



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA RECENTE**

MAÍRA GARCIA SALDANHA

Salvador - Bahia

2015

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA RECENTE**

MAÍRA GARCIA SALDANHA

Orientador: Sérgio Marcos Arruda

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2015

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Dr. Sérgio Arruda, meu orientador, pelo incentivo e confiança.

A Dr. Edgar Carvalho por sua extrema atenção, cuidado e inspiração.

Ao meu digníssimo esposo, Alcides Mendes, minha fortaleza.

Aos meus pais, Júlio e Alda, que me conceberam e me criaram com o dom da vitória.

As minhas irmãs, Thais e Sueli, pela condução ao sucesso e união.

Aqueles que alegremente posso chamar de família e compartilhar minha grata trajetória.

A toda equipe do Centro de Saúde de Corte de Pedra e do SIM/HUPES, imprescindíveis e persistentes e, aos pacientes, pela sua esperança e doação.

Aos meus parceiros de laboratório Débora Leal, Rafaela de Assis, Alexandre Peres, Dayana Mendes e toda equipe do LASP, da secretaria aos demais estudantes.

Ao meu indispensável companheiro de classe Anderson Suzart e demais colegas do Curso de Biotecnologia e Patologia, pelo convívio nas disciplinas.

Aos estudantes também orientados por Dr. Sérgio, em especial, Jéssica Petrilli e Hayana Ramos, e os IC's André Chaves e Rafaela Donadone pelo apoio fundamental.

A todos (que são e que foram) da Plataforma de Histotecnologia do CPqGM, local onde nasci na Fiocruz, em especial Cláudia Stutz, Márcio Santos, Elmir Mateus e Avani Gomes.

A Plataforma de Microscopia Eletrônica, em especial, aos Doutores Adriana Rangel, Cláudio Silveira e Maria Lúcia Vieira.

A Dr. Washington Santos e Dr. Paulo Machado pelas contribuições na Qualificação.

A Dr. André Vannier pelas viagens apaixonantes entre as fotomicrografias de microscopia eletrônica e a todos os Pesquisadores por suas incansáveis buscas e contribuições.

A Dra. Clarissa Gurgel e Dr. Antônio Freitas pela presteza e suporte para as imunohistoquímicas.

A todo pessoal responsável pela organização do CPqGM, desde a portaria/limpeza a diretoria, por proporcionar um ambiente propício ao estudo.

A Biblioteca Eurydice Pires de Sant'Anna, em especial, Sra. Ana Maria Fiscina.

As instituições que fomentaram a bolsa de estudos e a compra dos reagentes.

Aos irmãos na fé, por reconhecermos que somos mordomos de tudo o que o Senhor nos dá.

As instituições que fomentaram a bolsa de estudos e a compra dos reagentes.

Por fim, ao Deus que me enriqueceu com suas bênçãos infindáveis.

Estou certa de que este trabalho trará contribuições no âmbito científico, mas também traduz o valor de cada relação interpessoal construída, por isso, ofereço-lhes a minha gratidão.

“Senhor, enquanto meus filhos crescem, peço que abençoes seus talentos e habilidades em desenvolvimento. Que tu fiques grato com o trabalho do coração, mente e corpo deles e, que em suas atividades tenham um bom desempenho e excedam o nível de suas habilidades. Dê para eles o desejo de aprender e crescer com propósito e motivação.

(Oração da minha mãe)

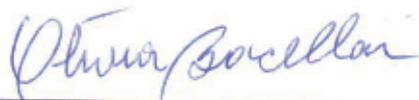
Amém.

"AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA RECENTE"

MAÍRA GARCIA SALDANHA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Olívia Amada Ramos Bacelar
Pesquisadora do Serviço de Imunologia
HUPES/UFBA



Dr. Daniel Abensur Athanázio
Professor
UFBA



Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ

SALDANHA, Máira Garcia. Avaliação da resposta inflamatória tecidual de pacientes com Leishmaniose cutânea recente. 84 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais frequente da leishmaniose humana, considerada um importante problema de saúde no Brasil. A infecção por *Leishmania braziliensis* induz um amplo espectro de lesões que pode se manifestar como uma única lesão cutânea localizada, geralmente em partes descobertas do corpo. Tem início com uma pápula, caracterizando a leishmaniose cutânea recente (LCR) e, na maioria dos casos, tende a desenvolver uma úlcera, representando a leishmaniose cutânea clássica (LCC). Pacientes com LCR apresentam um elevado número de parasitas na lesão e, frequentemente, não respondem positivamente à terapia padrão, desenvolvendo a lesão mesmo após o tratamento. **Objetivo:** Descrever de modo comparativo os aspectos histopatológicos na Leishmaniose Cutânea Recente e Leishmaniose Cutânea Clássica. **Métodos:** Secções histológicas obtidas de biópsias de pele de 15 pacientes com LCR e 28 com LCC, foram coradas em HE e mensuradas as áreas de inflamação e necrose nas diferentes fases da doença. Realizamos imunohistoquímica para marcação de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD68⁺ e CD138⁺. Além disso, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão para identificar morfológicamente as células, localizar amastigotas nos meios intra e extracelulares e reconhecer possíveis interações celulares. **Resultados:** Alterações na epiderme foram aparentes em ambas as fases e na derme, foram mais frequentes as células gigantes e os neutrófilos na LCC. O número de amastigotas foi maior na LCR, apresentando o parasita uma morfologia ultraestrutural íntegra, sugerindo viabilidade. A inflamação conduzida por um variado espectro celular apresentou uma predominância dos linfócitos T CD3⁺, com os subtipos CD4⁺ e CD8⁺, que aumentaram de acordo com o progresso da doença. O número de macrófagos CD68⁺ foi correlacionado positivamente ao número de amastigotas, nas fases tardias da doença. Além disso, houve uma correlação positiva entre as células CD68⁺ e o tamanho da lesão nas fases iniciais e, entre os macrófagos e a área de necrose, durante todo o curso da doença. **Conclusão:** A presença do parasita e a extensiva infiltração celular, com participação efetiva dos macrófagos, provocam alterações na epiderme e derme, contribuindo para o desenvolvimento da lesão cutânea e interferindo na resposta terapêutica.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea recente. Histopatologia. Inflamação. Imunohistoquímica.

SALDANHA, Máira Garcia. Evaluation of tissue inflammatory response of patients with early cutaneous Leishmaniasis. 84 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical form of human leishmaniasis induced by *L. braziliensis*. It is considered a major health problem in Brazil. *Leishmania braziliensis* infection induces a large spectrum of lesions that can manifest as one localized skin lesion, usually undressed body parts. It starts with a papule in early cutaneous leishmaniasis (ECL) clinical manifestation and, in most cases, tends to develop an ulcer, in the late cutaneous leishmaniasis (LCL). ECL patients have a high number of parasites in the lesion, and often do not respond to standard therapy, developing the lesion even after treatment. **Aim:** To describe comparative the histopathological aspects of early cutaneous leishmaniasis compared to late ulcerated cutaneous leishmaniasis. **Methods:** Histological sections of skin biopsies from 15 ECL patients and 28 LCL, were stained with HE and measured areas of inflammation and necrosis in the different stages of the disease. We performed immunohistochemical for CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD68⁺ and CD138⁺. In addition, we used transmission electron microscopy to identify the cells morphologically, to locate amastigotes in intra and extracellular and to recognize possible cellular interactions. **Results:** Changes in the epidermis are apparent in both phases. In the dermis chronic inflammation with giant cells and neutrophils in the LCL. The number of amastigotes is higher in the ECL. Amastigotes are morphologically intact at ultrastructural analysis, suggesting their viability. Inflammation with a varied spectrum of cells, commonly with CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells, increasing as the lesion progress. The number of CD68⁺ macrophages are predominant cells in the infiltrate and was positively correlated with number of amastigotes in the late stages of the disease. Furthermore, there was positive correlation between CD68⁺ cells and the lesion size in the early stages and between macrophages and necrotic areas during the disease progress. **Conclusion:** The presence of the parasite and the extensive cellular infiltration with the effective participation of macrophages, cause changes in the epidermis and dermis, contributing to the development of skin lesion and affecting the therapeutic response.

Keywords: Early cutaneous leishmaniasis. Histopathology. Inflammation. Immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aspectos gerais das alterações mais comumente observadas na evolução da LC.....	18
Tabela 2	Relação anticorpos primários e respectivas diluições.....	26
Tabela 3	Dados sócio-demográficos e clínicos de pacientes diagnosticados com LCR e LCC.....	34
Tabela 4	Frequência das alterações histopatológicas na epiderme e derme nos casos de LCR e LCC.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplificação da análise morfométrica em corte histológico de LCC após imunomarcagem do CD138. (A) Visualização das células imunomarcadas. (B) Seleção e quantificação das células positivas.....	28
Figura 2	Exemplificação da análise morfométrica em corte histológico de LCR. (A) Medida da extensão total do fragmento. (B) Seleção da área de infiltrado inflamatório. (C) Seleção da área de necrose.....	29
Figura 3	Fluxograma de biópsias e métodos.....	32
Figura 4	(A) Fotografia da lesão papular em LCR comparada à (B) lesão ulcerada de LCC causadas pela <i>L. braziliensis</i> . (C) Comparação entre os tamanhos das lesões cutâneas (mm ²) em LCR e LCC.....	35
Figura 5	Características histopatológicas observadas na epiderme de pacientes com LCR e LCC.....	38
Figura 6	Aspectos histopatológicos presentes na derme de pacientes com LCR e LCC.....	39
Figura 7	Fotomicrografias das secções de pele de pacientes com leishmaniose cutânea.....	40
Figura 8	(A) Avaliação da área de inflamação em relação à área total da secção histológica. (B) Avaliação da área de necrose em relação à área total da secção histológica.....	41
Figura 9	Correlação entre as áreas de inflamação e de necrose (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28).....	42
Figura 10	Amastigotas de <i>L. braziliensis</i> (A) em HE e (B) imunomarcadas com anticorpo policlonal antileishmania em casos de LCR. (C) Número de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> por 10 campos randomizados das secções de LCR e LCC.....	43
Figura 11	Fotomicrografias da imunomarcações de linfócitos T.....	45
Figura 12	Fotomicrografias da imunomarcações de linfócitos B, macrófagos e plasmócitos.....	46
Figura 13	Perfil celular do infiltrado inflamatório na LCR e LCC.....	47
Figura 14	Correlação entre o número de macrófagos CD68 ⁺ e o tamanho da lesão (A) na LCR e (B) na LCC.....	48

Figura 15	Correlação entre o número de macrófagos CD68 ⁺ e a área de inflamação (A) na LCR e (B) na LCC.....	48
Figura 16	Correlação entre o número de macrófagos CD68 ⁺ e a área de necrose (A) na LCR e (B) na LCC.....	49
Figura 17	Correlação entre o número de macrófagos CD68 ⁺ e de amastigotas (A) na LCR e (B) na LCC.....	49
Figura 18	Correlação entre o número de linfócitos CD3 ⁺ e a área de inflamação (A) na LCR e (B) na LCC	50
Figura 19	Correlação entre o número de células B CD20 ⁺ e área de inflamação (A) na LCR e na LCC	51
Figura 20	Correlação entre o número de células B CD138 ⁺ e área de inflamação (A) na LCR e (B) na LCC	51
Figura 21	Comparação entre a resposta terapêutica e (A) a área de inflamação (B) a área de necrose e (C) o número de amastigotas na LCR e LCC	53
Figura 22	Células entre fibras colágenas em microscópio eletrônico.....	54
Figura 23	Células inflamatórias infiltradas na derme de paciente com LCC.....	55
Figura 24	Amastigotas de <i>L. braziliensis</i> em vacúolo parasitóforo de célula fagocítica observadas no fragmento de pele de paciente com LCR.....	56
Figura 25	Amastigota de <i>L. braziliensis</i> sobre fibras colágenas observadas no fragmento de pele de paciente com LCR.....	57
Figura 26	Amastigota de <i>L. braziliensis</i> dentro de macrófagos e envolto por figuras de mielina na LCR.....	58
Figura 27	Possíveis interações entre células inflamatórias observadas no fragmento de pele de paciente com LCC.....	59
Figura 28	Mastócito encontrado em biópsia de paciente com LCC.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (marcador de membrana de células)
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DAB	Diaminobenzidina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	human immunodeficiency virus/ Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN γ	Interferon gama
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose Cutânea
LCA	Leishmaniose Cutânea Atípica
LCC	Leishmaniose Cutânea Clássica
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Cutâneo Mucosa
LCR	Leishmaniose Cutânea Recente
LD	Leishmaniose Disseminada
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
ME	Microscopia Eletrônica
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
mm²	Milímetro ao quadrado
nm	Nanômetro
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> - Fosfato Salina Tamponada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1.2	ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	13
1.3	ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA LESÃO CUTÂNEA.....	14
1.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	15
1.5	ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	19
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	ASPECTOS GERAIS	23
4.2	PACIENTES	23
4.2.1	<i>Crítérios de inclusão nos grupos</i>	24
4.2.2	<i>Crítérios de exclusão nos grupos</i>	24
4.3	BIÓPSIAS	25
4.4	IMUNOHISTOQUÍMICA	25
4.5	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUALITATIVA	27
4.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUANTITATIVA.....	27
4.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DE INFLAMAÇÃO E NECROSE	28
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	30
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4.10	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32

4.11	DESENHO EXPERIMENTAL	32
5	RESULTADOS	33
5.1	ASPECTOS CLÍNICOS	33
5.2	ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS	36
5.2.1	<i>Alterações na epiderme e derme</i>	36
5.2.2	<i>Áreas de inflamação e de necrose</i>	40
5.3	ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	42
5.3.1	<i>Amastigotas de <u>L. braziliensis</u></i>	42
5.3.2	<i>Perfil celular inflamatório</i>	44
5.4	CORRELAÇÕES ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS	47
5.5	RESPOSTA TERAPÊUTICA	52
5.6	ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS	54
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	GLOSSÁRIO	77
	APÊNDICES	79
	PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	79
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	82
	DADOS COMPLEMENTARES.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Leishmanioses são doenças antropozoonóticas causadas por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania spp.* Estas doenças predominam em países tropicais e subtropicais, sendo que mais de 98 países têm relatos de transmissão da leishmaniose endêmica (ALVAR *et al.*, 2012). Segundo a OMS (2012) estima-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco dessa infecção. Cerca de 20 espécies de *leishmanias* são associadas à doença humana, com variação da manifestação clínica de acordo com a espécie do parasita e a influência da resposta imune do hospedeiro (BRYCESON, 1969).

