1998).

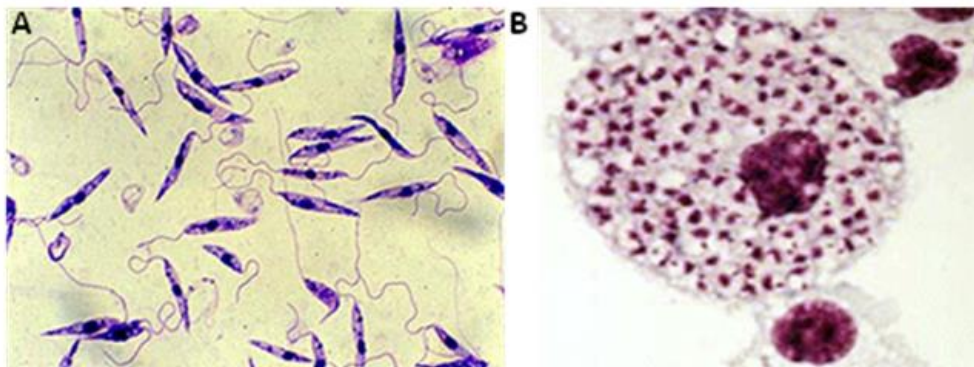


Figura 4: Formas evolutivas da *Leishmania*. A: Formas promastigotas. B: Formas amastigotas no interior do macrófago. Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

Historicamente, a LTA se constitui como uma zoonose, com reservatórios silvestres e vetores bem definidos e o homem assume o papel de hospedeiro acidental. No entanto, devido principalmente ao crescimento populacional, urbanização, alterações ambientais e êxodo rural, o homem passou a fazer parte do ciclo. Assim, a transmissão da doença tem ocorrido em ambiente peri-domiciliar e domiciliar, onde há uma adaptação do vetor, transmitindo a doença aos animais domésticos e ao homem, fazendo com que a probabilidade à infecção seja semelhante à população de risco (SVS/MS, 2007). A LTA comporta-se como uma doença ocupacional, pois afeta principalmente as profissões que desenvolvem atividades na mata, como lavradores, geólogos, madeireiros, caçadores e garimpeiros. Constituem também atividade de risco o treinamento militar nas selvas e as expedições científicas (Lainson, 1997; Silveira et al, 1997).

O agente etiológico da LTA possui dois hospedeiros em seu ciclo de vida, um invertebrado, as fêmeas de flebotomíneos pertencentes à família Psychodidae e gênero *Lutzomyia*, e o outro vertebrado, que compreendem mamíferos que podem ser silvestres ou urbanos (Silveira et al., 1991; Brandão-Filho et al., 2003). As principais espécies envolvidas na transmissão da doença são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (Brasil 2007; Freitas et al. 2002; Silveira et al. 2002).

A transmissão da LTA (Figura 5) ocorre através da picada da fêmea do flebotomíneo, tendo seu início logo após a inoculação das formas promastigotas do parasito na pele, o que acontece durante a hematofagia. A partir desse momento, inicia-se um processo de escape do parasito frente às defesas do organismo, onde algumas das formas promastigotas metacíclicas infectantes, que conseguiram escapar da ação lítica do complemento, dos eosinófilos e neutrófilos, são fagocitadas por macrófagos, transformando-se em formas amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo dessas células; nesse microambiente passam a multiplicar-se por divisão binária até que ocorra a lise celular e a reinvasão em outros macrófagos, perpetuando a infecção. Em seguida, a evolução da infecção dependerá do perfil imunogenético do homem, fortemente associado à resposta imune celular e da virulência da espécie de *Leishmania* infectante, que resultará em diferentes formas clínicas da LTA (Silveira et al., 2004).

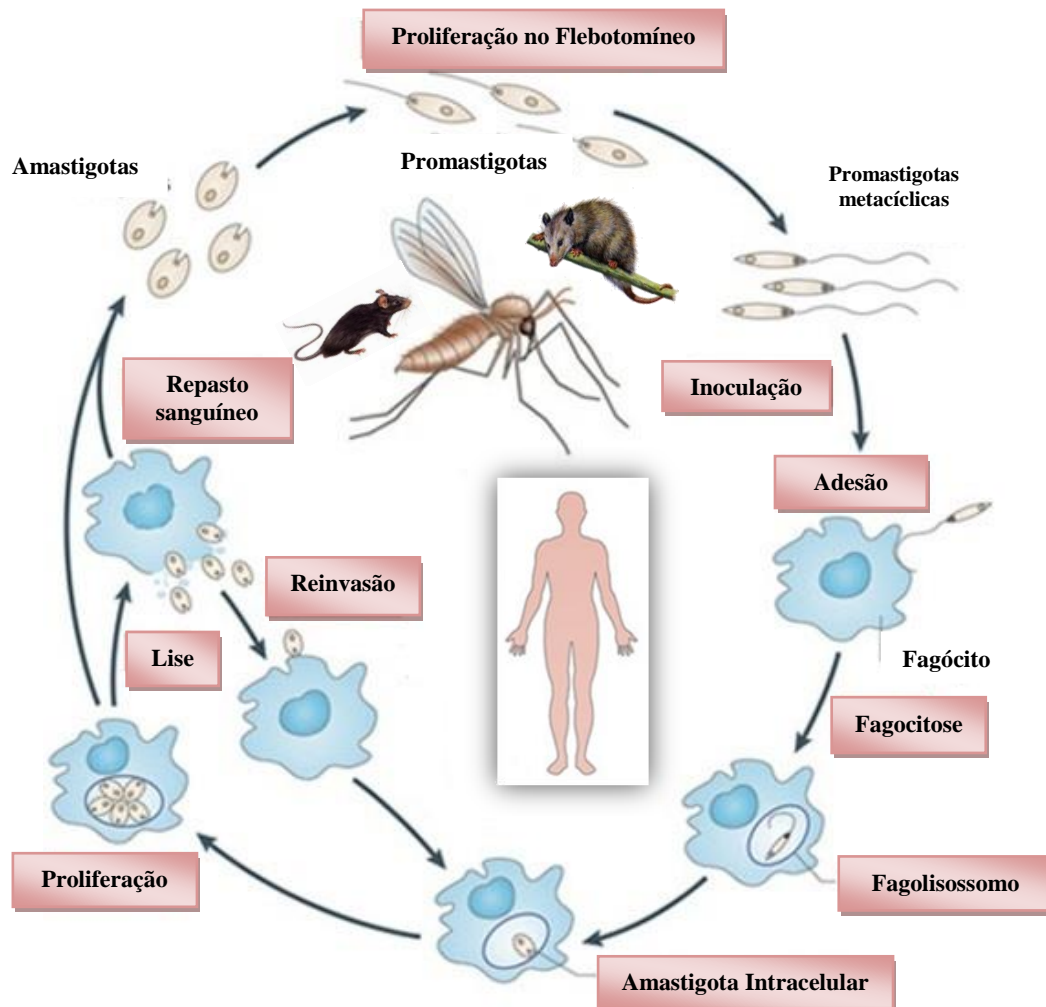


Figura 5: Ciclo evolutivo dos parasitas do gênero *Leishmania*, com especial referência ao ciclo da LTA. Fonte: Adaptado Kaye; Scott, 2011.

1.2. Formas Clínicas da LTA

A LTA apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, variando de infecção assintomática e/ou subclínica em indivíduos naturalmente resistentes, até formas sintomáticas em indivíduos susceptíveis (Figura 6). O entendimento da patogenia da LTA, principalmente, no que diz respeito ao desenvolvimento dessas diferentes formas clínicas, representa um grande desafio no sentido de aprimorar nosso conhecimento sobre essa zoonose, em razão da complexa interação entre as várias espécies de *Leishmania* causadoras da doença e a resposta imune do homem. Hoje são conhecidas no Brasil, sete espécies de *Leishmania* causadoras de LTA. Seis espécies pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*. A espécie pertencente ao subgênero *Leishmania* é *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 2005; Silveira et al., 2004). Considerando os mais recentes achados relativos ao espectro clínico, histopatológico e imunopatológico encontrados na doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (Silveira et al., 2008), não há dúvida quanto à importância médica e epidemiológica dessas espécies responsáveis não só, pela forma mais simples da doença, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), de perfil imune celular bem equilibrado no centro do espectro, com hipersensibilidade moderada (Reação Intradérmica de Montenegro positiva/IDRM⁺). Essas espécies são também responsáveis pelas formas mais graves, a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) causada pela *L. (V.) braziliensis* e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) causada por *L. (L.) amazonensis*. A LCM está ligada ao pólo imune celular hiperreativo, com forte hipersensibilidade (IDRM⁺⁺⁺⁺) e a LCAD, ao pólo imune celular hiporreativo, com fraca ou ausente hipersensibilidade. Além disso, essas espécies podem também determinar a leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB), uma forma intermediária entre a forma central LCL (IDRM⁺) e as formas polares LCM (IDRM⁺⁺⁺⁺) e LCAD (IDRM⁻), com perfil imune celular hiporreativo (IDRM⁻) (Silveira et al., 2004).

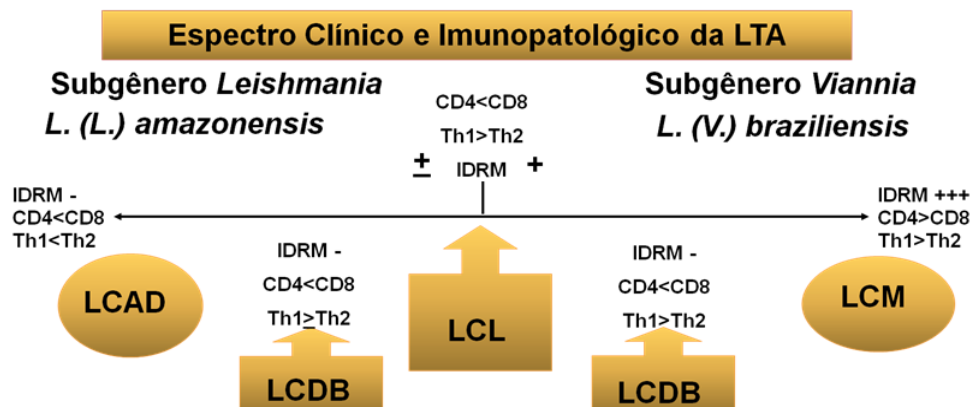


Figura 6: Espectro clínico e imunopatológico da LTA de acordo com Silveira et al., 2004.

No que diz respeito aos aspectos clínicos da LTA, a LCL é caracterizada pela presença de lesões na pele, que se iniciam a partir da picada do vetor. Estas se apresentam como uma pápula eritematosa e podem evoluir, ainda que lentamente, para formas liquenóide, impetigóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatoide. A presença de úlceras com bordas elevadas e tecido de granulação é frequente nesses casos (Figura 7A e 7B). A LCL por *L.(V.) braziliensis*, em alguns casos, pode evoluir para lesões mucosas (Silveira et al., 1997). A histopatologia dessas lesões demonstra que em pacientes infectados por *L. (L.) amazonensis* há um infiltrado macrófago densamente parasitado, contudo para indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia* os parasitas no interior dos macrófagos são escassos e há a presença de linfócitos no infiltrado inflamatório (Magalhães et al., 1986; Moraes; Silveira, 1994).

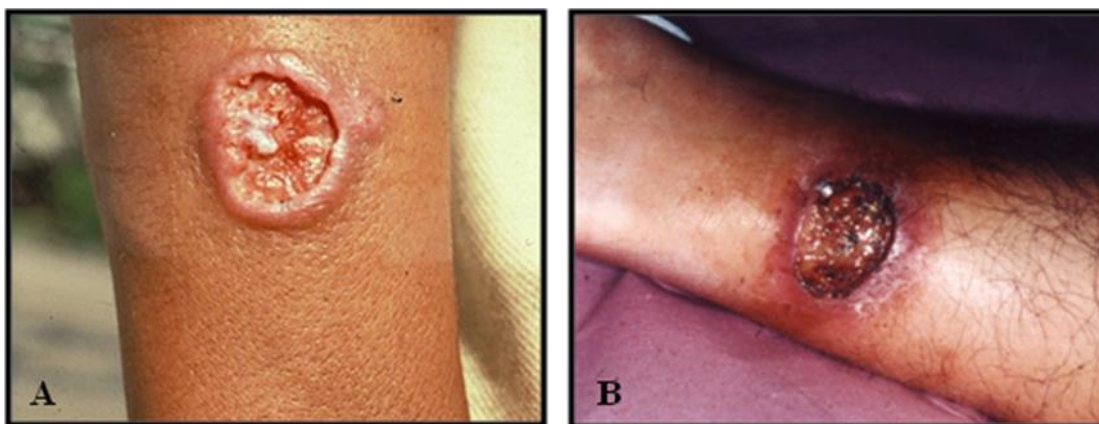


Figura 7: Aspectos clínicos da LTA. Leishmaniose cutânea localizada (LCL) causada por *L. (L.) amazonensis* (A) e *L. (V.) braziliensis* (B). Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Silveira.

Na forma clínica LCDB por *L. (V.) braziliensis*, predomina a reação exudativa, linfoplasmocitária, com poucos macrófagos parasitados, além de áreas de necrose associadas ou não ao granuloma epitelióide (Silveira et al., 2008). A resposta imune celular depende da espécie envolvida; assim, em pacientes infectados pelo subgênero *Viannia* é possível observar, na região da derme, a presença de linfócito e plasmócitos com raros macrófagos e parasitas. Nos casos da forma LCDB por *L. (L.) amazonensis* (Figura 8C), o predomínio é dos macrófagos vacuolizados, ricamente parasitados, com raros grupos de células epitelióides (Silveira et al., 2005).

A LCAD é causada pela espécie *L. (L.) amazonensis* e apresenta lesões infiltrativas e nodulares (Figura 8D). A histopatologia é caracterizada por infiltrado macrofágico vacuolizado, ricamente parasitado e com escassa reação linfoplasmocitária. Como não há hipersensibilidade, o macrófago está inativo, não há necrose e nem reação granulomatosa; existe apenas intensa reação macrofágica, conhecida como nódulo macrofágico, ricamente parasitado (Silveira et al., 1990, 2004). Em casos de LCAD muito avançados, com lesões ósseas de extremidade, pode ser observado um tipo de osteomielite causada por *L. (L.) amazonensis* (Costa et al., 2005; Costa et al., 2006).



Figura 8: Aspectos clínicos da LTA. (C) Leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) (D) e Leishmaniose cutânea anérgica difusa causadas por *L. (L.) amazonensis*. Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando T. Silveira.

A Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), associada a *L. (V.) braziliensis*, compromete a mucosa do indivíduo, principalmente a nasal e sua ocorrência se deve, na maioria das vezes, após a evolução da LCL (Figura 9). Apresenta-se com padrões de lesões úlcero-infiltrantes, poliposas e terebrantes. A resposta celular é representada por intenso infiltrado celular caracterizado por linfócitos, plasmócitos, poucos histiócitos e escassez de parasitas (Magalhães et al., 1986, Silveira et al, 2004).



Figura 9: Aspectos da LTA. Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) causada por *L. (V.) braziliensis*. Lesão de palato. Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Silveira

1.3. Interação parasito-hospedeiro

No desenvolvimento da resposta imune, os macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno (APC) como as células dendríticas apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4⁺ que se diferenciam em duas subpopulações: Th1 e Th2, resultando na estimulação preferencial de uma das populações de linfócitos T CD4, Th1 ou Th2, cujas citocinas irão regular efetivamente (IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α) ou não (IL-4, IL-5 e IL-10) a ativação do macrófago (Figura 10). Essa dicotomização está bem definida na infecção por *L. major* (Sacks & Noben-Trauth, 2002). A secreção dessas diferentes citocinas vai ser determinada pela subpopulação das células T CD4 e pelo antígeno presente (Nylen, 2004). A linhagem de células Th1 está relacionada com o desenvolvimento de resistência à infecção e a Th2 relaciona-se com a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

As células T CD4⁺, quando ativadas por antígeno via MHC de classe II, podem se diferenciar em várias linhagens de células efetoras incluindo, além das referidas acima (Th1 e Th2), a T “helper” folicular (Tfh), T “helper” 9 (Th9), T “helper” 17 (Th17), bem como, várias subpopulações de células T reguladoras como: Célula T Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ natural (nTreg), célula T Foxp3⁺ ou Foxp3⁻ induzida (iTreg) [Figura 10] (Chen et al., 2010). Em alguns trabalhos, foi descrito o perfil Th3, induzido por TGF-β, que pode induzir e manter a tolerância periférica através de células Tregs (Weiner, 2001; Carrier et al., 2007), além do perfil Th17, que pode estar envolvido em processos que levam à cronicidade da doença (Bacellar et al., 2009; Bettelli et al., 2008).

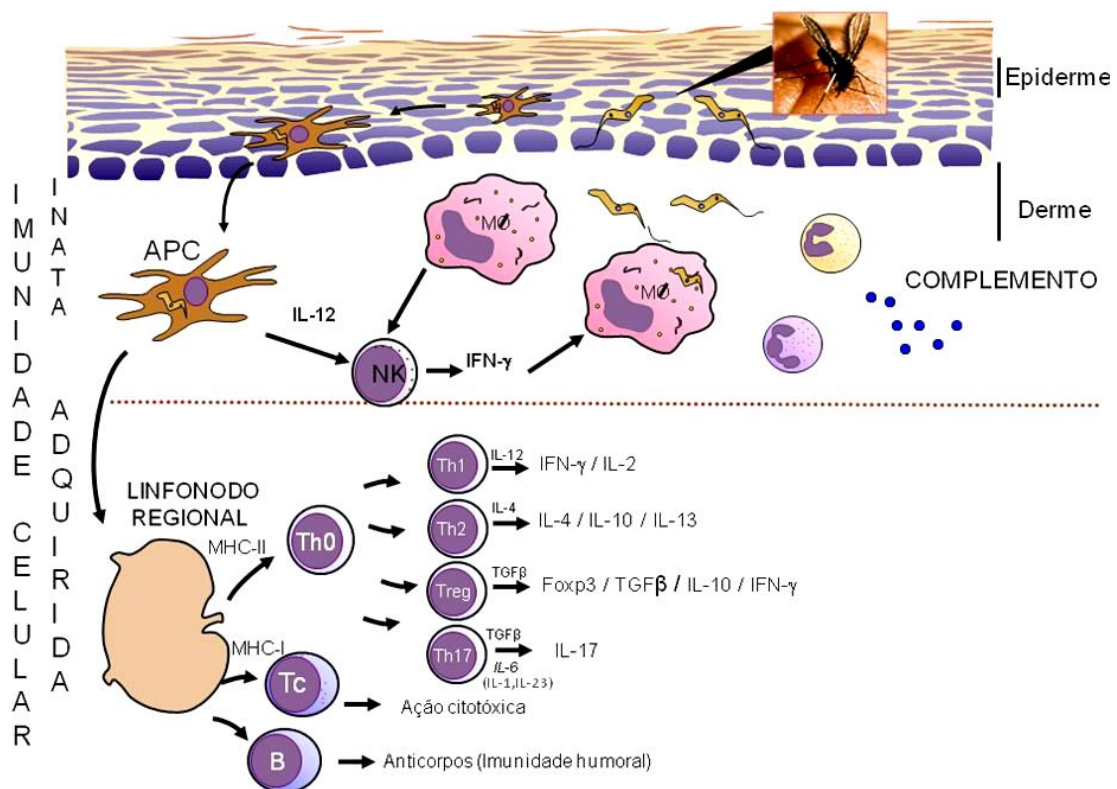


Figura 10: Resposta imune do homem frente à infecção por *Leishmania* sp. Após inoculação do parasita, as células apresentadoras de antígenos (APC), processam o antígeno e apresentam para células da imunidade inespecífica, nesta fase participam elementos celulares e humorais. Nos linfonodos regionais, estas células apresentam o antígeno processado, via MHC-II, para os linfócitos T, que pode resultar em uma resposta T CD4⁺Th1, com perfil de resistência ou T CD4⁺Th2, com perfil de suscetibilidade à infecção, de acordo com citocinas sintetizadas localmente. T CD4⁺ pode se diferenciar também em células Tregs e Th17 com produção de citocinas específicas para cada subpopulação. A apresentação de antígenos através do MHC-I promove a estimulação dos linfócitos T CD8, que modulam a resposta, promovendo controle e resolução da infecção.

O Foxp3 é o principal marcador de células Tregs (Shevach et al., 2006). Este comanda mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos na função das células Tregs, através da interação com outros fatores de transcrição como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e o fator nuclear κ de células B ativadas (NF- κ B) (Belkaid et al., 2002; Sakaguchi et al., 2008).

Células Tregs são subpopulações de células T que apresentam atividade supressiva, essenciais na manutenção da homeostase, através da interação célula-célula e ou pela produção de citocinas como a IL-10 e TGF- β (Miyara & Sakaguchi, 2007; Belkaid & Tarbell, 2009). Essas células podem ser divididas em dois tipos principais, de acordo com a sua origem, geração e mecanismo de ação: as células que expressam naturalmente o fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3⁺), as nTreg, que se desenvolvem normalmente no timo e as células iTreg, que se desenvolvem no sangue periférico através de uma diferenciação de células T CD4⁺, depois de serem expostas a alguns sinais como citocinas reguladoras, drogas imunossupressivas ou algumas células apresentadoras de antígeno, adquirindo a capacidade de secretar IL-10 e TGF- β (Sakaguchi et al., 2008).

As células Tregs formam hoje uma subpopulação amplamente aceita e com importante função na indução e controle da resposta inflamatória por ter um maior grau de plasticidade no processo de diferenciação, quando comparada às linhagens Th1 e Th2 (Lee et al., 2009).

As células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ controlam a resposta imune excessiva mediada pelas células Th1 e Th2 e apresentam diferentes mecanismos supressivos: supressão da proliferação e produção de citocinas pelas células T efetoras, secreção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β , apoptose de células T efetoras, entre outros (Tange et al., 2008; Askenasy et al., 2008).

Em várias doenças infecto-parasitárias, observa-se que o equilíbrio entre as células T regs e as células T efetoras irá influenciar na resolução dessas doenças (Belkaid, 2007). No entanto, também tem sido demonstrado que as Tregs desempenham um papel importante na regulação da resposta imunitária a antígenos, favorecendo a persistência do agente etiológico responsável por doenças crônicas granulomatosas como leishmaniose e tuberculose (Guyot-Rovol et al., 2006; Silva et al., 2010). Na paracoccidiodomicose, as células Tregs também determinam imunossupressão, com aumento da expressão de IL-10 e TGF- β , favorecendo a manutenção do agente

etiológico nos tecidos afetados (Ferreira et al, 2010). Na hanseníase e na tuberculose, as células Tregs estão ligadas à modulação da resposta imune local e sistêmica, ora favorecendo a permanência dos microrganismos no local infectado e sua disseminação na tuberculose ativa (Ribeiro-Rodrigues et al, 2006), ora podendo induzir mudança de polaridade na hanseníase (Attia et al, 2010).

O papel da célula T CD4⁺CD25⁺Foxp3 na resposta imune da leishmaniose cutânea tem sido avaliado, principalmente, nas infecções experimentais por *L. major* onde foi observado que as células Tregs atuam suprimindo a resposta Th1 em animais resistentes, mas também inibem a resposta predominante Th2 presente nos animais susceptíveis (Peters & Sacks, 2006). Na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *L. major* há recrutamento dessas células para a lesão (Anderson et al., 2007; Nagase et al., 2007) e, mediante produção de IL-10, as Tregs são capazes de suprimir a atividade de células efetoras, favorecendo a sobrevivência dos parasitas (Belkaid et al., 2001, Belkaid et al., 2002). Além disso, em camundongos já curados da leishmaniose cutânea causada por *L. major*, a transferência de Tregs é capaz de reativar a doença latente, suprimindo a resposta efetora local e permitindo a replicação do parasita (Mendez et al., 2004). Por outro lado, quando a infecção por *L. major* é desenvolvida em modelo suscetível (BALB/c), embora a infecção tenha uma evolução severa no animal, com uma resposta inicialmente Th2 e produção de IL-4, foi demonstrado que na ausência de Treg a infecção teria evolução mais grave, confirmando assim, sua participação no controle da infecção pela supressão das células efetoras. Apesar deste mecanismo favorecer a sobrevivência do parasita, as células Tregs parecem ter uma função homeostática, que previne uma patogenia excessiva mediada por células Th1 no local da inflamação (Aseffa et al, 2002). Por outro lado, na infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, foi demonstrado que a depleção de células T CD4⁺CD25⁺ não altera o curso da infecção ou padrão da resposta imune, sugerindo que a suscetibilidade à infecção por *L.(L.) mexicana* não é controlada por células Tregs (Thomas et al. 2008).

Em humanos, também foi observada uma função supressiva de células Tregs intralesional em leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis* na fase aguda e crônica de infecção (Bourreau et al., 2009). Em lesões de pacientes com LTA causadas por *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, foi mostrado um acúmulo de células Tregs e a secreção aumentada de IL-10 e TGF-β, por estas células, que inibiram a proliferação

de células T, assim como a produção de citocinas (IL-2 e IFN- γ) por essas células, levando ao controle da resposta imune mediada pelas células T efetoras (JI et al., 2005; Campanelli et al., 2006). Carneiro et al. (2009) evidenciaram maior expressão de células Foxp3⁺ em lesão de pacientes com a forma clínica LCAD quando comparada à LCL causada por *L.(L.) amazonensis*.

A linhagem Th17 é um subgrupo, recentemente identificado, de células T efetoras que expressam altos níveis de IL-17 sob a regulação do fator de transcrição ROR γ t (receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico) [Chen et al., 2010], que também está envolvido em processos que levam à cronicidade da doença (Bacellar et al., 2009; Betteli et al., 2008). A diferenciação de células T em Th17 é induzida mesmo na presença de níveis baixos de TGF- β , IL-23 ou IL-6 (Zhou et al., 2009).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória secretada primariamente por células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas (Miossec et al., 2003), que estimula uma variedade de células (fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos, macrófagos, células epiteliais) a produzirem vários mediadores pró-inflamatórios incluindo IL-1, IL-6, TNF- α , NOS-2, metaloproteinases e quimiocinas (Zhou et al., 2008; Korn et al., 2009). IL-17 pode conferir proteção contra infecção bacteriana, fungos e protozoários (Tsuji et al., 2009). No entanto, esta citocina tem sido associada predominantemente à patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes. Além disso, foi demonstrado que o TNF- α coopera sinergicamente com IL-17 para realçar a capacidade inflamatória de células inatas (Ruddy et al., 2004; Shen et al., 2005). A produção de IL-17 também foi associada ao recrutamento e subsequente ativação de neutrófilos durante a inflamação (Dong, 2009). A diferenciação de células T naive em células Th17 pode ser inibida por IFN- γ , IL-4, IL-27, IL-2, e ácido retinóico, moléculas cruciais para a diferenciação de células T naive em células T CD4⁺ Th1, Th2 e Tregs (Park et al., 2005; Veldhoen et al., 2006, Batten et al., 2006, Harrington et al., 2005; Mucida et al., 2007; Stumhofer et al., 2006).

Células Th17 produtoras de IL-17 induzem a lesão tecidual que é mediada principalmente pela quimiotaxia de neutrófilos e liberação de proteinase. Kostla et al. (2009) mostraram na infecção experimental de BALB/c por *L. major* que o recrutamento de neutrófilos mediado por células IL-17⁺ contribuiu para a progressão da doença. Embora tenha sido demonstrado que IL-17 tem um efeito protetor na leishmaniose visceral (Pitta et al., 2009) causada por *L. donovani* e na infecção experimental com *L. infantum/chagasi*, através da modulação de IL-10 e

potencialização da produção de NO *in vitro* e *in vivo* (Nascimento, 2012), na leishmaniose cutânea esta citocina parece contribuir para a persistência da inflamação em modelos experimentais infectados com *L. major* (Anderson et al., 2009, Kostka et al., 2009). Boaventura et al. (2010) demonstraram altos níveis de citocinas relacionadas a células Th17 em áreas de dano tecidual com infiltrado neutrofílico na infecção por *L. (V.) braziliensis*. Novoa et al. (2011) mostraram que o controle da infecção subclínica por *L. (V.) braziliensis* pode ser mediada pela resposta imune inata com participação da IL-17.

Achados imunoistoquímicos sugerem que IL-17 pode estar associada ao aumento da inflamação na LTA humana que em conjunto com a resposta inflamatória Th1 não regulada, poderiam contribuir para o retardo da cura em alguns casos, não havendo diferença na expressão de genes IL-17 ou IL-23, sendo este último um importante ativador de células Th17 (Rodrigues et al., 2011).

Como já referido, o receptor ROR γ T foi identificado como um fator de transcrição específico para células Th17 (Ivanov et al., 2006), este coopera na transdução de sinal, ativando o fator de transcrição 3 (STAT3) para induzir a expressão de receptores IL-23, o qual desempenha um papel importante na manutenção e amplificação de células Th17. Receptores de IL-23 promovem a transcrição de IL-17 e diferenciação em células Th17 via expressão de ROR γ T, assim, IL-23 é indispensável para as funções efetoras e manutenção de células Th17 (Maeda et al., 2012).