Entre as leishmanioses, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada principalmente pela *Leishmania braziliensis*, *L. guaynensis*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (LAINSON, 1983; GRIMALDI, 1989). Podendo o indivíduo infectado apresentar desde a forma cutânea localizada (LCL), mucocutânea (LCM), disseminada (LD) à difusa (LCD). No Brasil, o complexo *Leishmania (Viannia) braziliensis* é mais frequentemente associado à doença no homem e também a principal espécie isolada nos casos da leishmaniose cutânea (GRIMALDI JR.; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989; BRASIL, 2010). Na Bahia, a doença é endêmica em praticamente todo o estado, ocorrendo principalmente em áreas rurais do recôncavo, com surtos epidêmicos registrados em várias localidades, dentre elas, a região de Três Braços, que tem cerca de 90% dos casos de LTA causada pela *L. braziliensis*. Em 2014, foram notificados 2.195 casos de leishmaniose cutânea nos municípios baianos, sendo 532 casos registrados em Presidente Tancredo Neves, cidade localizada no recôncavo do estado (SINAN, 2014).

Durante o ciclo de vida do parasita são observadas duas formas evolutivas, as promastigotas, presentes no intestino de insetos vetores e, as amastigotas, encontradas nos tecidos do hospedeiro parasitando, principalmente, as células do sistema fagocítico mononuclear (NEVES, 1997). A transmissão para o homem ocorre através da picada de flebotomíneo fêmea infectada que, no momento da hematofagia, injeta saliva contendo cerca de 10 a 100 promastigotas (GREVELINK; LERNER, 1996).

O diagnóstico da LTA depende da identificação do parasita, porém, a detecção de amastigotas nas lesões cutâneas de leishmaniose nem sempre é possível. Rotineiramente é realizada a intradermoreação de Montenegro (IDRM), teste que avalia a reação de hipersensibilidade tardia que ocorre na LTA (MELLO *et al.*, 1997), onde são consideradas positivas as reações com endureção superior ou igual a cinco milímetros (mm) de diâmetro. No caso de uma área endêmica, é aceitável que o diagnóstico da doença seja feito baseado na associação do teste positivo com a presença de uma lesão típica (GUIMARÃES *et al.*, 2005; MARSDEN, 1994). Entretanto, é recomendável que seja feito o estudo histopatológico, imunohistoquímico, a realização de cultura do parasita e/ou a utilização de técnicas como a de reação de polimerase em cadeia (PCR) (SHIRIAN *et al.*, 2014).

O tratamento de primeira escolha recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para todos os tipos de leishmanioses utiliza o antimonial pentavalente. No Brasil, o Ministério da Saúde distribui gratuitamente na rede pública de saúde o Glucantime®, um medicamento antiparasita, que consiste num ciclo de aplicações intravenosa ou intramuscular do medicamento em doses diárias de 20 mg/kg durante 20 dias. O critério de cura é definido basicamente pelo aspecto clínico das lesões, observando-se a reepitelização das lesões ulceradas ou não-ulceradas, a regressão total da infiltração e eritema, no período de até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (GONTIJO, 2003).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A lesão cutânea inicial desenvolve-se no local da picada do flebótomo infectado e após o período de incubação do parasita que no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de poucas semanas até anos (BRASIL, 2010). Geralmente, o acometimento da pele ocorre em locais expostos do corpo como membros inferiores e superiores. Próximo à área afetada é comum a observação de linfadenopatia regional, que pode, às vezes, preceder a lesão cutânea (BARRAL et al., 1992; 1995).

Nas fases iniciais após a infecção observa-se um estágio preulcerativo nos primeiros 20 dias de duração, que se manifesta clinicamente com uma pequena lesão papulosa ou nodular, por vezes eritematosa, bem delimitada, algumas vezes arredondada ou acuminada (MACHADO *et al.*, 2002a; COSTA *et al.*, 2009). Esta lesão pode evoluir aumentando em tamanho e profundidade, formando uma úlcera característica da Leishmaniose Cutânea Clássica (LCC) (Costa *et al.*, 2009).

A úlcera típica da leishmaniose cutânea tardia é indolor, em geral única, poucas vezes múltipla com até dez lesões. Em geral, são arredondadas ou ovóides, de tamanhos variáveis de alguns milímetros a centímetros, têm base infiltrada e firme, bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, com fundo granuloso e avermelhado. Nestes casos, pode ser notado exsudato, que, quando amarelado, aparentemente é resultado de infecção bacteriana associada, a qual, posteriormente, desseca, formando crostas de cor pardo-enegrecida (CARINI; PARANHOS, 1909; LINDEMBERG, 1909; PESSÔA; BARRETTO, 1948; MARSDEN, 1986; MATTOS, 1993 *apud* BRASIL, 2006).

As úlceras podem curar espontaneamente dentro de alguns meses ou anos, ou também permanecerem ativas coexistindo com lesões mucosas de surgimento posterior (COSTA *et al.*,

2009). A disseminação para outras áreas cutâneas com múltiplas lesões papulares são menos frequentes (CARVALHO *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 1986), assim como as lesões verrucosas, vegetantes e demais formas atípicas.

1.3 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA LESÃO CUTÂNEA

A análise histopatológica da borda de úlceras revela epiderme com crosta, acantose, hiperqueratose, parakeratose, espongirose, exocitose e papilomatose. Na derme, observa-se a presença de células inflamatórias mononucleares, com ou sem necrose, granulomas, células gigantes e fibrose (BOAVENTURA; BARRAL; BARRAL-NETO, 2011). Vasculites de graus variados também estão presentes (MAGALHÃES *et al.*, 1986), além de proliferação vascular e tecido de granulação (KUMAR *et al.*, 2007).

Foi descrito que na LCL a intensidade da necrose é diretamente proporcional ao número de macrófagos na lesão, além disso, diferentes graus de degradação do colágeno correlacionam-se diretamente com a intensidade do infiltrado inflamatório (SILVA, 1999). Existe uma variação no perfil de células inflamatórias, citocinas e quimiocinas em função do tempo de evolução das lesões. Nas lesões tardias observa-se uma maior intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões com mais de 60 dias comparada com as lesões com menos de 30 dias. Nesta última pode haver um número maior de parasitas (CAMPANELLI *et al.*, 2010; DA-CRUZ *et al.*, 2005; DIMIER-DAVID, 1994) que diminui nas lesões tardias, sugerindo uma menor participação do parasito na formação das lesões típicas da doença (BITTENCOURT; ANDRADE, 1967 apud DANTAS, 2012).

As lesões em estágios iniciais apresentam vasculite, infiltrado de macrófagos, necrose lítica, amastigotas, ausência de granulomas e hiperplasia da epiderme (MACHADO *et al.*,

2002a). Em síntese, na LCL observam-se granulócitos e infiltração de células mononucleares nas fases iniciais, mudando para um padrão com numerosos linfócitos e macrófagos em lesões tardias (CAMPANELLI *et al.*, 2010).

A análise de mais de uma biópsia da lesão de um mesmo paciente ou de uma mesma lesão, pode indicar vários padrões morfológicos coexistentes em diferentes áreas (BITTENCOURT; BARRAL, 1991). Portanto, se faz necessário um estudo amplo de características histopatológicas que aproximem os conceitos já relatados.

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A pele está constantemente exposta ao ambiente e funciona como uma barreira física contra a infecção, além de ser um importante órgão imunológico. É composta estruturalmente por camadas, onde a epiderme forma a porção mais externa e é essencialmente constituída por queratinócitos. Na camada subjacente encontra-se a derme, predominantemente formada por fibroblastos e tecido extracelular, vascularizado e innervado, separada da epiderme através da membrana basal. Do ponto de vista imunológico, a pele possui um sistema com células residentes e circulantes para monitorar infecções e controlar a inflamação.

Ao infectar o hospedeiro, o parasita interage com diferentes tipos celulares da resposta imune inata, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (LIMA *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 2001). Inicia-se um recrutamento de células inflamatórias para o local, o que parece ter um papel importante no desenvolvimento da úlcera. Os neutrófilos são os primeiros a migrar para o sítio da infecção, seguido pelos monócitos, macrófagos e linfócitos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008).

Macrófagos são as principais células que abrigam as amastigotas e participam diretamente na sobrevivência ou morte do parasita, dependendo da ativação dessas células. Quando infectados apresentam antígenos parasitários para linfócitos T, onde peptídeos do parasita associados à molécula de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II exposta na membrana dos macrófagos que, por sua vez, podem interagir com receptores das células T CD4⁺ ativando-as especificamente contra o parasita. (REINER *et al.*, 1988). Já os linfócitos T CD8⁺ não ativados que circulam nos órgãos linfóides secundários podem ser ativados por células dendríticas potencializando a resposta imune (HARTY; BADOVINAC, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado um aumento na frequência das células T CD8⁺ em relação às células T CD4⁺ em lesões ulceradas, bem como a expressão de granzimas por células T CD8⁺ correlacionadas com a intensidade da inflamação, indicando um papel destas células na patogênese da LC (DANTAS *et al.*, 2013; FARIA *et al.*, 2009). São duas possibilidades, a lise de parasitas, eliminando-os, ou a lise de células do hospedeiro contribuindo com a lesão tecidual. Outros relatos mostram que as células T CD4⁺ e IFN- γ ⁺ contribuem para a morte do parasita ativando macrófagos, enquanto que células T CD8 e granzima B positivas podem também contribuir para a lesão tecidual (SANTOS *et al.*, 2013).

O principal mecanismo de ativação dos macrófagos ocorre a partir da produção de IFN- γ por células NK e linfócitos T que, juntamente com o TNF- α , contribuem no controle da multiplicação do parasita durante as fases iniciais da infecção e na mediação ao dano tecidual na LTA (RIBEIRO DE JESUS *et al.*, 1998). Camundongos infectados com *L. braziliensis* e neutralizados para IFN- γ apresentam um aumento significativo no tamanho das lesões, sem conseguir controlar a infecção (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998). Todavia, mesmo com a forte expressão de citocinas os parasitos ainda persistem no organismo, mantendo um círculo vicioso de ativação celular (BACELLAR *et al.*, 2002; BARRAL; BITTENCOURT, 1991).

Células obtidas dos linfonodos de pacientes nas fases iniciais, pré-ulceradas, exibem muitos neutrófilos, eosinófilos e células T CD8⁺. Em contraste, células B e plasmócitos foram mais frequentemente observados em pacientes que apresentaram linfadenopatia e lesão ulcerada (BOMFIM *et al.*, 2007). Na investigação da patogênese da leishmaniose, encontram-se vários estudos sobre células T, contudo, devemos considerar também a influência dos linfócitos B na resposta imunológica, pois há poucos relatos dessas células relacionados à patogênese.

Em experimentos com camundongos infectados pela *Leishmania major*, com a depleção de células B observou-se uma exacerbação da doença, sugerindo que estes linfócitos são necessários para geração de células T que intermediam a cura das lesões (SCOTT; NATOVITZ; SHER, 1986). Em biópsias de pacientes com leishmaniose disseminada, observou-se uma correlação entre a presença de células B CD20⁺ e inflamação tecidual, além do predomínio de plasmócitos (MENDES *et al.*, 2013). Adicionalmente, existe uma relação temporal entre o desenvolvimento da úlcera e o aumento do número de células B (POMPEU *et al.*, 2001). Assim, a contribuição das células B e plasmócitos na LC permanece controversa.

Os achados patológicos relacionados ao desenvolvimento da LC em humanos e modelos experimentais infectados pela *Leishmania spp.* estão sumarizados na Tabela 1. As fases aguda e silenciosa são consideradas como os primeiros momentos da infecção, que podem variar de algumas semanas até meses, onde a proliferação de parasitas ocorre sem a ostensiva manifestação da doença (BELKAID *et al.*, 2000). Por fase ativa compreende-se o surgimento da lesão cutânea, destacando-se a expressão de citocinas e a presença de diversos tipos celulares, incluindo a expansão dos linfócitos T. Já na fase ulcerada há formação de granulomas e a presença dos linfócitos B, considerando também as alterações progressivas na epiderme durante todo o processo de infecção. A cronicidade ou estabelecimento da cura pode depender do contraste

entre o perfil celular e expressão das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, além da capacidade de reestabelecimento tecidual, observada pela presença de fibrose (NYLÉN; EIDSMO, 2012).

Tabela 1. Aspectos gerais das alterações mais comumente observadas na evolução da LC.