A IL-23 pertence à família de citocinas de IL-12. Tanto IL-12 quanto IL-23 são proteínas heterodiméricas e compartilham de uma subunidade comum, a p40. Na IL-12, p40 é ligado a p35 enquanto que em IL-23, p40 está associada a uma segunda subunidade, a p19. O principal alvo de ativação do complexo p40-19 são as células dendríticas e magrófagos (Croxford et al., 2012). Na leishmaniose experimental, assim como IL-17, a produção de IL-23 influenciou fortemente a progressão da infecção de camundongos suscetíveis por *L. (L.) major*, pelo recrutamento de neutrófilos (Kostka et al., 2009).

Diante do exposto, observa-se que embora o papel da resposta imune celular na patogenia da leishmaniose tegumentar seja de reconhecida importância, existem ainda muitos aspectos a serem estudados, principalmente no que se refere ao amplo espectro da doença. Deste modo, o presente trabalho visa avaliar a expressão do Foxp3, IL-17 e IL-23 em lesões cutâneas das diferentes formas clínicas da LTA causadas por *L.(V.)*

braziliensis e *L.(L.) amazonensis*, com vistas a uma melhor compreensão do papel desses fatores na imunopatogênese dessa importante endemia brasileira.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a expressão Foxp3, IL-17 e IL-23 em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

2.2. Específicos

- Analisar os aspectos histopatológicos das lesões de pacientes com as diferentes formas clínicas de LTA causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*;

- Realizar análise imunoistoquímica da lesão de pacientes com LTA causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, visando à determinação da expressão de Foxp3, IL-17, IL-23;

- Avaliar a expressão desses fatores nas diferentes formas clínicas da doença associadas ao parâmetro de imunidade celular - reação de hipersensibilidade (IDRM);

- Estabelecer a correlação entre os marcadores Foxp3, IL-17 e IL-23 nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

Foram coletadas 44 biópsias de pacientes (Tabela 1) atendidos no ambulatório do programa de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (SVS, MS), em Belém, Estado do Pará. A participação dos pacientes foi feita de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/CNS), resolução 196/96, e com aquiescência do próprio paciente ou do seu responsável.

Esses pacientes foram incluídos no estudo a partir de resultados clínicos e laboratoriais positivos para *Leishmania*.

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

Os indivíduos com diagnóstico positivo receberam tratamento específico para a doença. A participação desses pacientes foi feita mediante informação de cada procedimento realizado e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C) para eventual inclusão na pesquisa; além disso, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq n°0485/08) [Anexo D].

Foram excluídos deste estudo pacientes grávidas, pacientes que receberam tratamento específico e aqueles que se recusaram a participar do projeto.

3.2. Exame parasitológico

3.2.1. Esfregaço corado pelo Giemsa

O esfregaço foi realizado por escarificação da borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi estéreis. O material obtido foi distendido em lâminas de microscopia fixado em metanol e corado pelo Giemsa, com a finalidade de pesquisar formas amastigotas de *Leishmania*.

3.2.2. Biópsias de lesões cutâneas e/ou mucosa

Após anestesia local com lidocaína a 2%, foi realizada biópsia da borda das lesões ativas, utilizando-se “punch” de 4 mm de diâmetro. A realização desse procedimento foi feita pelo médico responsável pelo atendimento no ambulatório do IEC/PA. A biópsia das lesões foi dividida em fragmentos, usados para os seguintes fins: a) Isolamento e caracterização do parasita, b) Análise histopatológica e imuniistoquímica.

3.3. Isolamento e caracterização do parasita

Após triturar o fragmento (fresco) em solução salina estéril a 0,9%, a suspensão foi inoculada, via intradérmica, em patas posteriores, em dois “hamsters” (*Mesocricetus auratus*). Os animais foram examinados semanalmente até o aparecimento da lesão no local de inoculação, quando foram recuperados e semeados em meio de cultura Difco B45 (Laboratories, Detroit, Mich., USA) (Walton et. al., 1977) para identificação da espécie de *Leishmania*.

A caracterização das espécies de *Leishmania* foi baseada no estudo morfológico de amastigotas e promastigostas; no comportamento dos parasitos em infecção experimental na pele de hamster e em meio de cultura; na comparação dos perfis eletroforéticos de isoenzimas de cada parasito isolado, com os perfis das cepas de referência das espécies de *Leishmania* conhecidas da região Amazônica do Brasil (Miles et al., 1979, Lainson et al., 1982) e pelo teste de imunofluorescência direta utilizando anticorpos monoclonais específicos contra estas espécies de *Leishmania* (Shaw et al., 1989; Hanham et al., 1991). Esta identificação foi realizada no Serviço de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, em Belém, estado do Pará.

3.4. Análise histopatológica

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

3.5. Avaliação imunopatológica

A avaliação imunopatológica dos cortes histológicos das lesões utilizando os marcadores anti-Foxp3, anti-IL-17 e anti-IL-23 foi realizada no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5.1. Reação de imunoistoquímica

Para realização da técnica de imunoistoquímica, os fragmentos de pele parafinados foram cortados em 4-5 µm de espessura utilizando-se micrótomo, e coletados em lâminas previamente tratadas com organo-silano (Sigma).

Foi utilizado o mesmo protocolo de imunoistoquímica para todos os marcadores imunológicos estudados neste trabalho, variando apenas a etapa do anticorpo primário e sua diluição previamente padronizada.

O protocolo de imunoistoquímica se iniciou com a desparafinização dos cortes, que constou de três banhos de 1 minuto no xilol à temperatura ambiente, seguidos de dois banhos de 1 minuto de álcool 70%, 95% e 99%. Por último, foi feito banho rápido em água destilada.

A digestão do tecido para a exposição antigênica foi realizada em banho-Maria (98°C) por 40 minutos em tampão citrato (10 mM/ pH 6,0) e 20 minutos a temperatura ambiente no mesmo tampão. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 10 minutos em peróxido de hidrogênio (Novolink Peroxidase Block RE-7157) seguido de 3 lavagens com tampão PBS com 0,05% de Tween 20 (pH 7,2) (3 minutos cada) e bloqueio da peroxidase endógena (Novolink Protein Block RE7158) e outros sítios inespecíficos de ligação por 10 minutos. Lavagem com PBS Tween (3 vezes por 3 minutos cada). Foi feita a incubação com o anticorpo primário "overnight" a 4°C. Nos controles negativos foi utilizada albumina sérica bovina (BSA). A amplificação e visualização da reação foi feita com sistema Novolink max polímero (Novocastra RE7260-K). Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS Tween (3X por 3 minutos), seguindo-se para a etapa de revelação feita com DAB Chromogen (RE-7162) diluído 1:20 em Novolink DAB Substrate Buffer (RE-7163) por 2 minutos à temperatura ambiente. A etapa de contra-coloração foi realizada com hematoxilina

(Novolink Hematoxylin-RE7164) por 2 minutos, seguida de montagem das lâminas com resina e lamínula.

3.5.1.1. Anti-Foxp3

A incubação dos cortes histológicos foi feita nas mesmas condições anteriores utilizando-se o anticorpo anti-Foxp3 produzido em coelho (policlonal H-190, SC-28705) na diluição de 1:500 em PBS com 1% de BSA, "overnight" a 4°C e BSA nos controles negativos.

3.5.1.2. Anti-IL-17

As lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-IL-17 produzido em coelho (policlonal H-132, SC-7927) diluído 1:50 em PBS com 1% de BSA, "overnight" a 4°C e BSA nos controles negativos.

3.5.1.3. Anti-IL-23

Realizou-se a incubação com o anticorpo anti-IL-23 produzido em rato (monoclonal C-3, SC-271279) na diluição de 1:200 em PBS com 1% de BSA, "overnight" a 4°C e BSA nos controles negativos.

3.5.2. Determinação da densidade celular

Para contagem das populações de células imunomarcadas foi utilizado sistema de análise de imagem Zeiss Axioskop 2 plus composto por microscópio acoplado a um Pentium IV, com software Software AxioVision 4 (Zeiss, San Diego, CA, Estados Unidos). As células foram quantificadas de 5 a 10 campos das lesões em objetiva de 40x. A média do número de células marcadas por campo foi calculada e em seguida determinou-se a densidade da população celular a partir da relação da média das células marcadas pela área (μm^2) quantificada, que foi apresentada em mm^2 .

3.6. Teste intradérmico de Montenegro (IDRM)

O teste foi realizado injetando 0,1 mL de antígeno bruto, a partir de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Silveira et al., 1991), por via intradérmica na face anterior do antebraço com a finalidade de avaliar a resposta de hipersensibilidade

celular tardia a antígeno de *Leishmania*. Após 48 horas foi feita a leitura da reação e dado como positiva uma endureção de 5 mm ou mais em seu maior diâmetro.

3.7. Análise dos dados

Os resultados das avaliações imunoistoquímicas foram armazenados em banco de dados Access e analisados no programa Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A partir verificação de normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, empregou-se o teste t não pareado bicaudal com correção de Welch para verificação das diferenças entre os valores das médias dos grupos analisados (formas clínicas), considerando significativa a diferença com valor de $p \leq 0,05$. Para análise de correlação entre os marcadores e os aspectos histopatológicos da LTA foi utilizado o teste do Coeficiente de Correlação de Pearson, cujos dados foram expressos em r e $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos clínico-epidemiológicos dos pacientes

Foram analisadas 44 biópsias dos pacientes com diferentes formas clínicas de LTA. Na forma clínica LCL (*La*), quatorze indivíduos eram do sexo masculino (87,5%) e dois do sexo feminino (12,5%), com tempo de evolução da doença variando de 1 a 9 meses de infecção. Na forma clínica LCL (*Lb*), sete indivíduos eram do sexo masculino (77,8%) e dois eram do sexo feminino (22,2%) com tempo de evolução da doença variando de 2 a 6 meses de infecção. Na forma clínica LCM (*Lb*), cinco indivíduos eram do sexo masculino (100%) com tempo de evolução da doença variando de 1 a 6 anos de infecção. Essas formas clínicas apresentaram lesões ulceradas e infiltradas. Em relação à LCDB (*La*), os seis indivíduos pertenciam ao sexo masculino (100%), com tempo de evolução da doença variando de 3 meses a 2 anos. Essa forma clínica se caracterizou por lesões verrucosas em placa, eritematosa infiltrada, acneiforme e nodulares. Na LCDB (*Lb*), dois indivíduos eram do sexo masculino (100%), com tempo de evolução da doença variando de 2 a 3 meses e as lesões eram do tipo pápulo-ulceradas. Na forma clínica LCAD (*La*), cinco indivíduos eram do sexo masculino (83,3%) e apenas um do sexo feminino (16,6%), com tempo de evolução variando de 1 a 35 anos. Estes apresentaram lesões nodulares vegetativas, acneiforme e infiltradas. A IDRМ nestes pacientes mostrou-se negativa para os casos de LCAD e LCDB por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V) braziliensis*. Por outro lado, para as formas cutâneas localizadas variou de 5x5 a 25x20 mm² para LCL por *L. (L.) amazonensis* sendo que 4 casos desta forma clínica apresentou IDRМ negativa. Na LCL por *L. (V) braziliensis* a IDRМ foi de 7x7 a 19x19 mm² e tempo de evolução de 2 a 6 meses. Para a LCM por *L. (V) braziliensis*, variou de 7x7 a 18x18 mm² e 1 a 6 anos de lesão (Tabela 1).

Tabela 1: Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com as diferentes formas clínicas de LTA causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

| Forma Clínica | Indivíduos n (%) | Sexo | | Tempo de Evolução min - max | IDRM mm ² min - max | Tipo de lesão |
|--------------------|---------------------|---------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | Masc n (%) | Fem n (%) | | | |
| LCL (<i>La</i>) | 16 (36,5) | 14 (87,5) | 2 (12,5) | 1 - 9 meses | 5x5 - 16x16 | Ulceradas e Infiltradas |
| LCL (<i>Lb</i>) | 9 (20,5) | 7 (77,8) | 2 (22,2) | 2 - 6 meses | 7x7 - 19x19 | Ulceradas e Infiltradas |
| LCM (<i>Lb</i>) | 5 (11,4) | 5 (100) | 0 | 1 - 6 anos | 16x16 - 18x18 | Ulcerada e Infiltradas |
| LCDB (<i>La</i>) | 6 (13,5) | 6 (100) | 0 | 3 meses - 2 anos | negativo | Verrucosas em placa, eritematosa infiltrada, acneiforme e nodulares |
| LCDB (<i>Lb</i>) | 2 (4,6) | 2 (100) | 0 | 2 - 3 meses | negativo | Pápulo-ulcerada |
| LCAD (<i>La</i>) | 6 (13,5) | 5 (66,7) | 1 (33,3) | 1 - 35 anos | negativo | Lesões nodulares vegetativas, acneiformes e infiltradas |
| Total: | 44 (100) | 39 (88,6) | 5 (11,4) | - | - | - |

4.2. Análise histopatológica das lesões cutâneas de LTA

A análise histopatológica das biópsias de pele dos pacientes com *L. (V.) braziliensis* apresentou baixo parasitismo e intenso infiltrado inflamatório linfomononuclear rico em plasmócitos, contendo ainda linfócitos e macrófagos em quantidades variáveis. Observou-se também esboço granulomatoso ou granulomas epitelióides bem formados, frequentemente com presença de células gigantes. Alterações epidérmicas clássicas foram observadas nestes casos, como ulceração, hiperplasia pseudoepiteliomatosa com acantose irregular e papilomatose. Por outro lado, na LCAD, causada por *L. (L.) amazonensis*, a histopatologia foi caracterizada por infiltrado denso e difuso de macrófagos, vacuolizados na sua maioria, com inúmeras amastigotas em seu interior, e raros linfócitos e plasmócitos. Enfatiza-se, no entanto, que alguns casos de LCAD mostraram ainda, maior infiltrado linfoplasmocitário, por vezes com esboço de granulomas, o que foge do padrão histopatológico clássico, caracterizando possivelmente, uma fase de reativação de resposta imune. Na LCDB por *L. (L.) amazonensis* observou-se um padrão semelhante à LCAD, porém com infiltrado inflamatório menos intenso e com tendência a distribuição focal. Na LCDB por *L. (V.) braziliensis* observou-se também hiperplasia pseudoepiteliomatosa e denso infiltrado inflamatório linfomononuclear na derme constituído predominantemente por plasmócitos

e linfócitos. Na LCL por *L. (L.) amazonensis*, o infiltrado linfomononuclear tende a ser menos intenso, com distribuição variável, ora focal e ora difusa. Raros casos mostraram esboço de granuloma e moderado parasitismo. Na LCM por *L. (V.) braziliensis* observou-se reação pseudoepiteliomatosa e intenso infiltrado linfoplasmocitário predominantemente difuso, contendo menor quantidade de macrófagos de permeio. Na maioria dos casos identificou-se a presença de esboço granulomatoso ou de granuloma epitelióide bem constituído (Figura 11).

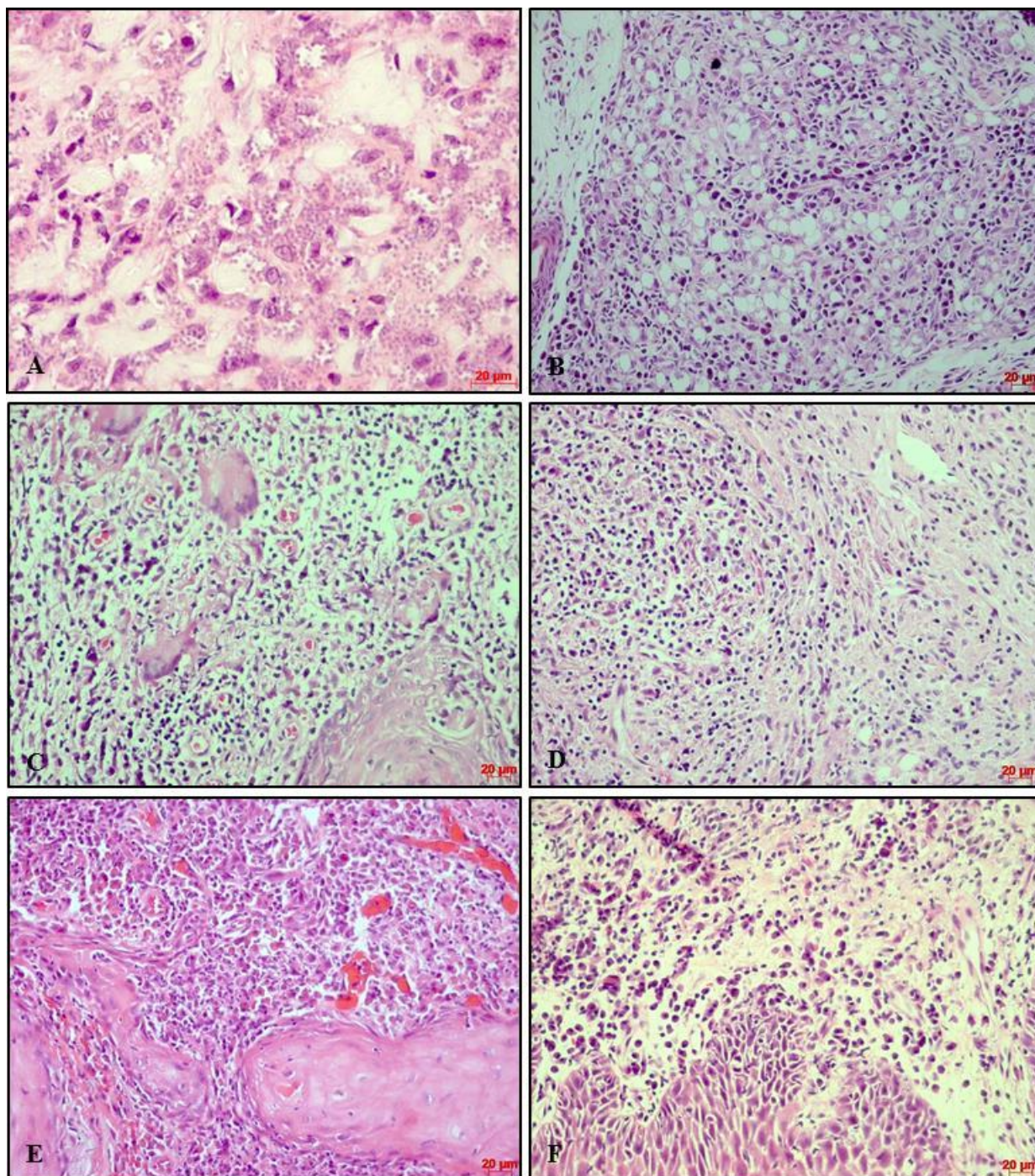


Figura 11: Aspectos histopatológicos das diferentes formas clínicas da LTA (40x). (A) LCAD: Infiltrado macrófagico intenso com numerosos parasitas; (B) LCDB: Infiltrado macrófagico intenso com focos de linfócitos e plasmócitos, presença de parasitas; (C) LCL causada por *L.(L.) amazonensis* – infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com esboço de granuloma contendo células gigantes; (D) LCL causada por *L.(V.) braziliensis*: Infiltrado inflamatório moderado, presença de célula gigante e escassez de parasitas; (E) LCDB causada por *L.(L.) braziliensis*: Hiperplasia pseudoepiteliomatosa, denso infiltrado inflamatório com presença de plasmócitos e linfócitos; (F) LCM: Reação pseudoepiteliomatosa, e denso infiltrado linfoplasmocitário.

4.3. Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 no amplo espectro de LTA

A análise imunopatológica das lesões de pele das diferentes formas clínicas de LTA, visando determinar a expressão de Foxp3⁺ mostrou uma maior densidade de células Foxp3⁺ ($p \leq 0,05$) nas formas polares hiporreativas LCAD^{IDRM-}(La) (289mm²) e LCDB^{IDRM-}(La) (183mm²) e LCDB^{IDRM-}(Lb) (189mm²) quando comparadas as formas cutâneo localizadas LCL^{IDRM+}(La) (140mm²) e LCL^{IDRM+}(Lb) (170mm²) e LCM^{IDRM+}(Lb) (158mm²) (Figura 12 e 13).

Na análise estatística das densidades de células Foxp3⁺ utilizando o teste T não pareado bicaudal com correção de Welch, foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a forma clínica LCAD^{IDRM-}(La) e todas as outras formas clínicas do espectro. Além disso, a forma clínica LCL^{IDRM+}(La) mostrou diferença estatisticamente significante com a forma LCDB^{IDRM-}(Lb).

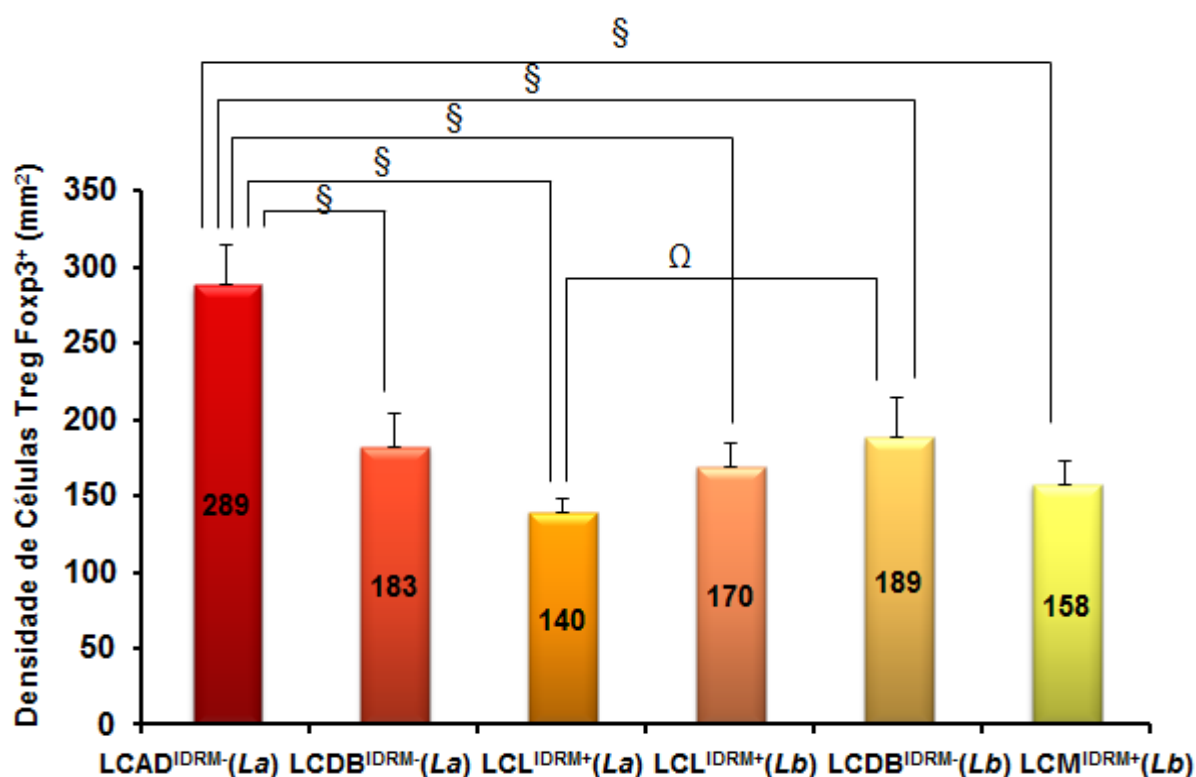


Figura 12: Densidade de células Tregs Foxp3⁺ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

§ Indica diferença significativa entre LCAD (La) e LCDB (La) ($p=0,0172$), LCL (La) ($p=0,0057$), LCL (Lb) ($p=0,0073$), LCDB (Lb) ($p=0,0196$) e LCM (Lb) ($p=0,0053$)

Ω Indica diferença significativa entre LCL (La) e LCDB (Lb) ($p < 0,0001$)

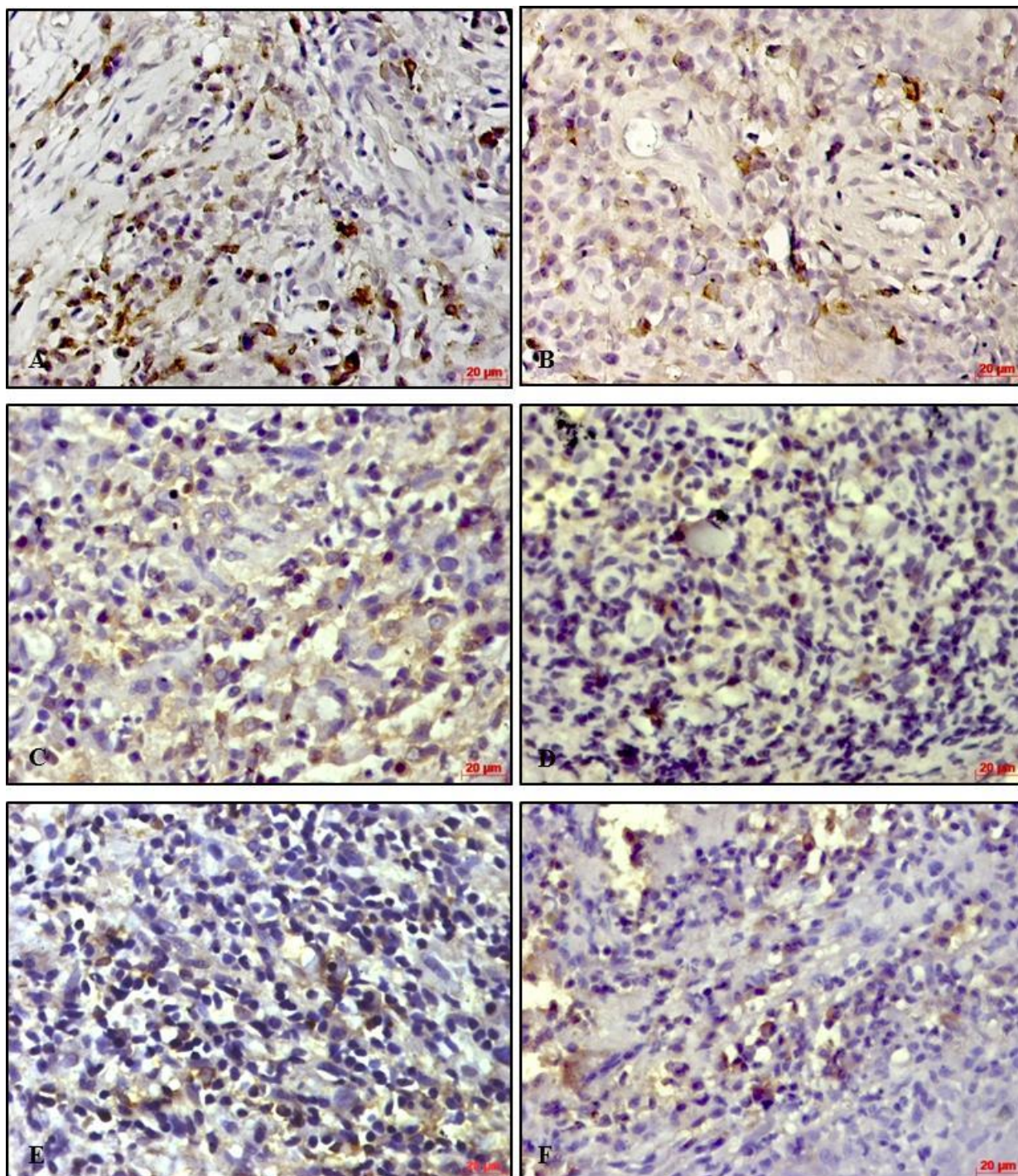


Figura 13: Imunomarcaco de células Tregs Foxp3⁺ nas diferentes formas clínicas de LTA. (A) LCAD, (B) LCDB e (C) LCL causadas por *L.(L.) amazonensis* e (D) LCL, (E) LCDB e (F) LCM causadas por *L. (L.) braziliensis* (40x).

A comparação entre as densidades de células IL-17⁺ nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA mostrou um aumento progressivo da expressão de IL-17⁺ partindo das formas centrais LCL^{IDRM+}(La) e LCL^{IDRM+}(Lb), com densidades de 197 e 232mm², respectivamente, para as formas polares hiporreativas (LCDB^{IDRM-}(La) (340mm²) e LCAD^{IDRM-}(La) (470mm²) e para o polo de formas hiperreativas LCDB^{IDRM-}(Lb) (431mm²) e LCM^{IDRM+}(Lb) (372mm²) (Figura 14 e 15).

Na análise estatística das densidades de células IL-17⁺ por forma clínica observou-se diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a forma clínica LCAD^{IDRM-}(La) e LCL^{IDRM+}(La) e LCL^{IDRM+}(Lb), entre a forma LCL^{IDRM+}(La) e as formas clínicas LCDB^{IDRM-}(Lb) e LCM^{IDRM+}(Lb). A cutâneo localizada LCL^{IDRM+}(Lb) apresentou diferença significativa com LCDB^{IDRM-}(Lb).