	Epiderme	Derme
Fase aguda	<ul style="list-style-type: none"> - Sem alterações evidentes. - Citocinas e quimiocinas são expressas por queratinócitos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Reação inflamatória local - Infiltração de neutrófilos, células dendríticas, células mononucleares.
Fase silenciosa	<ul style="list-style-type: none"> - Patologia não evidente. - Alterações atróficas podem ser detectada por microscopia. 	<ul style="list-style-type: none"> - Replicação do parasita é inicialmente baixa, mas eventualmente aumenta rápido. - Parasitas intra e extracelular são presentes na derme superior. - Infiltrado inflamatório dominado por monócitos/macrófagos.
Fase ativa	<ul style="list-style-type: none"> - Queratinócitos regulam positivamente MHC-II. - Sinais de áreas necróticas contendo neutrófilos apoptóticos. - Proliferação de queratinócitos na camada granular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sinais de áreas necróticas contendo neutrófilos em apoptose. - Infiltração de células T CD4⁺ e CD8⁺. - Infiltração dérmica de células dendríticas infectadas e células de Langerhans. - Produção de IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-10. - Acúmulo de células T.
Fase ulcerada	<ul style="list-style-type: none"> - Morte de queratinócitos por necrose ou apoptose. 	<ul style="list-style-type: none"> - Infiltração proeminente de CD4⁺ e CD8⁺. - Granulomas. - Presença de neutrófilos. - Aumento de células B e plasmócitos. - Regulação positiva de IL-10, TNF-α e IFN-γ. - Células apoptóticas.
Fase de cura	<ul style="list-style-type: none"> - Reepitelização e proliferação de queratinócitos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição gradual de macrófagos e parasitas. - Fibrose. - Células gigantes, granulomas, expressão de IFN-γ, TNF-α, IL-12.
Fase crônica (não houve cura)	<ul style="list-style-type: none"> - Hiperplasia da epiderme 	<ul style="list-style-type: none"> - Número variável de parasitas. - Expressão elevada de IL-10 e IL-4, células T, histiócitos, células gigantes e eosinófilos.

Adaptado de NYLÉN; EIDSMO, 2012, exceto as referências citadas no artigo.

1.5 ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A morfologia ultraestrutural das biópsias de três pacientes com LC permitiu a visualização de parasitas, em vários estágios de degeneração, no citoplasma e vacúolo parasitóforo de macrófagos (SANDBANK, 1976). Posteriormente, em outro estudo foi avaliado o infiltrado inflamatório de pacientes com LC que apresentaram baixa carga parasitária, possibilitando a discussão sobre a influência das alterações morfológicas para a manutenção da inflamação crônica (EL HASSAN; VERESS; KUTTY, 1984). Foi descrita a presença de células fagocíticas, interações entre os linfócitos e macrófagos e, a frequência de plasmócitos na derme

A partir da análise por microscopia óptica e eletrônica foi possível observar as frequências de amastigotas de *L. amazonensis* e de células inflamatórias, avaliando as interações celulares e a cinética de lesões cutâneas em camundongos. Em diferentes fases da doença foi relatado o intenso parasitismo, a frequência de linfócitos e macrófagos ativados e o desenvolvimento de reação granulomatosa e fibrose (POMPEU, 1988). O estudo de diferentes biópsias de um paciente com LCD demonstrou, semelhantemente, a frequência de células inflamatórias, a localização e integridade de amastigotas, sugerindo a ineficiência da resposta imune celular sob a perspectiva da morfologia ultraestrutural (BITENCOURT *et al* 1990).

As publicações que abordam os aspectos ultraestruturais da LC têm contribuído para esclarecer possíveis interações entre as células inflamatórias, além de evidências do comportamento do parasita no tecido durante a doença. Associar referências morfológicas aos aspectos imunopatológicos facilitam a compreensão do contexto da infecção pela *Leishmania spp.* reforçando e atualizando os dados da literatura.

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose cutânea é causada por uma infecção parasitária, principalmente de macrófagos dérmicos, resultando em intensa inflamação e ulceração da pele. Em alguns casos, a lesão pode curar espontaneamente e, mais raramente, a doença cutânea pode evoluir para leishmaniose mucosa (LM), levando ao dano tecidual grave. Devido às limitações para o estudo em tecido de pele humana, foram desenvolvidas pesquisas em modelos animais e análise de sangue periférico. Embora as respostas sistêmicas possam ser bons correlatos de imunidade, a resposta imunitária local da infecção pode diferir do sangue periférico. Neste trabalho, discutimos os diferentes estágios da LC observando o desenvolvimento da doença *in situ* e os possíveis mecanismos envolvidos na patologia e cura de infecção pela *Leishmania braziliensis*.

A histopatologia nas fases iniciais da leishmaniose cutânea foi, também, descrita por Dantas (2012), entretanto a classificação de lesões recentes incluía fragmentos de lesões já ulceradas. No trabalho de Machado *et al.*, (2002) , o escasso número de biópsias impediu uma boa análise dos aspectos histopatológicos de pacientes com LCR. Portanto, há ausência na literatura de estudos da inflamação tecidual das lesões papulares, que são possíveis de serem encontradas mais recentemente em áreas endêmicas.

Sob o ponto de vista ultraestrutural são conhecidos estudos que utilizaram o recurso da microscopia eletrônica de transmissão para descrever casos de infecção por *L. amazonensis* (POMPEU, 1988; BITENCOURT *et al* 1990). Entretanto, assim como uma variedade de espécies pode desencadear manifestações distintas na interação com o hospedeiro, a infecção por *L. braziliensis* pode reproduzir variações no espectro de lesões. Por isso, desenvolvemos um estudo

descritivo utilizando amostras de pele de pacientes com LCR e LCC para identificar o comportamento das células nos diferentes períodos da doença.

É fato que, normalmente, os indivíduos não procuram atendimento médico em estágios iniciais da doença, devido à falta de sintomas ou pela existência de uma lesão inespecífica que pode ser confundida com a de picadura de mosquitos não infectados ou com foliculite. Contudo, o centro de saúde de Corte de Pedra, onde foram coletadas as biópsias deste estudo, é sede do Programa de Controle de Leishmaniose Tegumentar, com mais de 30 anos de pesquisa e atendimento na região endêmica, abrangendo cerca de 20 municípios. Assim, foi difundido o conhecimento na população local sobre a doença, o que tem favorecido cada vez mais a busca pelos serviços do centro de saúde por indivíduos, considerados clinicamente, em fases iniciais da infecção. No Centro de Referência em Leishmaniose são atendidos anualmente cerca de 1200 casos de LC, dos quais 85% (N=1020) são de LCC, 8% (N=96) de LCR, 3% (N= 36) de LD e 4% (48) de LM.

A avaliação diagnóstica rotineira das biópsias de pacientes com LCR e LCC tem exibido diferentes padrões histopatológicos entre si, além dos aspectos clínicos das lesões. Nas biópsias de lesões iniciais tem sido observado um menor infiltrado inflamatório, porém um maior quantitativo de amastigotas de *L. braziliensis* em relação às lesões tardias ulceradas. Com base nessas características, propomos esclarecer a hipótese de que a resposta inflamatória é suficiente para causar a destruição do parasita, mas não evita o dano tecidual que culmina na evolução de uma lesão papulosa para uma úlcera.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever comparativamente os aspectos histopatológicos na Leishmaniose Cutânea Recente (LCR), fase de lesões papuliformes e, na Leishmaniose Cutânea Clássica (LCC), com lesões tardias e ulceradas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar de forma comparativa os aspectos clínicos dos pacientes com lesões papulares e ulceradas.
- Descrever as alterações da epiderme e derme nas biópsias de pele de pacientes com LCR e LCC.
- Mensurar e correlacionar as áreas de inflamação e de necrose das biópsias entre ambos os grupos.
- Imunomarcador e quantificar amastigotas de *L. braziliensis* por imunohistoquímica (IHQ) a partir das secções de pele dos casos de LCR e LCC.
- Identificar e quantificar por IHQ linfócitos TCD3⁺, T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B CD20⁺, macrófagos CD68⁺ e plasmócitos CD138⁺ em ambos os grupos, estabelecendo comparações e correlações.
- Investigar e descrever diferenças ultraestruturais entre fragmentos de pele de pacientes com LCR e LCC por microscopia eletrônica de transmissão.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS GERAIS

Este é um estudo de corte transversal, amostra de conveniência, de caráter investigativo e descritivo, para identificar possíveis marcadores do processo inflamatório comparando-os entre biópsias da lesão de pacientes com LCR e LCC. Foram incluídas 43 biópsias de pacientes atendidos no centro de saúde de Corte de Pedra, no período de 2009 a 2014, sendo 15 casos Leishmaniose Cutânea Recente (LCR) e 28 casos de Leishmaniose Cutânea Clássica (LCC). Em algumas análises houve perda de informações, quando não foi identificado o dado no prontuário ou quando a imunomarcção foi incompatível aos controles na imunohistoquímica. O número amostral é sempre referido nos gráficos, tabelas e nos textos descritivos.

4.2 PACIENTES

Os pacientes foram diagnosticados com leishmaniose cutânea pelos critérios clínicos e laboratoriais. Foram observadas lesões cutâneas sugestivas de LC associadas à IDRMM positiva e presença do parasita em cultura ou através das técnicas de PCR ou IHQ para confirmar a infecção por *L. braziliensis*. As informações clínicas foram obtidas a partir dos prontuários, como dados sobre idade, gênero, local e tamanho da lesão, estimativa do período da lesão fornecida pelo paciente. Foi identificada a presença ou ausência de linfadenopatia e realizado o cálculo do diâmetro da circunferência para aferir o tamanho da lesão e da endureção na IDRMM, assim os

valores referentes a estes dados foram expressos em mm². Acompanhamos os registros referentes ao tratamento e resposta terapêutica em até 90 dias após administração do ciclo de tratamento, além dos resultados da cultura e do PCR.

4.2.1 Critérios de inclusão nos grupos

- a) Lesões papulares ou exulceradas com até 30 dias de evolução, características de leishmaniose cutânea recente (LCR);
- b) Lesões ulceradas com até 120 dias de evolução, típicas de leishmaniose cutânea clássica (LCC);
- c) Intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva; consideradas aquelas com endureção superior ou igual a cinco milímetros (mm) de diâmetro;
- d) Identificação de parasitas por análise histopatológica, PCR e/ou cultura para *L. braziliensis* positivos.

4.2.2 Critérios de não inclusão nos grupos

- a) Pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea com lesões atípicas.
- b) Pacientes grávidas;
- c) Pacientes HIV positivos;
- d) IDRM negativa;
- e) Pacientes com mais de 10 lesões cutâneas;

4.3 BIÓPSIAS

As biópsias foram coletadas utilizando um *punch* de quatro mm mediante anestesia local. Na lesão precoce, o fragmento incluiu o centro da pápula, já nas fases tardias, a biópsia foi realizada na borda da úlcera. Estes fragmentos foram fixados, parte em formol a 10% para posterior processamento no Serviço de Histotecnologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), onde também são realizadas as colorações em HE e Grocott para a análise histopatológica e diagnóstico diferencial, respectivamente, e, parte em fixador em *Karnovsky*, para análise por microscopia eletrônica. O aspirado do local da lesão foi realizado para cultura *in vitro* e um diminuto fragmento foi reservado em *RNA later* para realização da técnica de PCR no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e, posteriormente, os resultados foram anexados nos prontuários dos pacientes.

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

O método imunohistoquímico foi realizado para a caracterização de células envolvidas nas detecções de LC humana. No setor de Histotecnologia da Fiocruz/BA, as biópsias foram processadas, emblocadas e cortadas em micrótomo, formando secções de 3 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro com carga positiva (EasyPath, Brasil) para melhor aderência.

Seguindo o protocolo padronizado para imunohistoquímica, foi realizada a desparafinização, hidratação e recuperação antigênica numa única fase utilizando o Trilogy™ (Cell Marque, USA) diluído 1/100. Utilizamos solução tampão Tris-HCl pH 8,4 com Tween 20 diluído a 0,25% (Sigma, EUA) nas lavagens intercaladas. O bloqueio da peroxidase endógena foi

realizado com peróxido de hidrogênio a 3% com duas trocas em 10 minutos e o bloqueio de proteínas inespecíficas com *Protein Block* (DakoCytomation, EUA) por 20 minutos.

Posteriormente, os anticorpos primários foram diluídos (*Diluent antibody*, DakoCytomation, EUA) e incubado durante 1 hora a 37°C. As respectivas diluições estão descritas na tabela 2. A reação antígeno-anticorpo específico foi detectada com o sistema de biotina-estreptavidina-peroxidase (kit KP500 - *Peroxidase Mouse & Rabbit*, da DBS). Na revelação foi utilizada 3-3 diaminobenzidina (DAB) (Spring Bioscience, Canadá) como substrato cromógeno. O procedimento foi interrompido por lavagens com água destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de *Harris*, desidratados em álcool, clarificados em xilol e montados com lamínulas e bálsamo do Canadá.

Em todas as reações selecionamos uma lâmina previamente padronizada para o controle positivo e uma secção sem incubação do anticorpo primário para o controle negativo.

Tabela 2. Relação anticorpos primários e respectivas diluições.

Anticorpo	Especificidade	Fabricante	Diluição (µl)
Monoclonal anti-CD3	Linfócitos T CD3 ⁺	Dako	1/100
Monoclonal anti-CD4	Linfócitos T CD4 ⁺	Dako	1/50
Monoclonal anti-CD8	Linfócitos T CD8 ⁺	Cell Marque	1/100
Monoclonal anti-CD20	Linfócitos B CD20 ⁺	Dako	1/400
Monoclonal anti-CD68	Macrófagos CD68 ⁺	Dako	1/200
Monoclonal anti-CD138	Plasmócitos CD138 ⁺	Dako	1/50
Policlonal anti- <i>L. braziliensis</i>	Amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	<i>In house</i> (CPqGM-Fiocruz-BA)	1/1000

4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUALITATIVA

A caracterização dos aspectos histopatológicos da epiderme e derme foi realizada a partir da observação das lâminas coradas pela HE. Casos de LCR e LCC foram analisados randomicamente, sem conhecimento prévio, sendo selecionada apenas uma secção de cada lâmina. Na epiderme foram avaliadas a ausência ou presença de acantose, exocitose, espongiose e hiperqueratose e, na derme, presença de células gigantes, granulomas, fibrose, neutrófilos e vasculite. A descrição qualitativa elaborada pelo patologista foi acompanhada por um segundo observador que registrou os dados em uma planilha.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUANTITATIVA

O método para quantificação de células teve por base a histomorfometria de RODRIGUES DE SANTANA *et al*, 2014. Foi utilizado o microscópio óptico (Olympus BX51) com sistema de câmera digital acoplada (Olympus Q5) e software de imagens (Image-Pro Plus, Media Cybernetics) para a fotomicrografia das lâminas. Foram fotografados 10 campos randomizados de cada secção imunomarcada com os respectivos anticorpos. Em cada campo foi quantificado o número de células positivas utilizando o recurso de contagem semi-automática do software da ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA), conforme exemplificado na figura 1. A positividade foi definida com a identificação de células que reagiram com o substrato cromógeno. Foi utilizada a objetiva de 100x para contagem de amastigotas de *L. braziliensis* e a de 40x para análise das células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ e CD68⁺ e CD138⁺.