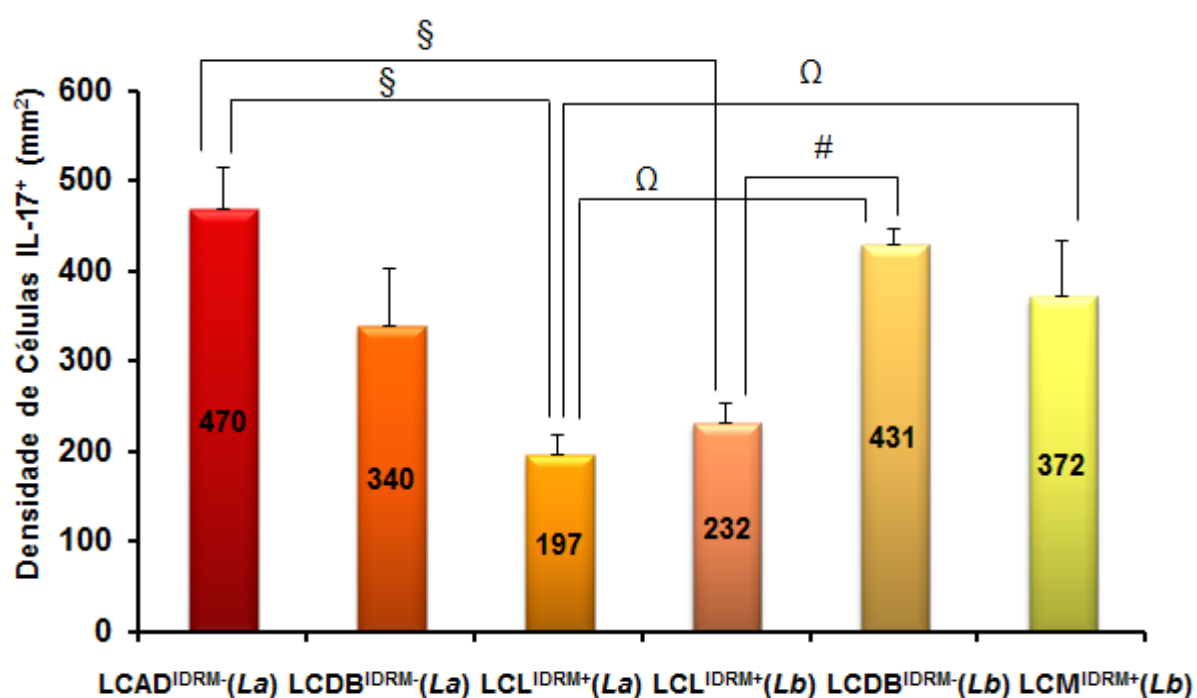


Figura 14: Densidade de células IL-17⁺ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

§ Indica diferença significativa entre LCAD (La) e LCL (La) ($p=0,0008$), e LCL (Lb) ($p=0,0017$)

Ω Indica diferença significativa entre LCL (La) e LCDB (Lb) ($p<0,0001$), e LCM (Lb) ($p=0,0409$)

Indica diferença significativa entre LCL (Lb) e LCDB (Lb) ($p<0,0001$)

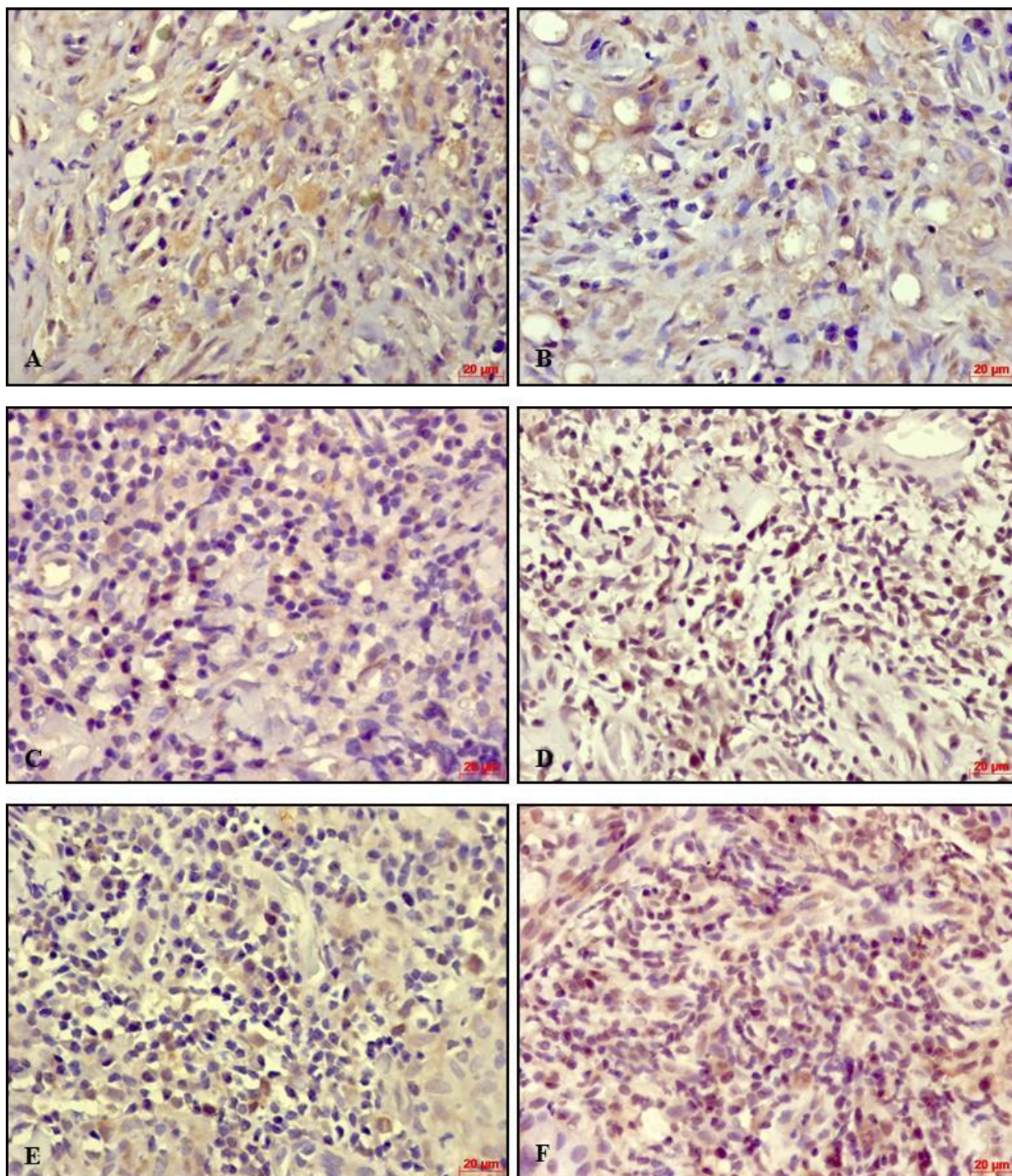


Figura 15: Imunomarcção de células IL-17⁺ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA. (A) LCAD, (B) LCDB e (C) LCL causadas por *L.(L.) amazonensis* e (D) LCL, (E) LCDB e (F) LCM causadas por *L. (L.) braziliensis* (40x).

À semelhança da IL-17⁺, células IL-23⁺ também mostraram um crescente aumento na densidade que se inicia na forma central LCL^{IDRM+}(La) e LCL^{IDRM+}(Lb), com valores de 348 e 457mm², respectivamente em direção às formas polares hiporreativas, LCAD^{IDRM-}(La) (687mm²) e LCDB^{IDRM-}(La) (518mm²) e ainda para o polo imunorreativo LCDB^{IDRM-}(Lb) (609mm²) e LCM^{IDRM+}(Lb) (568mm²) (Figuras 16 e 17).

A análise estatística das densidades de células IL-23⁺ utilizando o teste T não pareado bicaudal com correção de Welch mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a forma clínica LCAD^{IDRM-}(La) e LCL^{IDRM+}(La) e LCL^{IDRM+}(Lb). A forma clínica LCL^{IDRM+}(La) mostrou-se significativamente diferente de LCL^{IDRM+}(Lb), LCDB^{IDRM-}(Lb) e LCM^{IDRM+}(Lb).

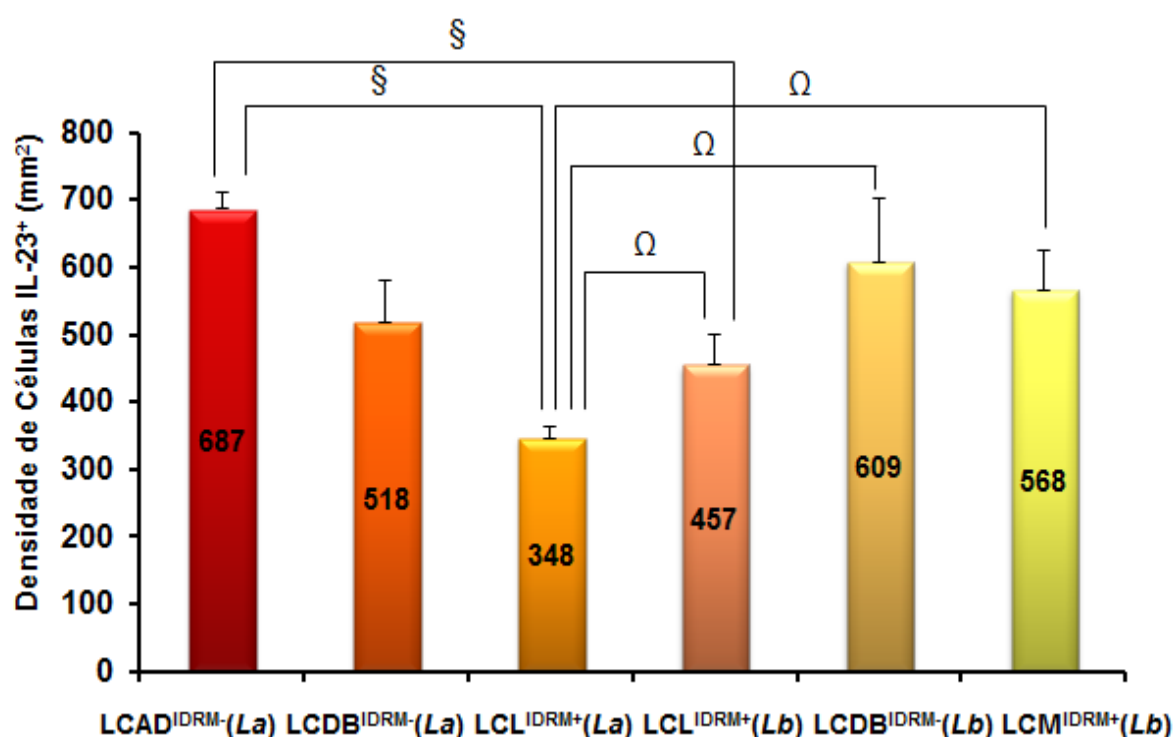


Figura 16: Densidade de células IL-23⁺ em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA, causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

§ Indica diferença significativa entre LAD (La) e LCL (La) ($p < 0,0001$) e LCL (Lb) ($p = 0,0010$)

Ω Indica diferença significativa entre LCL (La) e LCL (Lb) ($p = 0,0472$), LCDB (Lb) ($p = 0,0033$) e LCM (Lb) ($p = 0,0212$)

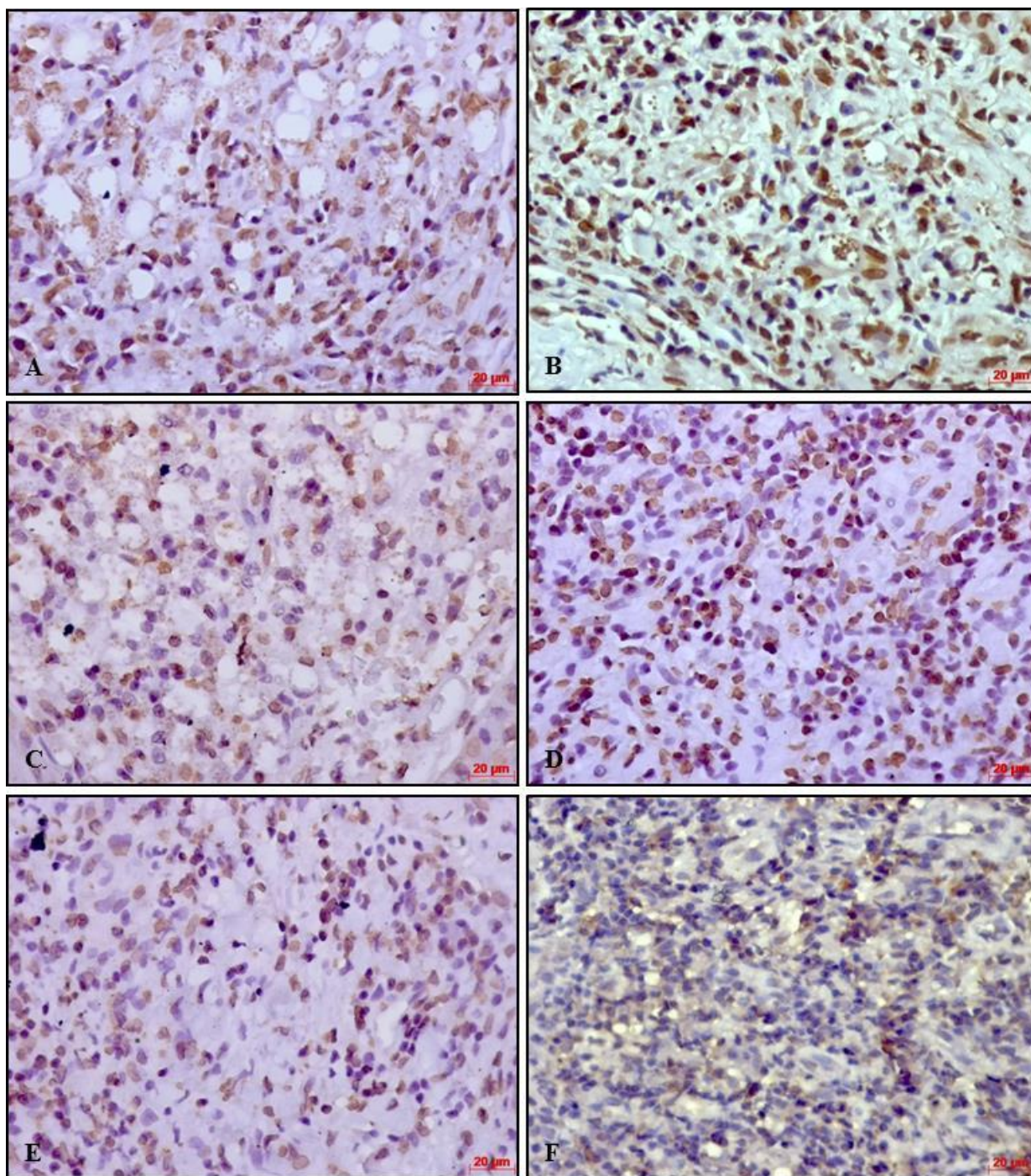


Figura 17: Imunomarcção de células IL-23⁺ nas diferentes formas clínicas de LTA. (A) LCAD, (B) LCDB e (C) LCL causadas por *L.(L.) amazonensis*; (D) LCL, (E) LCDB e (F) LCM causadas por *L. (L.) braziliensis* (40x).

Como controle da reação, foram utilizados cortes histológicos de pele normal (Figura 18) que apresentaram densidades de células imunomarcadas significativamente inferiores para todos os marcadores Foxp3 (94mm²), IL-17 (81mm²) e IL-23 (99mm²) quando comparadas aos 44 casos de LTA.

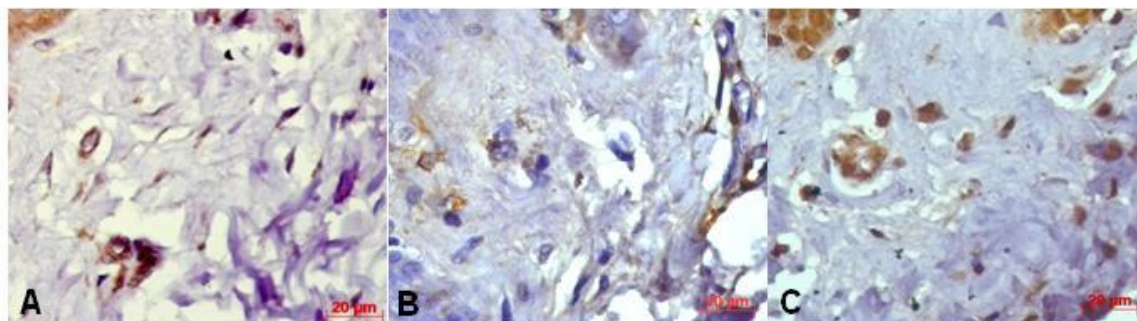


Figura 18: Imunomarcção de células Tregs Foxp3⁺ (A), IL-17⁺ (B) e IL-23⁺ (C) em pele humana normal (40x).

A tabela 2 apresenta a análise descritiva das densidades de células imunomarcadas das biópsias de pacientes com LTA de células Tregs Foxp3⁺, células IL-17⁺ e IL-23⁺.

Tabela 2: Densidade de células imunomarcadas (Foxp3⁺, IL-17⁺ e IL-23⁺) em lesão de pacientes com LTA, causada por *L.(L.) amazonensis* (*La*) e *L.(V.) braziliensis* (*Lb*), oriundos do Estado do Pará.

| Formas Clínicas / Marcadores Imunológicos | LCL (<i>La</i>) | | LCDB (<i>La</i>) | | LCAD (<i>La</i>) | |
|---|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Média (dp) | Mediana (min-max) | Média (dp) | Mediana (min-max) | Média (dp) | Mediana (min-max) |
| Foxp3 ⁺ | 140 (31) | 140 (88-210) | 183 (48) | 182 (115-230) | 289 (59) | 289 (230-371) |
| IL-17 ⁺ | 197 (88) | 179 (81-380) | 340 (139) | 289 (199-536) | 470 (170) | 453 (371-665) |
| IL-23 ⁺ | 348 (62) | 357 (214-420) | 518 (121) | 493 (398-687) | 687 (57) | 695 (591-744) |

| Formas Clínicas / Marcadores Imunológicos | LCL (<i>Lb</i>) | | LCDB (<i>Lb</i>) | | LCM (<i>Lb</i>) | |
|---|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Média (dp) | Mediana (min-max) | Média (dp) | Mediana (min-max) | Média (dp) | Mediana (min-max) |
| Foxp3 ⁺ | 170 (41) | 170 (125-231) | 189 (1) | 189 (188-190) | 158 (34) | 149 (122-208) |
| IL-17 ⁺ | 232 (59) | 236 (142-331) | 431 (21) | 430 (416-445) | 372 (135) | 298 (250-556) |
| IL-23 ⁺ | 457 (11) | 497 (301-567) | 609 (132) | 608 (515-702) | 568 (128) | 627 (380-693) |

4.4. Análise de correlação entre os marcadores imunológicos

Foi realizada a análise de correlação entre os marcadores imunológicos nas diferentes formas clínicas do espectro clínico e imunopatológico da LTA causada por *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis*, através do Teste de Correlação de Pearson. Nesta análise entre as densidades de células imunomarcadas por forma clínica observou-se forte correlação entre os marcadores Foxp3 *versus* IL-17 ($r=-0,99$ e $p\leq 0$), Foxp3 *versus* IL-23 ($r=0,99$ e $p\leq 0$) e IL-23 *versus* IL-17 ($r=0,99$ e $p\leq 0$) na forma clínica LCDB (*Lb*). Houve forte correlação negativa entre IL-23 e Foxp3 ($r=-0,98$ e $p\leq 0$) na forma clínica LCM (*Lb*).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Existe um grande interesse na melhor compreensão da imunopatologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) principalmente no que diz respeito à resposta imune mediada por células, pelo seu importante papel na evolução da doença (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

A maioria dos estudos têm se concentrado nos fenômenos imunopatológicos “*in vitro*”, no entanto, a avaliação direta no sítio de lesão possibilita uma melhor observação das interações celulares e dos mediadores presentes no sítio inflamatório, obtendo assim, resultados com maior exatidão. Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar, em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, a expressão do fator de transcrição Foxp3⁺ e das citocinas IL-17 e IL-23, visando determinar a participação desses marcadores na modulação da resposta imune desencadeada por essas espécies de grande interesse médico-epidemiológico no Brasil.

A LTA possui um amplo espectro de manifestações clínicas e imunopatológicas representado pela forma cutânea localizada (LCL), alocada no centro do espectro e caracterizada por uma resposta de células T equilibrada, a forma mucocutânea (LCM) representando o polo de hiperreatividade é caracterizada por uma acentuada resposta imune celular do tipo Th1 e a forma anérgica difusa (LCAD), no polo de hipossensibilidade com marcada resposta imune celular do tipo Th2. Entre as formas polares e a LCL temos a forma cutânea disseminada borderline (LCDB), caracterizada por uma inibição parcial da resposta de células T, com tendência a um predomínio de resposta Th1 em relação à Th2, especialmente, no caso da LCDB causada por *L. (V.) braziliensis* (Silveira et al., 2004).

O papel do parasita na determinação das diferentes formas clínicas e na modulação da imunidade do hospedeiro na LTA tem sido um tema frequente dos projetos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (LIM-50 FMUSP/IEC-PA). Gomes et al., (2000) demonstraram uma maior infectividade e menor produção de NO por cepas de *L. (L.) amazonensis* isoladas da forma LCAD e uma menor resistência do parasita a este agente leishmanicida quando comparadas a aquelas oriundas de LCDB e LCL, em ensaio *ex vivo*. Foi observado também que na infecção experimental em Balb/c, a evolução da lesão foi similar ao que acontece em humanos, com lesões mais exacerbadas na forma polar LCAD (Gomes et al., 2000). Campos et al. (2008)

observaram que cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de LCM apresentaram-se mais infectivas e com níveis também reduzidos de NO quando comparadas às cepas oriundas da forma LCL. Silveira et al. (2009) mostraram uma dicotomia da resposta imune celular na LTA humana causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Enquanto a infecção por *L. (V.) braziliensis* mostrou uma clara tendência em se deslocar partindo da forma cutânea localizada para o polo de hiperreatividade – LCM (IDRM+++), a *L. (L.) amazonensis* mostrou uma tendência oposta, partindo da forma cutânea localizada para a LCAD (IDRM-) no pólo de hiporreatividade.

As alterações histopatológicas observadas no nosso estudo estão de acordo com as descritas previamente por Magalhães et al. (1986), Bittencourt et al. (1991, 2009), e Silveira et al. (2004). Das formas clínicas causadas por *L. (L.) amazonensis*, a LCAD é a que histologicamente mais se diferencia das outras pelo padrão macrófágico. A maioria dos nossos casos dessa forma clínica apresentou padrão histopatológico típico da LCAD com infiltrado denso e difuso de macrófagos, vacuolizados na sua maioria, e intensamente parasitados com raros linfócitos e plasmócitos. No entanto, é importante colocar que algumas biópsias mostraram infiltrado linfoplasmocitário, de discreto a moderado, o que foge do padrão histopatológico clássico, caracterizando possivelmente, uma fase de reativação da resposta imune, como já demonstrado por Bonfim et al. (1996). Bittencourt (2009) refere também que as biópsias de LCAD em sua maioria, mostraram na derme profunda discreta a moderada infiltração linfoplasmocitária e chama atenção para as lesões involuídas espontaneamente ou por ação de tratamento, onde observou acentuado infiltrado linfoplasmocitário e áreas de fibrose e necrose citolítica. Estudos ultra-estruturais desenvolvidos pela mesma autora, em pacientes com LCAD com lesões bem desenvolvidas e involuídas, mostraram a presença de parasitas degenerados e necróticos, no interior de macrófago, a lise de macrófagos, infiltrado de linfócitos e fibrose (Bittencourt et al., 1990, 2009). Essas alterações parecem caracterizar uma resposta imune celular, sugerindo que na LCAD pode ocorrer uma resposta imune celular focal, o que explicaria a regressão espontânea de algumas lesões observadas por Bittencourt et al., (1990) e Silveira et al. (2004).

Ainda considerando o pólo de hiposensibilidade, a LCDB por *L. (L.) amazonensis* apresentou um padrão semelhante à LCAD, porém com infiltrado inflamatório menos intenso de macrófagos vacuolizados com focos de linfócitos e plasmócitos. Existem evidências mostrando que a resposta imune celular na LCDB não

está completamente ausente, como nos casos da forma LCAD, sendo observada pronta recuperação após terapia com antimoniato de meglumina, em dose equivalente ao dobro do que é utilizado para a forma LCL (Carvalho et al., 1994; Costa et al., 1986; Silveira et al., 2005; Turetz et al., 2002).

A LCL por *L. (L.) amazonensis* apresentou um infiltrado linfomononuclear moderado com distribuição focal ou difusa. Alguns casos mostraram esboço de granuloma e moderado parasitismo. Por outro lado, na forma LCL causada por *L. (V.) braziliensis* observou-se um baixo parasitismo e intenso infiltrado inflamatório linfomononuclear, presença de granuloma, célula gigante, fibrose e necrose.

Na LCDB por *L. (V.) braziliensis*, forma clínica mais rara da doença, o que explica a pequena amostragem no nosso estudo, observou-se também denso infiltrado inflamatório linfomononuclear na derme, com presença de plasmócitos e linfócitos, como já referido por Silveira et al., (2004). Esta entidade clínica apresenta resposta imunecelular mista, no entanto com predomínio do perfil Th1, com IDRM variando de negativo a fraca, respondendo prontamente ao tratamento específico (Silveira et al., 2004). Na LCM observou-se reação pseudoepiteliomatosa e intenso infiltrado linfoplasmocitário difuso com poucos macrófagos de permeio. A presença de esboço granulomatoso ou de granuloma epitelióide bem constituído foi um achado frequente nessa forma clínica. Características histopatológicas similares às encontradas neste trabalho foram descritas em estudos prévios em biópsias de pacientes infectados com espécies do subgênero *Viannia* (Bittencourt; Barral, 1991; Silveira et al., 2004; Gutierrez et al., 1991). De acordo com estes autores a presença de granulomas bem organizados e de células gigantes são fatores relacionados à eliminação dos parasitas. Do mesmo modo, a presença de linfócitos na lesão constitui fator essencial para a modulação da resposta leishmanicida dos macrófagos. A presença de necrose tecidual em alguns casos pode estar relacionada ao infiltrado associada à fibrose encontrada na pele de pacientes com LTA (Moura et al., 2005). Assim, possivelmente a associação entre fatores celulares e teciduais pode estar relacionada ao parasitismo baixo observado nas formas clínicas causadas por *L. (V.) braziliensis*.

Alguns autores tem proposto que durante a infecção por *Leishmania*, o parasita promove a indução de células Treg, pode modular a função das células APCs e das células efectoras por meio de mecanismos contato-dependentes (Belkaid et al., 2002; Bogdan et al., 2008; Xin et al., 2008). A análise imunopatológica das lesões cutâneas e

mucosas no espectro clínico imunológico da LTA realizada no nosso estudo mostrou que a em relação às células Tregs Foxp3⁺ a forma LCAD mostrou-se mais reativa, enquanto que as outras formas clínicas não apresentaram diferenças significativas entre si. Diante disso, parece que embora a função das células Tregs seja a de controlar imunologicamente a patologia da lesão, no caso da LTA, estas podem estar contribuindo para a inativação do efeito leishmanicida do macrófago, resultando no desencadeamento de respostas inflamatórias crônicas e destruição tecidual. Resultados semelhantes foram descritos por Carneiro et al., (2009), que demonstraram que na forma clínica LCL a presença de Treg estava associada a uma resposta imune controlada, enquanto que na LCAD, foi sugerido que as células Tregs Foxp3⁺ contribuíram para a persistência parasitária e exarcebação da lesão. Dentro deste contexto, foi observada também maior expressão de Foxp3 em lesão de pacientes com hanseníase lepromatosa-lepromatosa (LL), doença que guarda semelhança com a LCAD, pela anergia apresentada e perfil Th2 com intensa multiplicação bacilar (Scollard et al., 2006), que resulta em quadro grave e disseminado. Esse aumento de expressão foi demonstrado em relação à forma clínica tuberculóide da doença (Palermo et al., 2012). Assim, considerando que em doenças infecciosas o número aumentado de células Foxp3⁺ está associado à supressão da resposta imune (Belkaid & Rouse 2005; Belkaid 2007), nossos resultados sugerem que o número significativamente maior de células Tregs observadas em LCAD pode estar associado à hiporresponsividade observada nesta forma clínica.