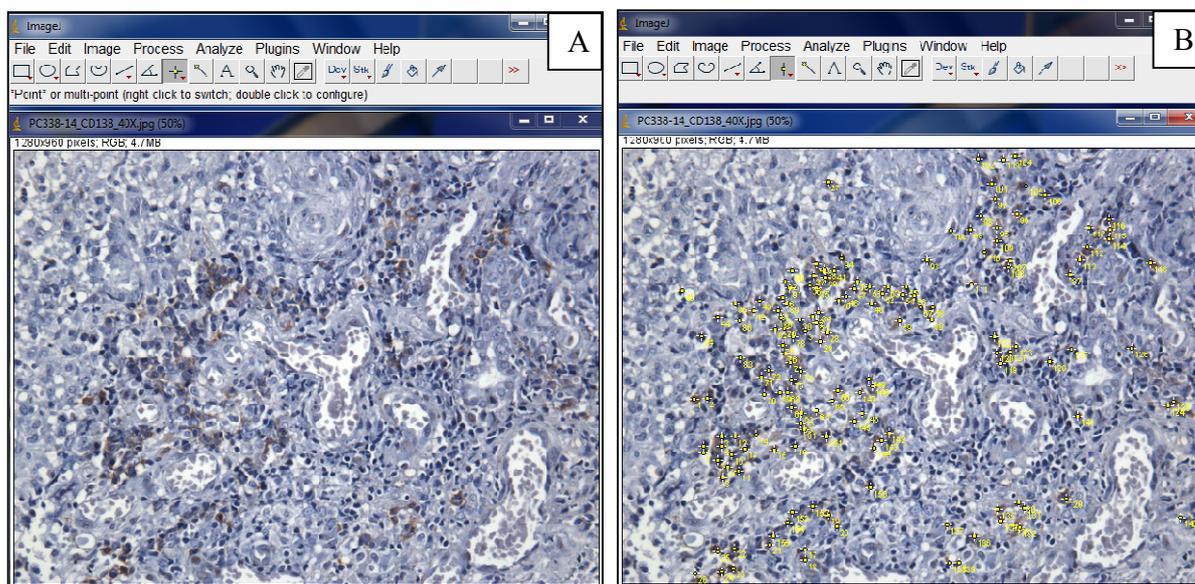


Figura 1. Exemplo da análise morfométrica em corte histológico de LCC após imunomarcagem do CD138. (A) Visualização das células imunomarcadas. (B) Seleção e quantificação das células positivas.

4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DE INFLAMAÇÃO E NECROSE

Todas as secções coradas em HE foram escaneadas por microscópio óptico (Olympus BX51) nas objetivas de 10x a 40x. As imagens das secções foram registradas no aumento digital de 0,7x, mediante visualização utilizando o software OlyVIA 2.7 (Olympus Corporation, 2013). A análise semi-automática foi realizada com o auxílio do software da ImageJ 1.48v, conforme exemplificado na figura 2.

Foram realizadas as medidas da área total do corte histológico e, em seguida, selecionadas as áreas de infiltrado inflamatório na derme. A extensão total do fragmento e o somatório das áreas de inflamação foram apresentados em milímetros quadrados (mm^2). Desta maneira, foi possível mensurar a proporção em porcentagem (%) da inflamação por área total do fragmento.

Método semelhante foi utilizado para atribuir valores às áreas de necrose, quando presentes na biópsia. Todavia, como não foi possível visualizar essas áreas com precisão em pequenos aumentos, o registro das imagens foi feito com o aumento digital de 7x. Assim, foi possível percorrer toda a secção e identificar as áreas de necrose. Posteriormente, foram realizados cálculos para equiparar os valores originados de aumentos diferentes e estabelecer a proporção entre a extensão da necrose sobre a área total.

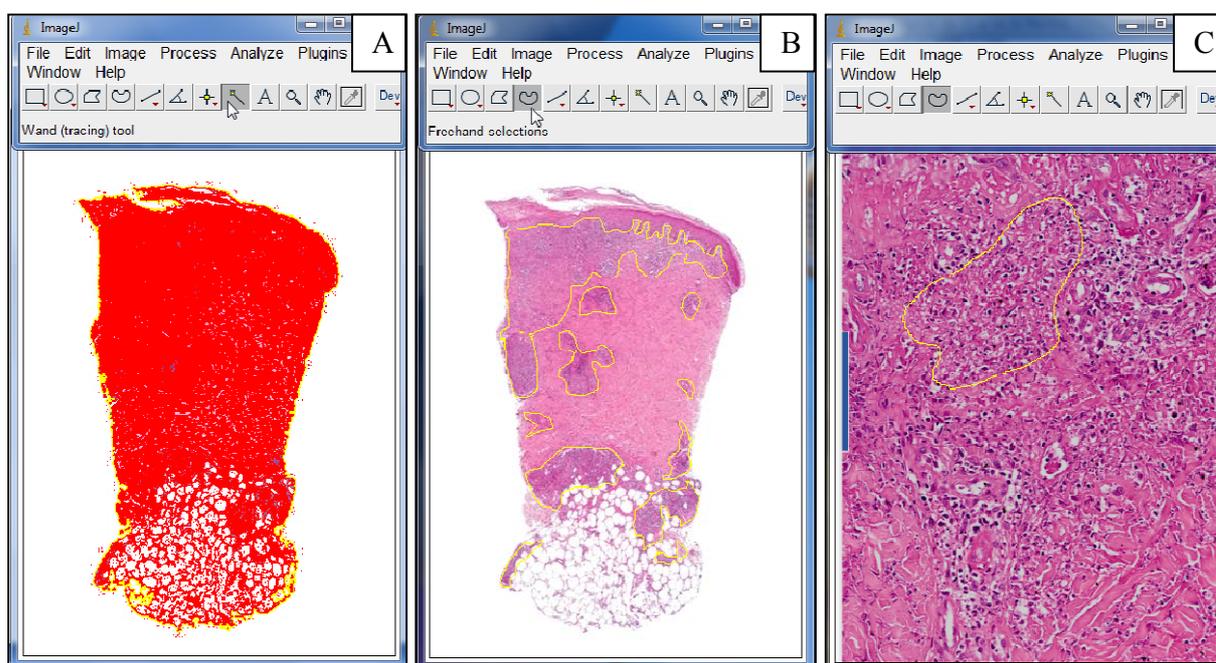


Figura 2. Exemplificação da análise morfométrica em corte histológico de LCR. (A) Medida da extensão total do fragmento. (B) Seleção da área de infiltrado inflamatório. (C) Seleção da área de necrose.

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para as análises ultraestruturais foram selecionadas quatro amostras, duas de LCR e duas de LCC. Dada as limitações relacionadas à execução dessas análises, somente parte das amostras foi incluída.

Os fragmentos de pele foram fixados em *Karnovsky* e encaminhados para a Plataforma de Microscopia Eletrônica do CPqGM, Fiocruz/Ba. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio pH 7.4, 0.1 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Em seguida, foi realizada a desidratação através de banhos sucessivos de 10 minutos cada com solução de acetona em concentrações crescentes. A etapa de substituição foi realizada com um banho de resina e acetona 1/2 e, depois, realizada a montagem em moldes com resina que permaneceram por 72h em uma estufa a 60°C. Desta forma, foi possível a polimerização da resina e a formação dos blocos.

No ultramicrotomo, foram confeccionados cortes semifinos de 1000 nanômetros (nm) para visualização prévia do tecido em microscópio óptico e reconhecimento da epiderme e derme. Foi demarcada a derme como a área de interesse, na qual é observado um maior espectro de alterações, observando-se a área de maior infiltrado de células e pouco colágeno. Em seguida, os cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram coletados em grades de 200 *meshs* e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para facilitar a visualização de estruturas a partir dos gradientes de eletrodensidade. Todo o corte foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM109 e JEOL 1230) e as fotomicrografias foram registradas, para avaliação qualitativa e identificação morfológica de células inflamatórias e amastigotas.

Para identificação das amastigotas seguimos o protocolo previamente descrito por POMPEU, 1988 e VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002, definida basicamente

como células ovais, de cerca de 2x4 micrômetros (μm), com uma camada de microtúbulos subpeliculares e um cinetoplasto, constituído por uma mitocôndria única. Embora não tenhamos encontrado parasitas degenerados ou destruídos, utilizamos os critérios descritos anteriormente *apud* BITTENCOURT *et al.* (1990). O reconhecimento de células das camadas da pele e do infiltrado inflamatório foi fundamentado nos parâmetros de PAVELKA; ROTH, 2005.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados em tabelas e gráficos onde os números representem valores absolutos ou proporções. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Para variáveis com distribuição normal, utilizamos o teste Two-way ANOVA. Para distribuição não-normal, o teste não paramétrico Mann Whitney. Para as correlações com variáveis de distribuição normal e não-normal, utilizamos os testes de Pearson e Spearman, respectivamente. Consideramos a classificação de DANCEY e REIDY (2005) que indicam a força da correlação quando: $r = 0,10$ até $0,30$ (fraco); $r = 0,40$ até $0,60$ (moderado); $r = 0,70$ até $1,0$ (forte). Para comparação de frequências entre variáveis em amostras independentes, foi realizado o teste do Qui-quadrado, exato de Fischer e t de student. Os resultados foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes participaram da pesquisa de forma voluntária, sendo aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto intitulado de “Avaliação da resposta inflamatória *in situ* na Leishmaniose Cutânea Recente” obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia, parecer nº 533.032/2014.

4.11 DESENHO EXPERIMENTAL

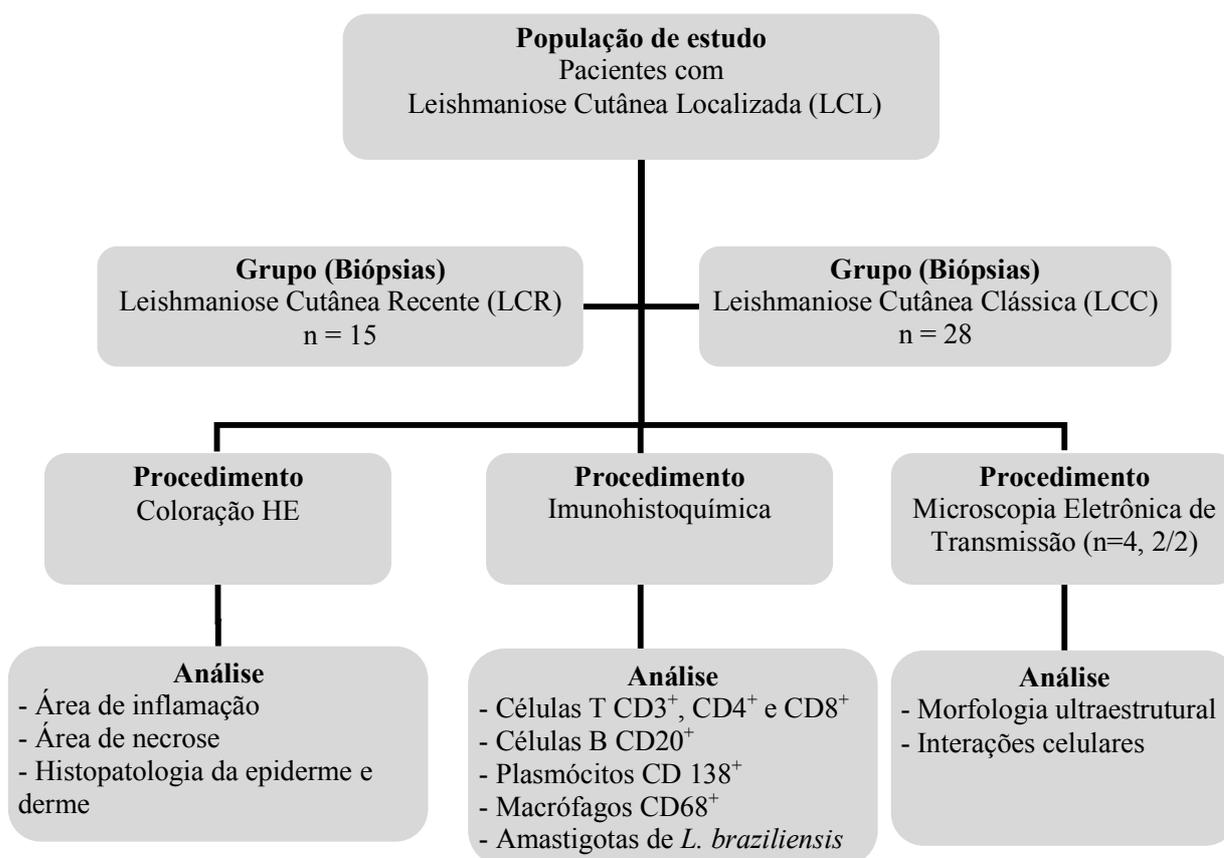


Figura 3. Fluxograma de biópsias e métodos.

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS CLÍNICOS

Um total de 43 pacientes foi incluído no estudo, sendo coletadas para análise 15 biópsias de LCR e 28 de LCC. As características sócio-demográficas e clínicas dos indivíduos, estratificadas de acordo com o estágio da doença, estão descritas na tabela 3. A distribuição etária foi semelhante entre os grupos, com a média (de idade) \pm erro padrão (EP) de $36,9 \pm 3,0$ anos na LCR e $39,3 \pm 2,9$ na LCC. Proporcionalmente, indivíduos do sexo masculino foram mais acometidos pela doença, sendo 66,7% e 78,6% dos homens dos respectivos grupos LCR e LCC.