Considerando que as células Treg Foxp3⁺ apresentam como um dos seus mecanismos supressores a expressão de citocinas imunoreguladoras como IL-10 e TGF- β (Tang & Bluestone, 2008), a alta densidade de células Tregs Foxp3⁺ observada em LCAD no nosso estudo esteve associada à expressão elevada de IL-10 e TGF- β demonstrada em estudo realizado pelo grupo no mesmo espectro de doença (Gomes et al., 2013, submmited). Ji et al. (2005) mostraram em estudo experimental com *L. (L.) amazonensis* foi observado que a subpopulação de células TregFop3⁺ foi capaz de produzir as citocinas TGF- β e IL-10, que juntas inibiram a produção de IFN- γ . Vale ressaltar também, que no estudo acima referido do grupo foi observado que pacientes com LCAD expressaram baixos níveis de IFN- γ (Gomes *et.al.*, submmited).

A densidade de células Tregs Foxp3⁺ na forma clínica LCL *por L. (L.) amazonensis* foi discretamente menor quando comparada a forma LCL *por L. (V.)*

braziliensis, o que sugere que espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* induzem uma resposta inflamatória mais intensa na LTA, por esta razão tornam-se necessários mecanismos moduladores de tal resposta (Campanelli et al., 2006). No que diz respeito ao polo hiperreativo foi observado um padrão semelhante na densidade de células Tregs Foxp3⁺ entre as formas LCL (*Lb*), LCDB(*Lb*) e LCM(*Lb*) porém, inferior a LCAD. Acredita-se que a presença de células Tregs no sítio de lesão, mesmo em baixas densidades, pode ser responsável pelo controle de uma resposta inflamatória mais exacerbada e persistência parasitária. Outros relatos tem referido a presença de Treg em lesões causadas por espécies do subgênero *Viannia* (Salhi et al., 2008; Bourreau et al., 2009^b). O acúmulo de células Tregs com atividade supressora, em lesões de pacientes portadores de leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis* foi mostrado por Cappiello et al., (2001), estando essas células presentes predominantemente no local da lesão. Campanelli et al. (2006) também mostraram que em lesões pelo mesmo parasita, as células Tregs secretam IL-10 e suprimem a proliferação e produção de citocinas por células efectoras.

Outros trabalhos da literatura tem enfatizado esse importante papel das células Tregs Foxp3⁺ na regulação da resposta imune a antígenos microbianos em doenças crônicas granulomatosas como leishmaniose e tuberculose, podendo favorecer a persistência parasitária (Guyot-Rovol et al., 2006; Silva et al., 2010).

As células Th17, produtoras de IL-17, são outra subpopulação de células TCD4 que vem mostrando um papel importante na autoimunidade e doenças inflamatórias crônicas (Hashimoto et al., 2005, Moseley et al., 2003). Embora a IL-17 participe dos mecanismos de defesa contra determinados agentes patogênicos, muito pouco se sabe sobre a produção desta citocina em doenças parasitárias em seres humanos, especialmente nas leishmanioses. Quando se avaliou a densidade de células que expressaram IL-17 no espectro clínico e imunopatológico da LTA, observou-se um aumento progressivo da expressão de IL-17⁺ partindo das formas centrais LCL (*La*) e LCL (*Lb*) para as formas polares hiporreativas, LCAD (*La*) e LCDB (*La*), bem como para o polo hiperreativo. Tapia et al. (2013) demonstraram recentemente, em lesão de pele de pacientes com LCAD causada por *L. (L.) mexicana*, maior densidade de células IL-17⁺ e IL-23⁺ quando comparada à forma LCL. Estes dados vão de encontro com os resultados do presente trabalho, onde foi observado o mesmo perfil de IL-17 e IL-23 na LCAD.

Altas densidades de células IL-17⁺ também foram detectadas nas formas LCDB e LCM, ambas causadas por *L.(V.) braziliensis*. Estes dados foram corroborados com os achados de Boaventura et al., (2010), que também encontraram alta expressão de células IL-17⁺ em LCM causadas por *L.(V.) braziliensis* comparada às forma localizada.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória, notoriamente produzida em doenças autoimunes (Miossec, 2009). Entretanto, a expressão de IL-17 no microambiente lesional, aqui demonstrada, indica que essa citocina não está ligada somente a essas doenças, mas também, relaciona-se às doenças infecto-parasitárias. Relatos da literatura mostraram que em doenças dermatológicas autoimunes como o vitiligo IL-17 encontra-se elevada tanto nas lesões quanto no sangue periférico, havendo correlação entre o tamanho da lesão e a expressão desta citocina (Bassiouny; Shaker, 2011). Na psoríase, evidências apontaram que IL-17 desempenhou papel importante no processo inflamatório da doença, e o bloqueio de sua expressão, por outras vias, é acompanhado de melhora clínica (Zaba *et al*, 2007; Miossec, 2009). Na tuberculose, foi sugerido que células Th1 e Th17 são necessárias e contribuem efetivamente no processo de defesa do hospedeiro, assim como IL-17 e IL-23 desempenham papel fundamental na inflamação mediada por neutrófilos e na formação do granuloma após a vacinação com BCG (Curtis & Way, 2009). Na hanseníase, embora não esteja bem definido o mecanismo, foi sugerida uma modulação positiva ao *Mycobacterium leprae* pela expressão desta citocina no tecido infectado, conforme descrito por Ottenhoff (2011). Na infecção por *L.(L.) major*, porém, a produção de IL-23 e IL-17 fortemente influenciou a progressão da doença, em camundongos suscetíveis, através da modulação do recrutamento de neutrófilos (Kostka *et al*, 2009). Bacellar et al., (2009) também mostraram expressão de IL-17 em indivíduos infectados por *L.(V.) braziliensis*.

A geração recíproca de células Tregs Foxp3⁺ e células Th17 aqui detectadas em LCAD foi demonstrada anteriormente por outros autores em doenças infecciosas (Awasthi & Kuchroo 2009).

Visto que, IL-23 é indispensável para as funções efectoras e manutenção de células Th17 (Moeda et.al, 2012), o encontro de um perfil muito semelhante a IL-17 observado no nosso estudo era esperado, apresentando também densidades significativamente elevadas de IL-23 no pólo anérgico e hiperérgico da LTA.

Diante dos nossos achados podemos concluir que, na LTA, a interação entre os antígenos específicos da *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* e as células T, CD4⁺ e

TCD8⁺, é determinante do tipo preferencial de resposta imune celular, Th1 ou Th2, a ser desenvolvida no curso da infecção, ressaltando, no entanto, a participação das células Tregs Foxp3⁺, IL-17⁺ e IL-23⁺ que auxiliam na imunomodulação da resposta do hospedeiro.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

✓ As alterações histopatológicas das lesões de pacientes com as diferentes formas clínicas de LTA mostraram:

- A LCL (*La*) apresentou moderado infiltrado inflamatório linfomononuclear, ora focal e ora difuso, com moderado parasitismo.

- A LCDB (*La*) apresentou moderado infiltrado inflamatório mononuclear, com predomínio de macrófagos parasitados e focos de linfócitos e plasmócitos.

- Na LCAD (*La*) a histopatologia foi caracterizada por infiltrado denso e difuso de macrófagos com inúmeras amastigotas em seu interior e discreto infiltrado linfoplasmocitário.

- A LCL (*Lb*) apresentou baixo parasitismo e intenso infiltrado inflamatório linfomononuclear na derme, com esboço granulomatoso ou granulomas epitelióides bem formados e presença de células gigantes.

- A LCDB (*Lb*) apresentou hiperplasia pseudoepiteliomatosa, denso infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário e discreto parasitismo.

- A LCM (*Lb*) mostrou reação pseudoepiteliomatosa, intenso e difuso infiltrado linfoplasmocitário com esboço granulomatoso ou de granuloma epitelióide bem constituído na sua maioria.

✓ A expressão de células Foxp3⁺, IL-17⁺ e IL-23⁺ determinada por imunistoquímica mostrou-se positiva em todas as lesões das diferentes formas clínicas de LTA.

✓ A forma clínicas hiporreativa LCAD causada por *L.(L.) amazonensis* apresentou a mais alta densidade de células Tregs Foxp3, seguida das formas LCBD^{IDRM-} (*La*) e LCDB^{IDRM-} (*Lb*) caracterizando uma supressão da resposta imune celular. As formas clínicas LCL^{IDRM+} causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, e a forma polar LCM^{IDRM+} causada por *L. (V.) braziliensis* apresentaram uma menor densidade de Treg Foxp3⁺, o que sugere a manutenção de uma resposta inflamatória crônica com persistência parasitária.

✓ A expressão IL-17 mostrou um aumento crescente partindo das formas LCL^{IDRM+}, com equilíbrio de resposta imune, em direção aos pólos de hiporreatividade [LCAD^{IDRM-} e LCDB^{IDRM-} (*La*)] e hiperreatividade [LCDB^{IDRM-} e LCM^{IDRM+} (*Lb*)], favorecendo assim, a exacerbação da resposta inflamatória.

✓ A IL-23, citocina indispensável para às funções efectoras e manutenção de células Th17, apresentou perfil semelhante ao de IL-17.

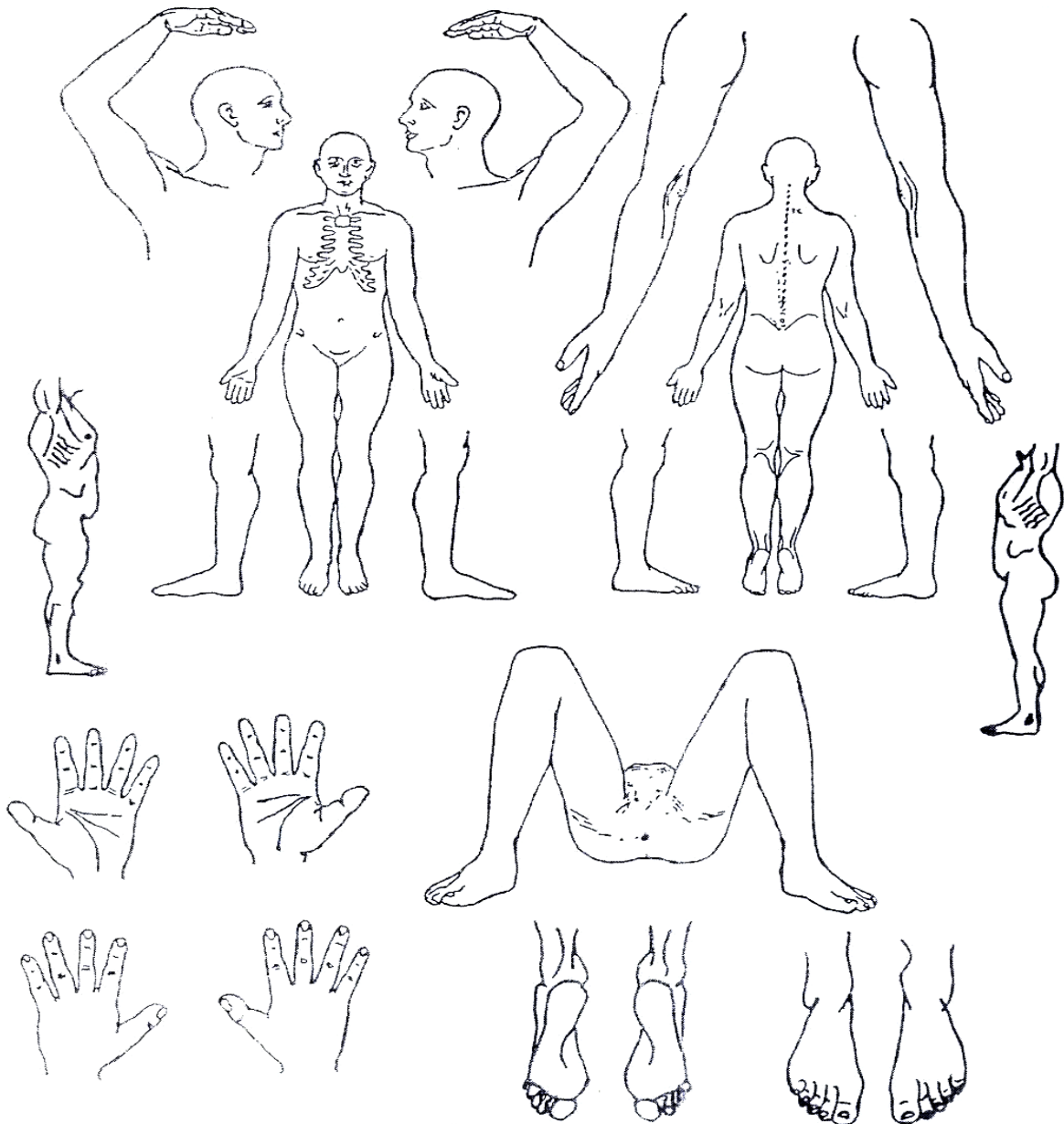
✓ A análise da correlação mostrou forte correlação na forma clínica LCDB (*Lb*) entre os marcadores Foxp3 *versus* IL-17, Foxp3 *versus* IL-23 e IL-23 *versus* IL-17. A forma LCM mostrou forte correlação negativa entre IL-23 e Foxp3.

✓ Diante dos nossos achados, observa-se que as células Tregs Foxp3⁺, IL-17⁺ e IL-23⁺ desempenham um papel importante na imunopatogênese das diferentes formas clínicas da LTA causadas por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*, caracterizada por uma resposta imune polarizada de diferente expressão patológica.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A: LOCALIZAÇÃO E TIPOS DE LESÕES



Cutânea----- Ulcerosa----- Impetiginóide----- Nodular ----- Verrucosa-----

Mucosa:----- *Nasal*----- *Bucal* ----- *Faringe*-----

Outras observações:

ANEXO B: FICHA CLÍNICA

Nome: _____ Sexo: _____ Idade _____

Pesquisa: _____ Nº de Registro: _____ Data: _____

Profissão: _____ Natural: _____ Procedência _____

Endereço: _____

1. Área Epidemiológica para leishmaniose:

() sim () não

2. Histórico clínico:

Tempo de doença:

3. Forma clínica de leishmaniose tegumentar (descrição):

cutânea ()

mucosa ()

cutâneo-mucosa ()

anérgica difusa ()

4. Exames realizados Resultados

Data

4.1 IDRMM Positivo () Negativo () ___X___mm ----/----/---

-

4.2 Esfregaço: Positivo () Negativo () ----/----/----

4.3 Cultura: Positivo () Negativo () ----/----/----

4.4 hamster Positivo () Negativo () ----/----/----

5. Terapêutica:

| Droga | Dose | tempo de tratamento |
|-------|------|---------------------|
| | | |

6. Controle de cura:

clinico () laboratorial ()

7. Resultado:

OBS:

ANEXO C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL**

IDENTIDADE Nº: _____ NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO : _____ C.E.P.: _____

CIDADE : _____ ESTADO: _____ TEL: _____

EU _____

RG. Nº: _____, tendo recebido as informações acima sobre a pesquisa, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

- 1- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com à pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2- A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo do meu tratamento;
- 3- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- 4- A disponibilidade de tratamento médico.

Tenho ciência do exposto acima.

Belém, _____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

Pessoa a contatar em caso de dúvidas a serem esclarecidas.

Nome: Marliane Batista Campos

Fone: 3226 2011 ou 88677829

End.: Trav do Chaco, 1781, apto 804.-Marco, Belém-Pa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS TH17 E T REGULADORAS EM LESÃO DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CAUSADAS POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS* E *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*.

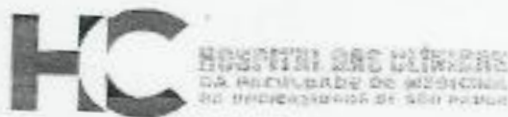
PESQUISADOR RESPONSÁVEL : JOYCE PRIETO BEZERRA DE MENEZES

O presente trabalho tem como objetivo estudar e compreender melhor a leishmaniose da pele (ferida brava) no que diz respeito aos aspectos da imunidade da doença. Isto ajudará os profissionais da área médica conhecer melhor a doença, beneficiando outras pessoas que vierem a apresentar leishmaniose. Desse modo, a sua participação neste trabalho, através de exames que incluirão a pesquisa direta do parasito; punção aspirativa e retirada de pequeno fragmento (biópsia) da borda da lesão ativa, será muito importante, não só no sentido de permitir um diagnóstico laboratorial que possibilitará o seu tratamento no caso de confirmar a suspeita da doença, assim como, permitirá que esses parasitas possam ser melhor estudados. Afirmamos, ainda, que serão garantidas as explicações das técnicas antes e durante a pesquisa, esclarecendo a ausência de riscos ou danos à saúde dos pacientes, assegurando que todo o tipo de material a ser usado para a coleta dos materiais biológicos, raspado de lesão de pele e biópsia da lesão, é absolutamente esterilizado e descartável.

Não será necessário ressarcimento, visto que os sujeitos da pesquisa são pacientes que procuram o programa de leishmanioses do IEC por necessidade própria de esclarecimento diagnóstico. Será garantida indenização por algum prejuízo decorrente da pesquisa.

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO D: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-FMUSP



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.06.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0493/07**, intitulado: **"LEISHMANIOSES NO BRASIL: ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOPATOGENÉTICOS DA DOENÇA HUMANA E EXPERIMENTAL"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**.

Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett**

CAPPesq, 20 de junho de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO E: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FMUSP**APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **25/05/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **184/11** intitulado: **“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CÉLULAS TH17 E T REGULATÓRIAS EM LESÃO DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CAUSADAS POR LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS”** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**

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

Pesquisador (a) Responsável: MARCIA DALASTRA LAURENTI
Pesquisador (a) Executante: JOYCE GOMES PRIETO BEZERRA DE MENEZES

CEP-FMUSP, 26 de Maio de 2011.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4⁺ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2009. 183: 4619-27 p.

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

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

Attia EA, et al. Circulating CD4⁺CD25⁺ high Foxp3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Inter J of Dermatol*. 2010. V.49. 1152-1158 p.

Awasthi A and Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Inter Immunol*, 2009. V. 21. No. 5. 489–498 p.

Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009. 200(1):75–8 p.

Bassiouny DA, Shaker O. Role of interleukin-17 in the pathogenesis of vitiligo. *Clin Exp Dermatol*. 2011. 36(3):292-7 p.

Batten M, Li J, Yi S, Kljavin, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, Sauvage FJ & Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17–producing T cells. *Nature Immunol*. 2006. 929 – 936 p.

Belkaid Y & Rouse BT. Natural regulatory T cells infectious disease. *Nature immunol*. 2005. 353-360p.

Belkaid Y & Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual Rev of Immunol*. 2009. V.27. 551-589 p.

Belkaid Y, Hoffman KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001. 194:1497 p.

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

Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 2007. 7:875-88 p.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VJ. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*. 2008. 453:1051–7 p.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991. 86(3):51-6 p.

Bittencourt AL. Aspectos histopatológicos e ultra-estruturais da leishmaniose cutânea difusa (lcd). 2009. *Gazeta Médica da Bahia*. V. 79. p.45-51.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, Andrade J, Dos Santos WLC, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. 2010. *Eur Jour Immunol*. V.40. 2830–2836 p.

Bonfim G., Nascimento C., Costa J.M.L., Carvalho E.M., Barral-Neto M., Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. 1996. *Exp. Parasitol*. V.84. 188-194 p.

Bourreau E, Ronet C, Darcissac EM, Lise CD, Sainte Marie, Clity EF, Tacchini-Cottier P, Couppie and P. Launois. Intralesional Regulatory T-Cell Suppressive Function during Human Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun*. 2009. V.77. p. 1465-1474.a

Bourreau E, Ronet C, Darsissac E, Lise MC, Marie DS, et al. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. 2009. *J Infect Dis* 199: p.576–579.b

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikaw EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. 2003. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* V. 97. 291–296 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília, 2007. 2ª Edição 182 p.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MSF, Mortara RA, Brodskyn CI, Gonçalves HS, Belkaid Y, Barral – Neto M, Barral A. CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2006. 193 (9): 1313-1322 p.

Campos MB, Gomes CMD, de Souza AAA, Lainson R, Corbett CEP & Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (Viannia) responsible for American cutaneous leishmaniasis. 2008. *Parasitology research.* V.103(4). 771-776 p.

Cappiello GM, Sutterwala FS, Trinchieri G, Mosser DM and Ma X. Suppression of IL-12 transcription in macrophages following Fcγ receptor ligation. *J. immunol.* 2001. 166:4498-4506 p.

Carneiro FP. *et al.* Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009. V.31. No.10. 646-51 p.

Carrier Y. *et al.* Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J of Immunol.* New York. 2007. V.178. No. 1. 179-85 p.

Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden PD. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 1994; 56: 315-325.

Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, Deng Z, Yao Z, Tsun A, Li B. FOXP3 and RORγt: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol*, 2010.

Costa AA, Abreu AL, Gomes CM, Saldanha AC, Barral A, Costa JML, Corbett CEP.

Costa AA, Saldanha AC, Leite BM, Ramos B, Junior IA, Noronha AL, Barral A, Corbett CEP, Costa JML. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (dcl). *Acta Tropica.* 2005. 96: 9-15 p.

Costa JML, Marsden PD, Llanos-Cuenta NO, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brasil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986. 89:319-21 p.

Croxford AL, Mair F, Becher B. IL-23: One cytokine in control of autoimmunity. 2012. V42. 2263–2273 p.

Curtis MM & Way SS. Interleukin-17 in host defense against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009. 126(2): 177-85 p.

Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura, J (Ed.) *Dinâmica de Doenças Infecciosas*. 2005. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, V.2.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology Infectious & Disease*. 2004. v.27, n.5.305-18 p.

Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. 2009. V11. 584-588 p.

Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Acta Tropica*. 2006. 98:125-129 p.

Ferreira SMB, Ignotti E, Senigalia LM, Silva DRX, & Gamba MA. Recurrence of leprosy cases in the State of Mato Grosso, Central-West Brazil. 2010. *Revista de Saúde Pública*, 44(4), p 650-657.

Fifth World Congress on Leishmaniasis, WorldLeish5, 2013. Diaz NL, Aguilar E, Perez-Valero R, Lopez Y, Tapia FJ. TH17 response in lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis.

Freitas RA, Naiff RD, Barret TV. Species diversity and flagellate infections in the Sandy fly near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002. 97 (1):53-59 p.

Gomes CMDC, Goto H, Ribeiro Da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M & Corbett CE. Insulin-like Growth Factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. 2000. *Int jour exp patho*. V.81(4). 249-255 p.

Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV & Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. 1991. *American jour trop med hyg*. V. 45(3). 281 p.

Guyot-Rovol V, Innes JA, Hackforth S. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006. 173: 803–810 p.

Hanham CA, et al. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 220-226, 1991.

Harrington LE, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005. 6:1123–1132 p.

Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005. 137(Suppl 1):51–4 p.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al., “The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells,” *Cell.* 2006. V.126. No.6, 1121–1133 p.

Ji J. *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 2005. V.174. No.11. 7147-53 p.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host pathogen interface. 2011. *Nat. Rev. Microbiol.* V 9. p. 604-615.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27, 485-517.

Kostka SL, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC and Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J. Immunol.* 2009. 182:3039-3046 p.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In: L Collier, A Balows, M Sussman (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology.* London. 2005. V.5. 313-349 p.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis-The Neotropical *Leishmania* species. In: *Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections.* 9aed. Editora Feeg Cox. 1998. 241-66 p.

Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. Rev Par Med 11: 29-40 1997.

Lainson, R. (1982). Leishmanial parasites of mammals in relation to human disease. In *Animal Disease in Relation to Animal Conservation. Symposia of the Zoological Society of London* (pp. 137-179).

Lainson, R.; Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. 1987. Biol. Epid. (eds: Peters W & Killick-Kendrick R).V.1: p.1-120.

Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol*. 2009. 21:274-80 p.

Maeda S, Hayami Y, Naniwa T and Ueda R. The Th17/IL-23 Axis and Natural Immunity in Psoriatic Arthritis. *Review*.2012.

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

Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4+ CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*. 2004. V:200(2) p:201-210 p.

Miles MA et al., Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 243-252, 1979

Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect*. 2009. 11(5):625-30 p.

Miossec, P. 2003. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: If T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis & Rheumatism*, 48(3), 594-601.

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

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003. 14:155-74 p.

Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A & de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* (2005). *Infec immunity*. V.73(9). 5827-5834 p.

Mucida D, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. 2007. *Science* 317:256–260.

Myhara M & Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. Review. 2007. V. 13. 108-116 p.

Nagase H, Jones M.K, Anderson C.F, Trauth N.N. Despite Increased CD4⁺Foxp3⁺ Cells within the Infection Site, BALB/c IL-4 Receptor-Deficient Mice Reveal CD4⁺Foxp3⁻ Negative T Cells as a Source of IL-10 in *Leishmania major* Susceptibility. *The J. of Immunology*. 2007. V. 179. 2435-2444 p.

Nascimento MS, Albuquerque TD, Do-Valle-Matta MA, Caldas IS, Diniz LF, Talvani A & Guedes PM. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. 2013. *Vet immunol*. V. 153. 202–208 p.

Novoa, R., Bacellar, O., Nascimento, M., Cardoso, T. M., Ramasawmy, R., Oliveira, W. N., & Carvalho, E. M. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. 2011. *Parasite immunol*, 33(2), 132-136.

Nylén, S.; Maasho, K.; McMahon-Pratt, D.; Akuffo, H. Leishmanial amastigote antigen P-2 induces major histocompatibility complex class II-dependent natural killer-cell reactivity in cells from healthy donors. 2004. *Scand J Immunol*. v.59(3): p.294-304.

Organización Mundial de la Salud. Informe de una reunion del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las leishmaniasis. Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. 130 p.

Organização Panamericana de Saúde. Informe Epidemiológico das Américas. No. 1. 2013.

Ottenhoff THM. New insights and tools to combat leprosy nerve damage. *Lepr Rev*. 2011. 82:334-7 p.

Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte AJS, Cacere CR, & Benard G. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. 2012. *The Jour trop med and hyg*, v. 86(5), p.878.

Park H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by

Peters N. e Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunological Reviews*. V.213, 159-179, 2006.

Pitta MG, Romano A, Cabantous S et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *leishmania donovani*. *J Clin Invest*. 2009. 119: 2379-87 p.

producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005. 6:1133–1141 p.

Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH & Hirsch, CS. A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. 2006. *Clin & Exp Immunol*, v.144(1), p. 25-34.

Rodrigues KMP, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Silvia L, Soares DS, Dolci ELL, Perico RAPN and Pirmez C. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *British Assoc of Dermatol*. 2011. 164: 1228-1234 p.

Ruddy JM, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J. of Leukocyte Biology*. 2004. V. 76. No. 1 135-144 p.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. 2002. *Nat Rev Immunol*. V. 2(11):845-58 p.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and immune tolerance. *Review Cell Press*. 2008. V.133 775-787 p.

Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano RL, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcais A, Argiro L, and Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J. Immunol*. 2008.

Scorllard DM, et al. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Biol. Microbio reviews*. 2006. V.19, 338-381 p.

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

Shen F, Ruddy M, Plamondon P, Gaffen S. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF- α -induced genes in bone cells. *J. of Leukocyte Biology*. 2005. V. 77 no. 3 388-399 p.

Shevach EM, Richard AD, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Horton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immuno. Reviews*. 2006. V212. 60–73 p.

Silva LC, Silveira GG, Arnone M, Romiti R, Geluk A, Franken KC, Duarte AJ, Takahashi MD, Benard G. Decrease in Mycobacterium tuberculosis specific immune responses in patients with untreated psoriasis living in a tuberculosis. endemic area. *Arch Dermatol Res*. 2010. 302: 255–262 p.

Silveira F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431, 2009.

Silveira FT, Ishikawa EA, de Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002. 9: 43-50 p.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in the Amazonian Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004. 99: 239-251 p.

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

Silveira FT, Lainson R, De Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, De Souza AAA, DA Silva BM. 1997. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, R.N.Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias. p.619-30.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AAA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brasil. 1991 *Rev Inst Med Trop São Paulo*. V 33(1). 18-22 p.

Silveira FT, Laison R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cell in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. 2008a. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*.

Silveira FT, Moraes MAP, Lainson R, Shaw JJ. Experimental cutaneous leishmaniasis. III – Histopathological aspects of the developmental behavior of cutaneous lesions induced in the *Cebus apela* monkey (Primates: Cebidae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1990; 32: 387-394 p.

Silveira FT, Müller SR, Souza AAA, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. 2008b. *Revista Paraense de Medicina* V.22 (1).

Stumhofer JS, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*. 2006. 7:937–945 p.

Tang Q, Bluestone JA. The FoxP3 regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008. 9:239-44 p.

Thomas K, et al. "IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.47 (2008): 18460-18465.

Turetz ML, Machado PR, KO AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. 2002. *J Inf Dis*. V.86. p.1829-1834.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006. 24:179–189 p.

Walton, B.C.; Shaw J.J.; Lainson, R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *J Parasitol* 63: 1118-1119, 1977.

Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Ver. Malden*. 2001. V. 182. 207-214 p.

World Health Organization. Report of the Fifth Consultative Meeting On *Leishmania/HIV* Coinfection. Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March, 2007.

Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J. et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*. 2007. 204(13):3183-94 p.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD. et al. TGF-beta-induced FoxP3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*. 2008. 453(7192):236-40 p.

Zhou L, Mark M.W, Chong and Littman D.R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunol*, 2009.