A maioria das lesões foi encontrada nos membros inferiores, sendo 86,7% na LCR e 85,7% na LCC. Foram menos frequentes lesões nos membros superiores e raras em outras regiões do corpo, como a face. A linfadenopatia estava presente em quase todos os pacientes com LCR (93,3%) e em 63,0% daqueles com lesões ulceradas, com exceção de um paciente. Não foram registradas nos prontuários as medidas da IDRM de um paciente com LCR e de três com LCC, contudo, observamos que houve diferença estatística entre os grupos, onde na LCR a média \pm EP das endurações foi de $129,5 \pm 15,4$ e de $196,9 \pm 22,8$ na LCC.

O tamanho das lesões papulares, com uma média \pm EP de $52,1 \pm 11,1$ mm² (com uma perda) e das úlceras, com $351,9 \pm 58,1$, apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Tal como o tempo de lesão relatado pelos pacientes que foi de $17,4 \pm 1,6$ dias das lesões recentes e $40,6 \pm 4,4$ dias da ulcerada. Foi possível acompanhar o tratamento de 14 pacientes com LCR e 21 com LCC. As maiores taxas de falha terapêutica compreenderam os pacientes tratados no início da doença, representando 71,4% de falha contra 47,6% dos tratados após ulceração.

Tabela 3. Dados sócio-demográficos e clínicos de pacientes diagnosticados com LCR e LCC.

Parâmetros	LCR (n=15)	LCC (n=28)	<i>p</i>
Idade (anos)*	36,9 ± 3,0	39,3 ± 2,9	ns ^a
Gênero - n (%)			ns ^b
Feminino	5 (33,3)	6 (21,4)	
Masculino	10 (66,7)	22 (78,6)	
Local da lesão - n (%)			ns ^c
Membros inferiores	13 (86,7)	24 (85,7)	
Membros superiores	1 (6,7)	3 (10,7)	
Outros	1 (6,6)	1 (3,6)	
Linfadenopatia - n (%) ♦			ns ^c
Sim	14 (93,3)	17 (63,0)	
Não	1 (6,7)	10 (37,0)	
IDRM (mm²)* ♠	129,5 ± 15,4	196,9 ± 22,8	<0,05 ^a
Tamanho da lesão (mm²)* ■	52,1 ± 11,1	351,9 ± 58,1	<0,0001 ^a
Tempo da lesão (dias)*	17,4 ± 1,6	40,6 ± 4,4	<0,0001 ^a
Resposta terapêutica - n (%) ▲			ns ^b
Cura	4 (28,6)	11 (52,4)	
Falha	10 (71,4)	10 (47,6)	

NOTA: *Média ± EP (Erro padrão); ns: não significante. Teste estatístico: ^at de student; ^b Qui-quadrado; ^cExato de Fisher. ♦: com exceção de um paciente na LCC. ♠: com exceção de dois pacientes na LCR e de três na LCC; ■: com exceção de um paciente na LCR. ▲: com exceção de um paciente na LCR e de sete na LCC. Leishmaniose Cutânea Recente (LCR); Leishmaniose Cutânea Clássica (LCC).

A comparação entre as lesões cutâneas dos pacientes evidenciou os distintos padrões morfológicos de uma pápula e úlcera, ambas causadas pela infecção pela *L. braziliensis* (Figura 4AB). A discrepância entre o tamanho das lesões nos diferentes períodos da doença está representada na figura 4C.

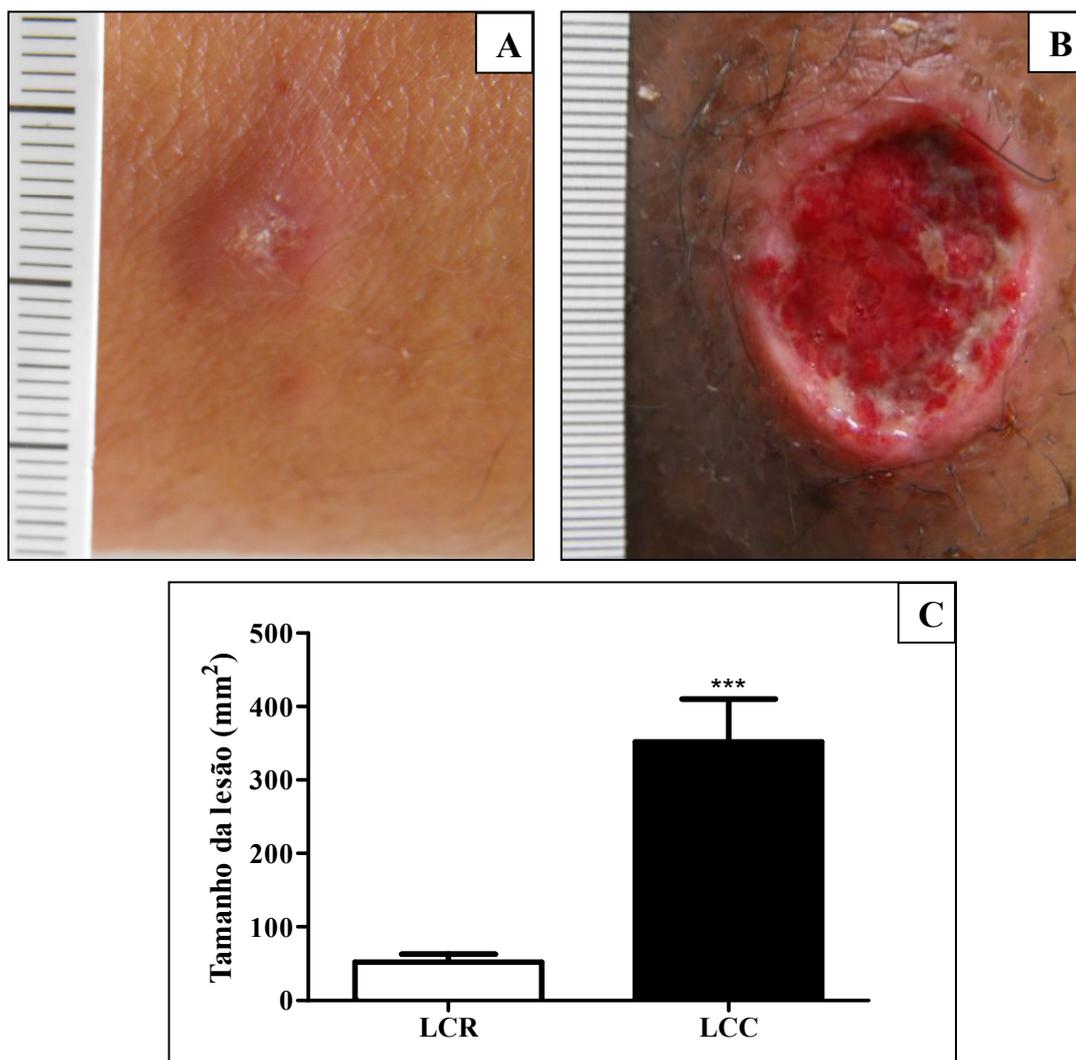


Figura 4. (A) Fotografia da lesão papular em LCR comparada à (B) lesão ulcerada de LCC causadas pela *L. braziliensis*. (C) Comparação entre os tamanhos das lesões cutâneas (mm²) em LCR (n=14) e LCC (n=28). As barras representam a média e o erro padrão. Teste estatístico t-student. *** p<0,0001. Leishmaniose Cutânea Recente (LCR); Leishmaniose Cutânea Clássica (LCC).

5.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

5.2.1 Alterações na epiderme e derme

Estratificamos a avaliação histopatológica conforme as alterações presentes nas camadas da pele. Na epiderme, o seu espessamento (acantose), a formação de edemas (espongiose), a infiltração de células inflamatórias (exocitose) e o processo de queratinização (hiperceratose) foram observados nas biópsias de ambos os grupos (Figura 5). Essas alterações na epiderme foram muito frequentes, não apresentando diferença estatística entre os grupos de LCR e LCC (Tabela 4).

Na derme, identificamos por coloração de rotina (HE) a formação de células gigantes e granulomas, o surgimento de áreas de fibrose, além da presença de neutrófilos e vasculite no tecido (Figura 6). A partir destes parâmetros observamos diferenças mais acentuadas entre os grupos, principalmente, quando comparamos a frequência de células gigantes, em 6,7% dos casos de LCR e em 39,3% na LCC. A frequência de neutrófilos também foi maior nas fases mais tardias da doença, em 26,7% na LCR e 60,7 na LCC. Acompanhamos um padrão de alterações na derme mais predominante na LCC, com exceção da vasculite, que foi mais frequente nas lesões papulares (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência das alterações histopatológicas na epiderme e derme nos casos de LCR e LCC.

Alterações histológicas	LCR (n=15)	LCC (n=28)	p
Epiderme - n (%)			
Acantose	14 (93,3)	28 (100)	ns
Espongiose	10 (66,7)	18 (64,3)	ns
Exocitose	11 (73,3)	19 (67,9)	ns
Hiperkeratose	12 (80,0)	22 (78,6)	ns
Derme – n (%)			
Células gigantes	1 (6,7)	11 (39,3)	<0,05
Granulomas	8 (53,3)	18 (64,3)	ns
Fibrose	7 (46,7)	20 (71,4)	ns
Neutrófilos	4 (26,7)	17 (60,7)	<0,05
Vasculite	11 (73,3)	15 (53,6)	ns

NOTA: Leishmaniose Cutânea Recente (LCR); Leishmaniose Cutânea Clássica (LCC). Teste estatístico Qui-quadrado de Pearson. ns = não significativo.

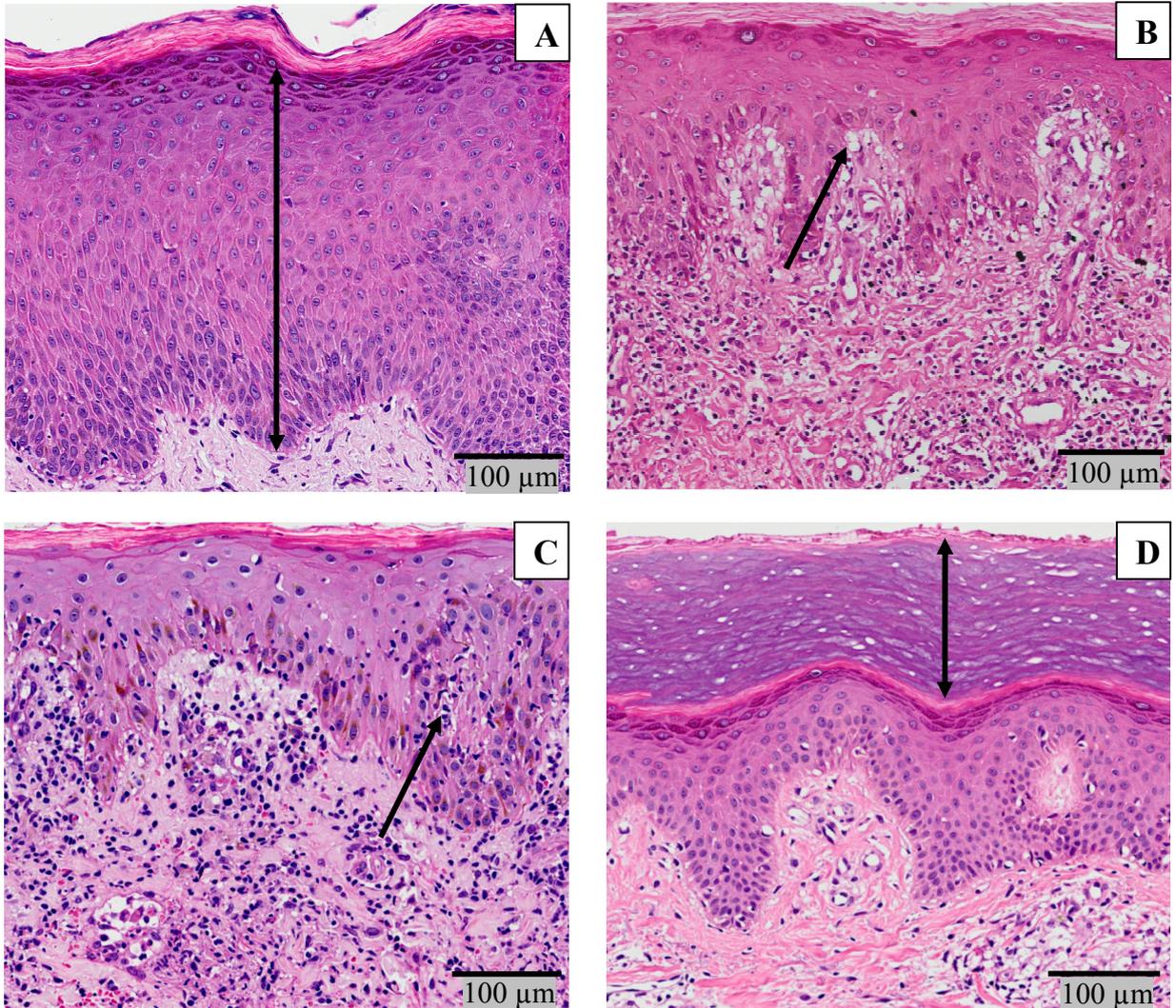


Figura 5. Características histopatológicas observadas na epiderme de pacientes com LCR e LCC. (A) Acanthose na LCR (seta) (10x); (B) espongiose na LCR (seta) (10x); (C) exocitose na LCR (seta) (10x); (D) hiperkeratose na LCR (seta) (10x).

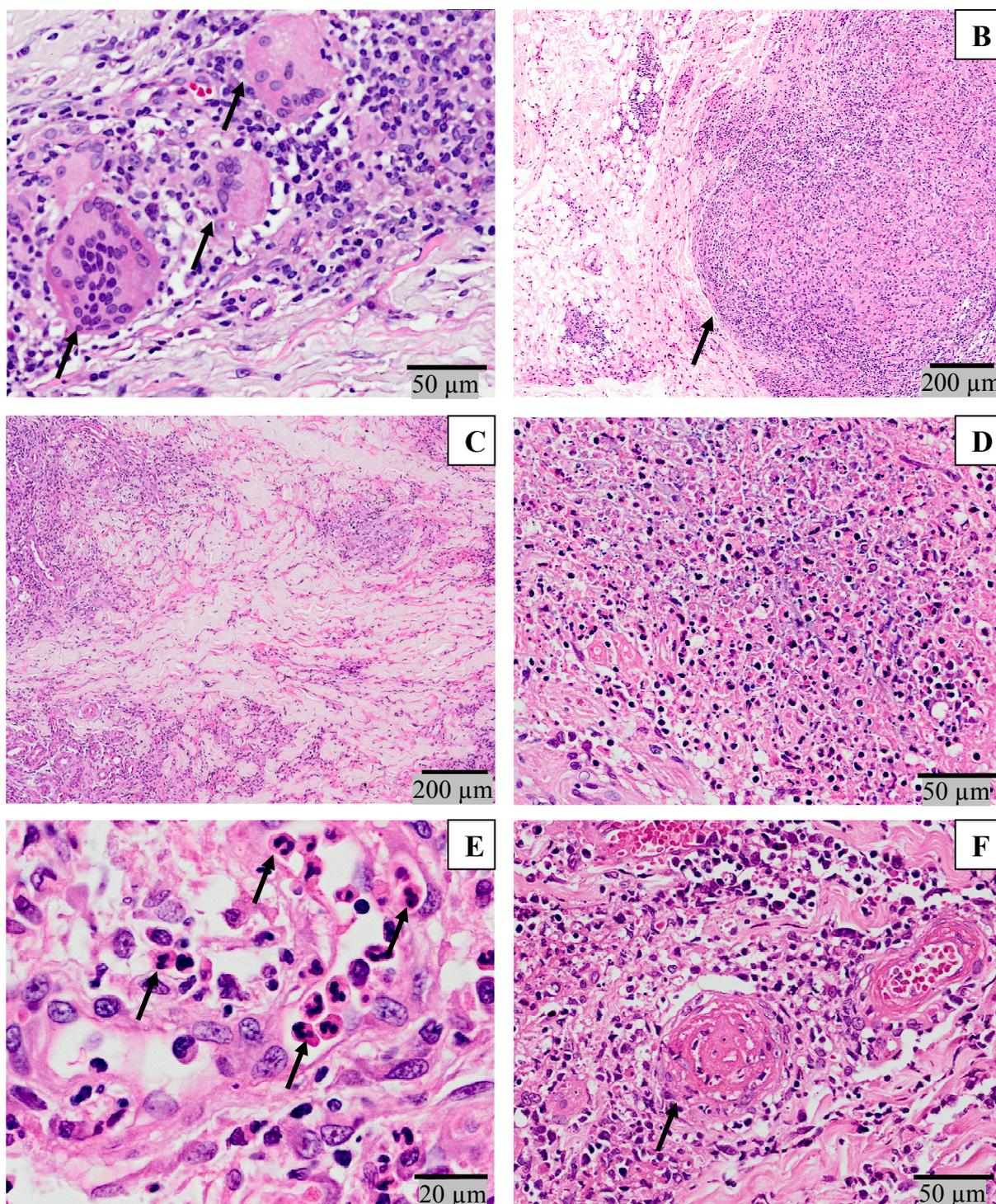


Figura 6. Aspectos histopatológicos presentes na derme de pacientes com LCR e LCC. (A) Células gigantes na LCC (setas) (20x); (B) granuloma na LCR (seta) (4x); (C) fibrose na LCC (4x) (D) necrose na LCC (20x); (E) neutrófilos na LCC (setas) (40x); (F) vasculite na LCC (seta) (20x).

5.2.2 Áreas de inflamação e necrose

As secções histológicas das biópsias de LCR e LCC foram analisadas e ambos os grupos estão representados na figura 7. De modo geral, as lesões de LCR apresentaram um aspecto mais semelhante à pele normal, onde o colágeno dérmico mostrou menores áreas de degradação (Figura 7A). Porém, nota-se mais acentuado o acúmulo de células inflamatórias na LCC (Figura 7B).

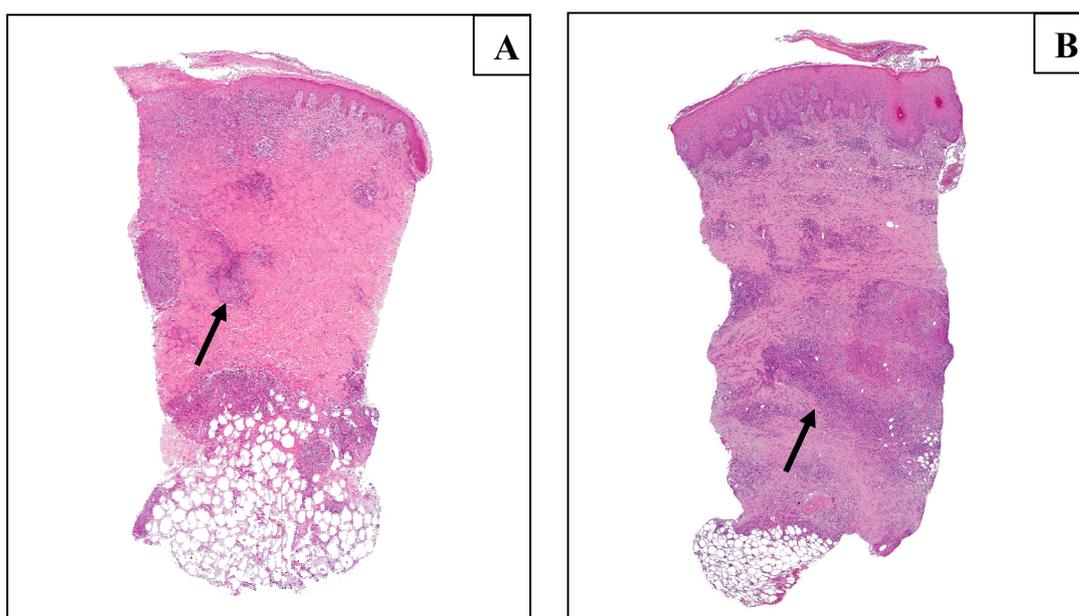


Figura 7. Fotomicrografias das secções de pele de pacientes com leishmaniose cutânea. (A) Biópsia do centro da lesão papular da LCR. (B) Fragmento da borda da úlcera da LCC. Intenso infiltrado inflamatório em LCC comparado com LCR (A e B, setas).

Foi constatado que, proporcionalmente, a área de inflamação correspondeu a (média \pm EP) de $28,4\% \pm 4,2$ e $48\% \pm 3,8$ das secções de LCR e LCC, respectivamente, havendo uma diferença estatisticamente significante (Figura 8A). Quanto às áreas de necrose, observamos que

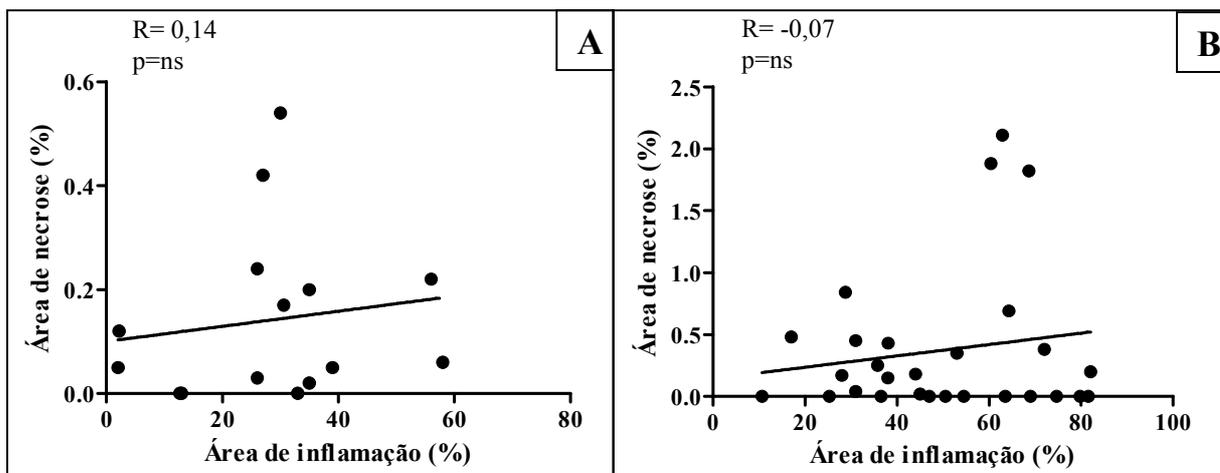


Figura 9. Correlação entre as áreas de inflamação e de necrose (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Pearson.

5.3 ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

5.3.1 Amastigotas de *L. braziliensis*

A detecção tecidual de amastigotas utilizando anticorpo anti-*L. braziliensis* facilitou a busca e contagem do parasita, confirmando o que já havia sido observado em HE durante o diagnóstico da doença de que o parasitismo é mais intenso nas lesões recentes (Figura 10AB). Foi possível identificar amastigotas por IHQ em 90,6% dos casos, enquanto que foram detectadas apenas 11% por cultivo *in vitro* e 62% por PCR. O número de parasitas por 10 campos aleatórios em microscópio óptico foi de (média ± EP) 150,1 ± 56,6 na LCR e de apenas 21,3 ± 8,0 na LCC (Figura 10C). As formas amastigotas foram observadas, principalmente, dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos, na região superior da derme adjacente a epiderme e também em áreas de necrose. Não foram encontradas correlações entre o número de amastigotas e as áreas de inflamação e de necrose (dados complementares).

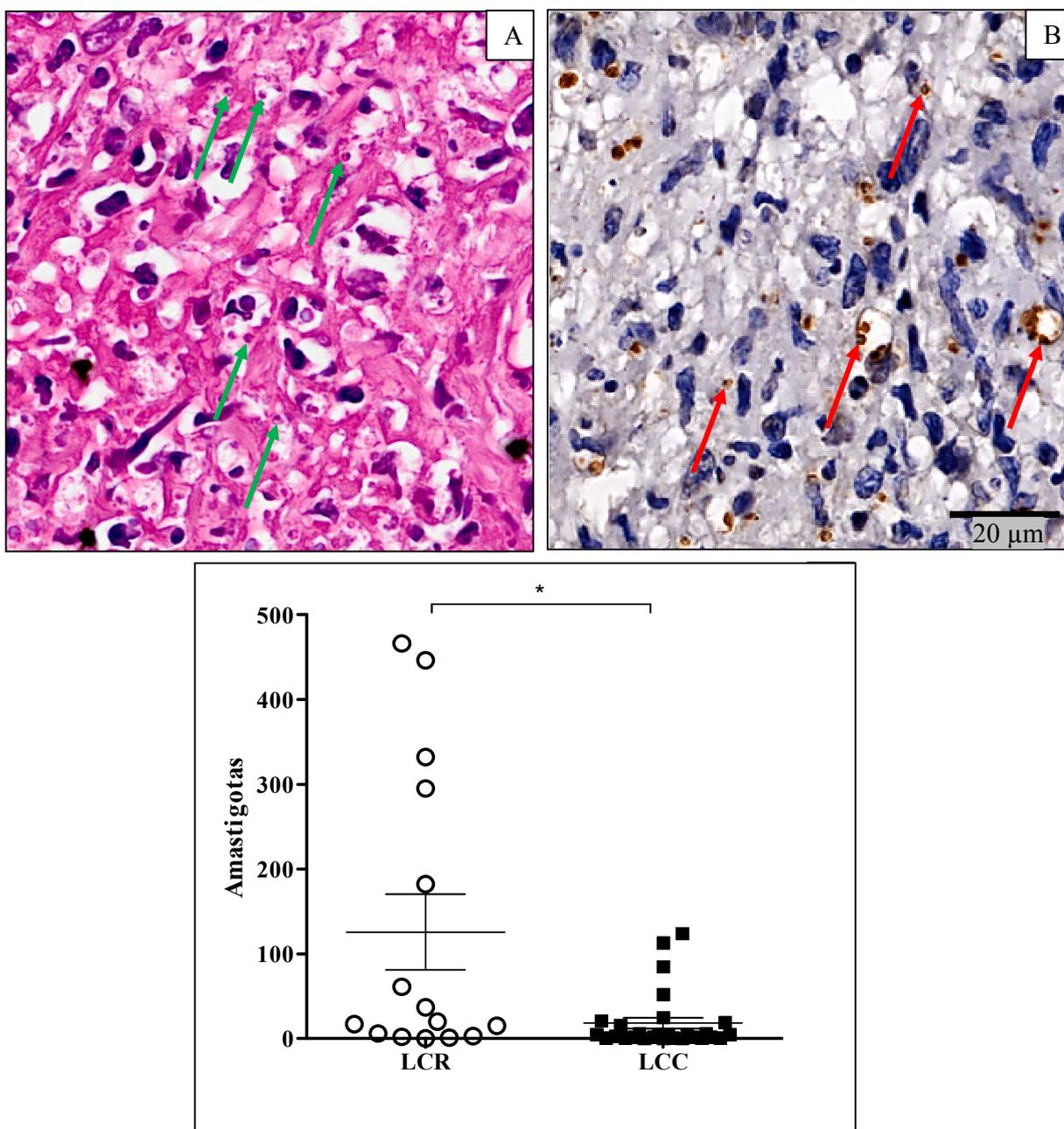


Figura 10. Amastigotas de *L. braziliensis* (A) em HE (40x) (setas verdes) e (B) imunomarcadas com anticorpo policlonal antileishmania (setas vermelhas) (40x) em casos de LCR. (C) Número de amastigotas de *L. braziliensis* por 10 campos randomizados das secções de LCR (n=15) e LCC (n=28). * $p < 0,01$. As barras representam a média e o erro padrão. Teste estatístico t de student.

5.3.2 Perfil celular inflamatório

A resposta inflamatória em ambos os grupos foi caracterizada pelo predomínio linfocitário e macrofágico. Macrófagos CD68⁺ foram observados infiltrando toda a extensão das camadas da pele, desde a epiderme até a hipoderme, também, em áreas de necrose, próximos a vasos necróticos e neoformados e, junto aos linfócitos. Da mesma forma, os linfócitos T CD3⁺ estavam distribuídos em todo o tecido, correspondendo aos subtipos CD4⁺ e CD8⁺ que estavam presentes a partir da junção derme-epiderme e com frequência em granulomas. Os linfócitos B CD20⁺ predominaram na porção intermediária da derme, tal como os plasmócitos CD138⁺ que foram registrados próximos aos vasos, filetes de nervos, folículos pilosos e glândulas. As reações de imunoperoxidase realizadas para identificar e localizar os linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ estão representadas na figura 11, já os linfócitos B CD20⁺, macrófagos CD68⁺ e plasmócitos CD138⁺ estão representados na figura 12.

Não foi observada uma diferença estatística dos casos de LCC sobre os de LCR entre os mesmos tipos celulares, exceto pela crescente quantidade dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no decorrer da doença. Os macrófagos CD68⁺ e linfócitos T CD3⁺ destacaram-se entre as células inflamatórias e, com menos frequência os plasmócitos CD138⁺ e os linfócitos B CD20⁺ (Figura 13).

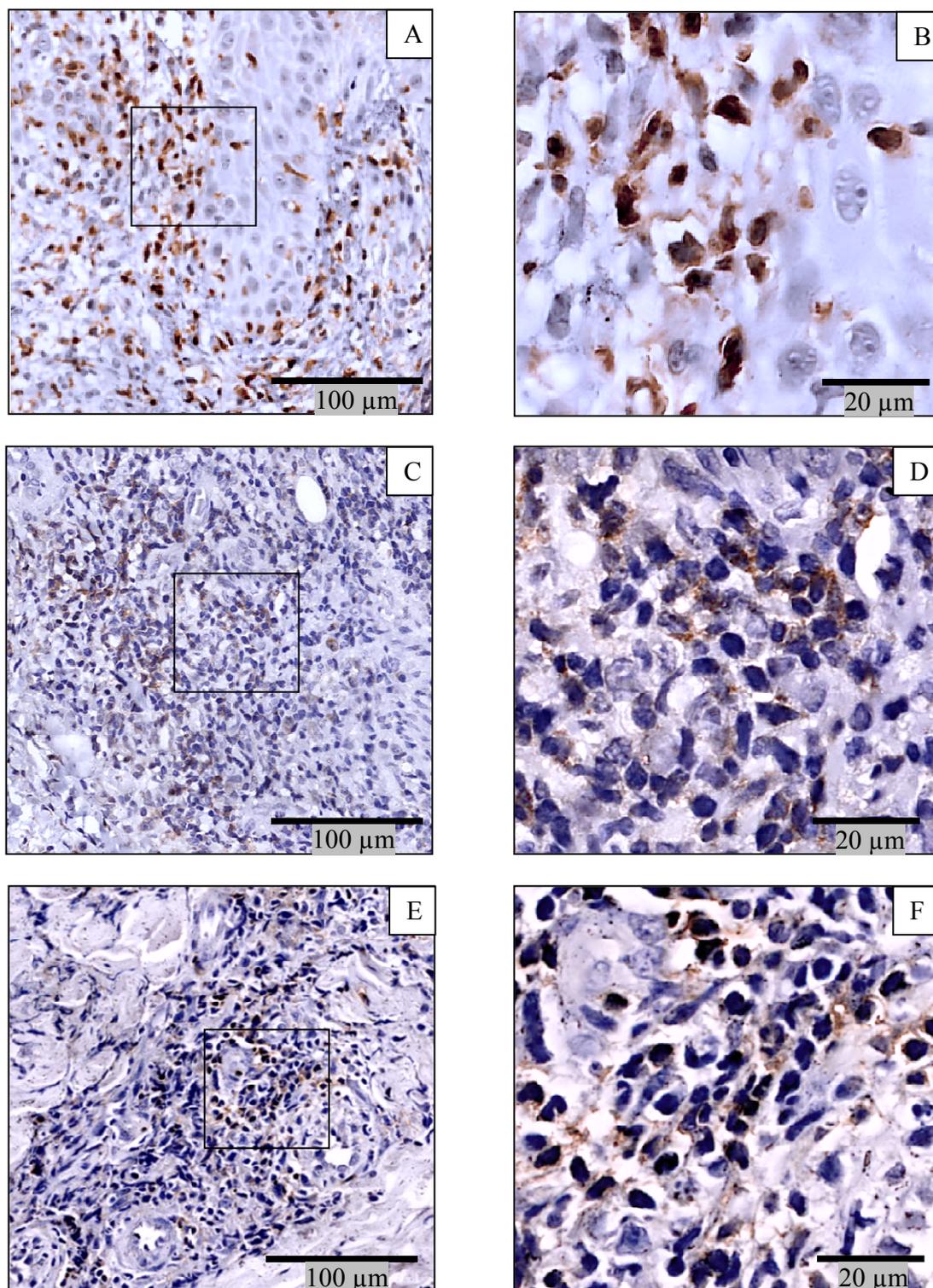


Figura 11. Fotomicrografias da imunomarcações de linfócitos T. (A) Linfócitos T CD3⁺ infiltrados na epiderme (10x). (B) Imunomarcação anti-CD3 em detalhe (40x). (C) Linfócitos T CD4⁺ infiltrados na derme (10x). (D) Imunomarcação anti-CD4 em detalhe (40x). (E) Linfócitos CD8⁺ próximos a vasos (10x). (F) Imunomarcação anti-CD8 em detalhe (40x).

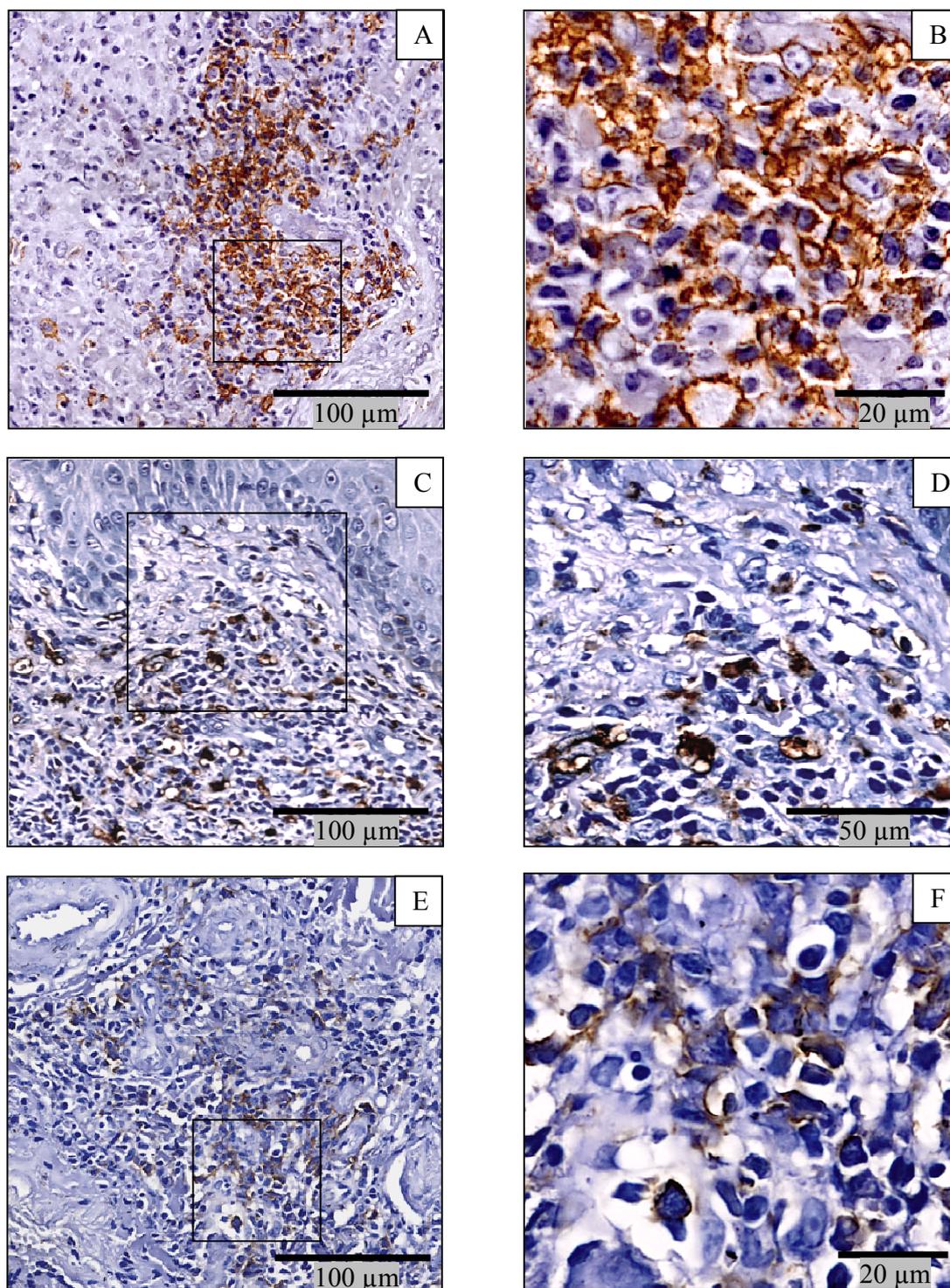


Figura 12. Fotomicrografias da imunomarcações de linfócitos B, macrófagos e plasmócitos. (A) Linfócitos B CD20⁺ infiltrados na derme (10x). (B) Imunomarcação anti-CD20 em detalhe (40x). (C) Macrófagos CD68⁺ próximos a epiderme (10x). (D) Imunomarcação anti-CD68 em detalhe (40x). (E) Plasmócitos CD138⁺ próximos a vasos (10x). (F) Imunomarcação anti-CD138 em detalhe (40x).

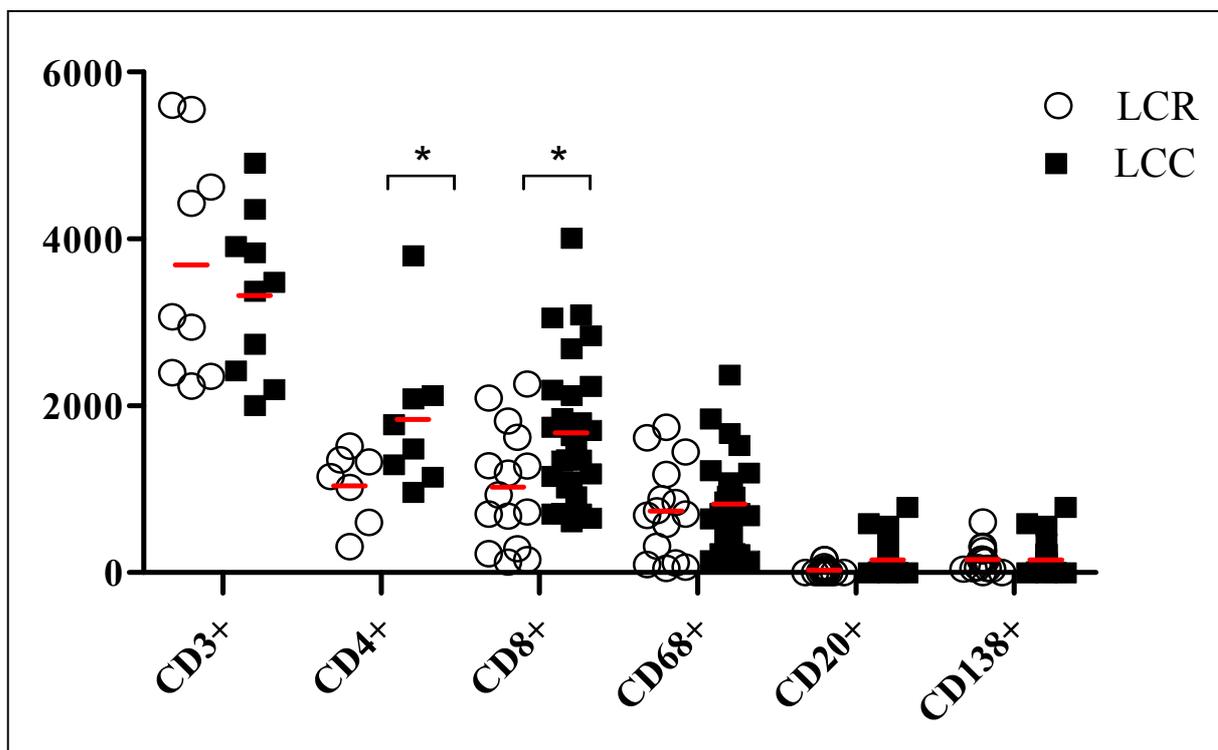


Figura 13. Perfil celular do infiltrado inflamatório na LCR e LCC. As barras representam a média do número de células em 10 campos aleatórios.* $p < 0,05$. Teste estatístico t student, pós teste Two-way ANOVA.

5.4 CORRELAÇÕES ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS

Quando comparados o número de macrófagos CD68⁺ e o tamanho das lesões, essa correlação foi positiva apenas nas lesões recentes, não havendo valores estatisticamente significantes para com as lesões ulceradas. O teste de Spearman informa que há uma possibilidade de 53% para que ocorra o aumento da lesão à medida que aumenta o número de macrófagos CD68⁺ nas fases iniciais da doença (Figura 14).

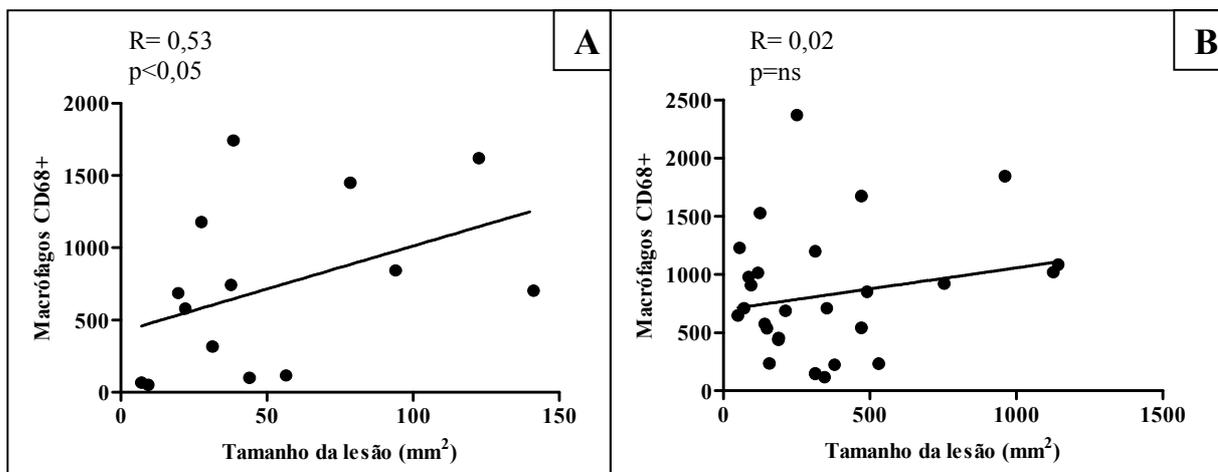


Figura 14. Correlação entre o número de macrófagos CD68⁺ e o tamanho da lesão (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Spearman.

Embora o número de macrófagos CD68⁺ tenha sido expressivo em ambos os grupos, não houve diferença estatística que permitisse afirmar que estas células influenciam diretamente no aumento da área de inflamação (Figura 15). Entretanto, entre a área de necrose e os macrófagos CD68⁺ existiu uma correlação positiva moderada tanto na LCR quanto na LCC (Figura 16).

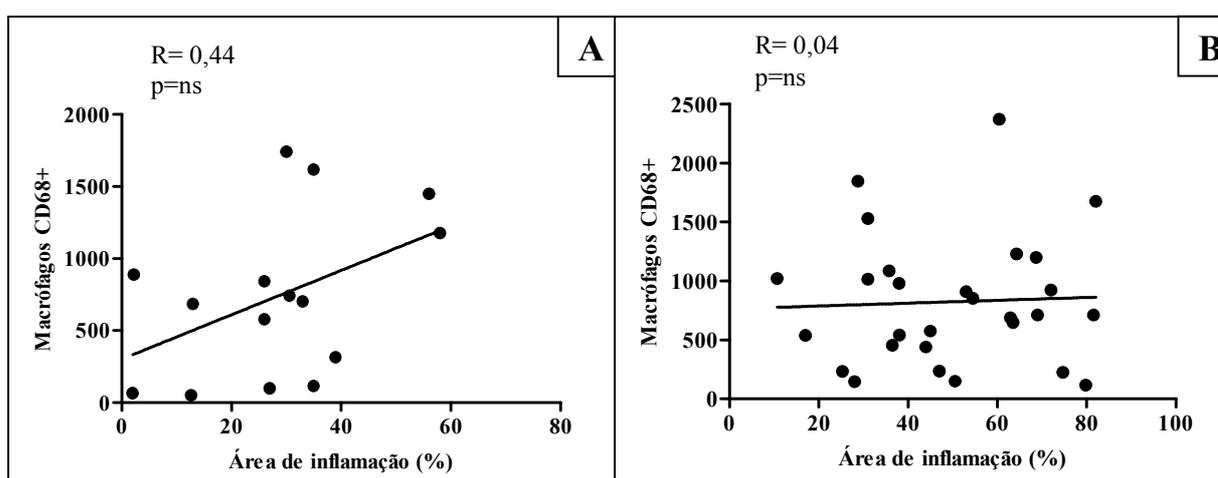


Figura 15. Correlação entre o número de macrófagos CD68⁺ e a área de inflamação (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Pearson.

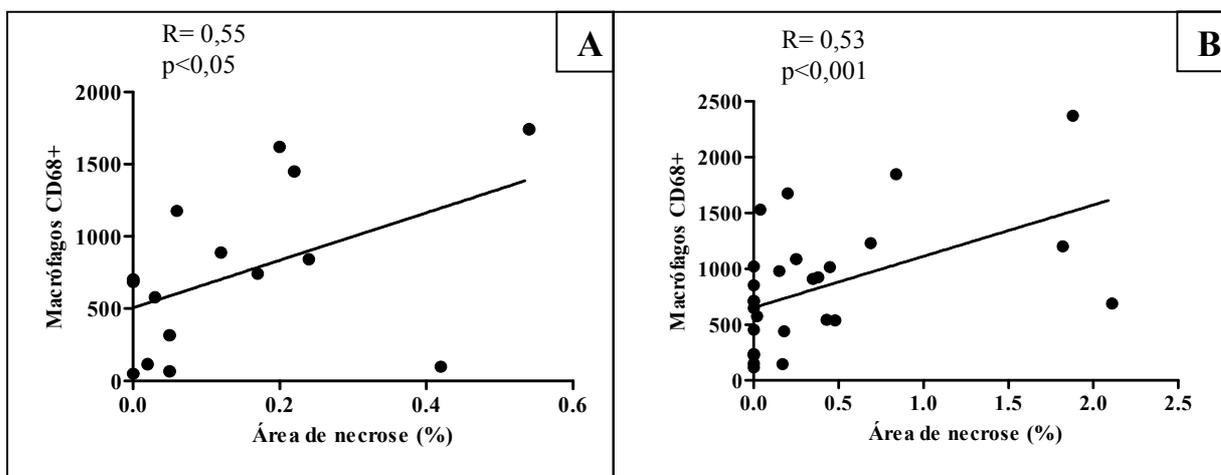


Figura 16. Correlação entre o número de macrófagos CD68⁺ e a área de necrose (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Spearman.

Nas fases iniciais da doença não foi constatada nenhuma influência entre o número de macrófagos e amastigotas de *L. braziliensis*. Todavia, mesmo com o número mínimo de parasitas nas lesões ulceradas, foi possível identificar uma correlação moderada entre estes dois parâmetros nesta fase da doença (Figura 17). Não houve relação entre o parasitismo e as áreas de inflamação e de necrose nem influência destes três parâmetros no tamanho da lesão (dados complementares).

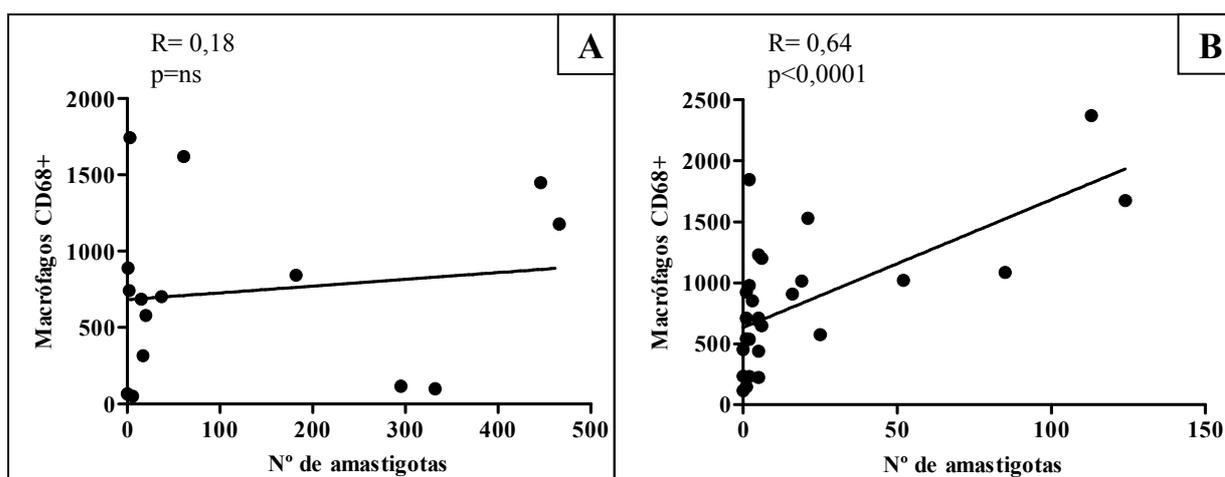


Figura 17. Correlação entre o número de macrófagos CD68⁺ e de amastigotas (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Spearman.

Os linfócitos T CD3⁺ estão fortemente correlacionados à área de inflamação durante as fases iniciais da doença estabelecendo-se um coeficiente de correlação de 71% entre estas características na LCR. O mesmo não ocorreu nas lesões ulceradas, não sendo observado nenhum tipo de correlação nesta fase (Figura 18). Semelhantemente, nenhum valor estatisticamente significativo foi encontrado quando os linfócitos foram relacionados à área de necrose, à carga parasitária e ao tamanho da lesão. Dentre os subtipos CD4⁺ e CD8⁺ também não foi constatada correlação entre os parâmetros avaliados (dados complementares).

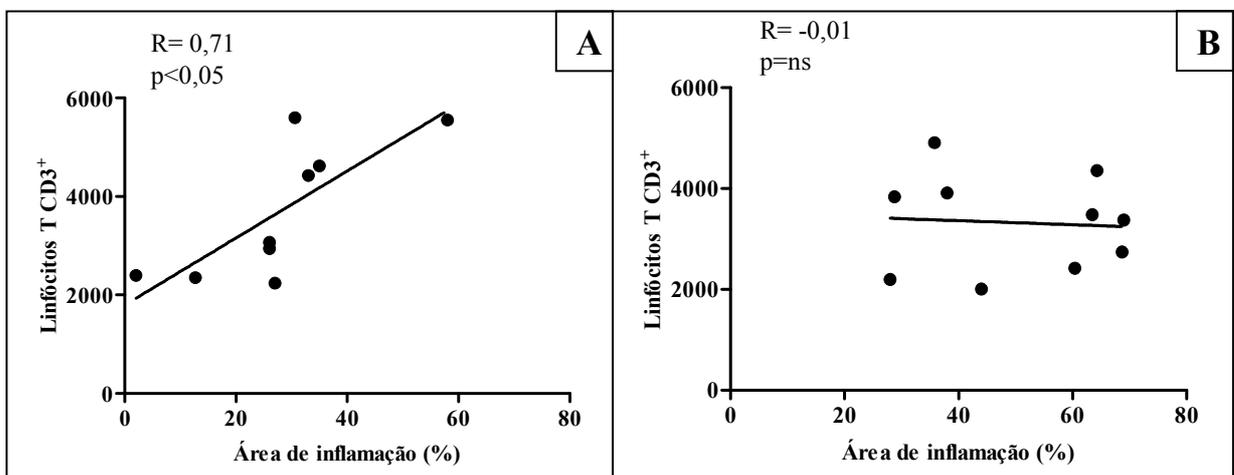


Figura 18. Correlações lineares entre o número de linfócitos CD3⁺ e a área de inflamação (A) na LCR (n=9) e (B) na LCC (n=10). Teste de Spearman.

Existiu um grau moderado de correlação entre os linfócitos B CD20⁺ e a área de inflamação nas lesões papulares, mas este achado não persistiu durante a fase das lesões ulceradas (Figura 19). O mesmo ocorreu com os plasmócitos CD138⁺ (Figura 20), porém não foram estabelecidas correlações estes tipos celulares e a área de necrose, entre o quantitativo de amastigotas, nem entre as demais células em análise (dados complementares).

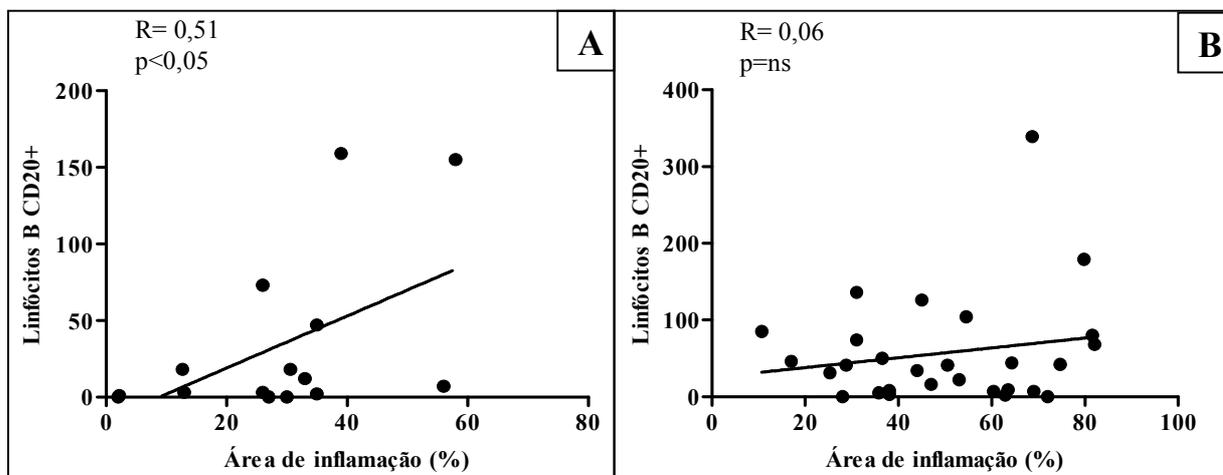


Figura 19. Correlações lineares entre o número de células B CD20⁺ e área de inflamação (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Spearman.

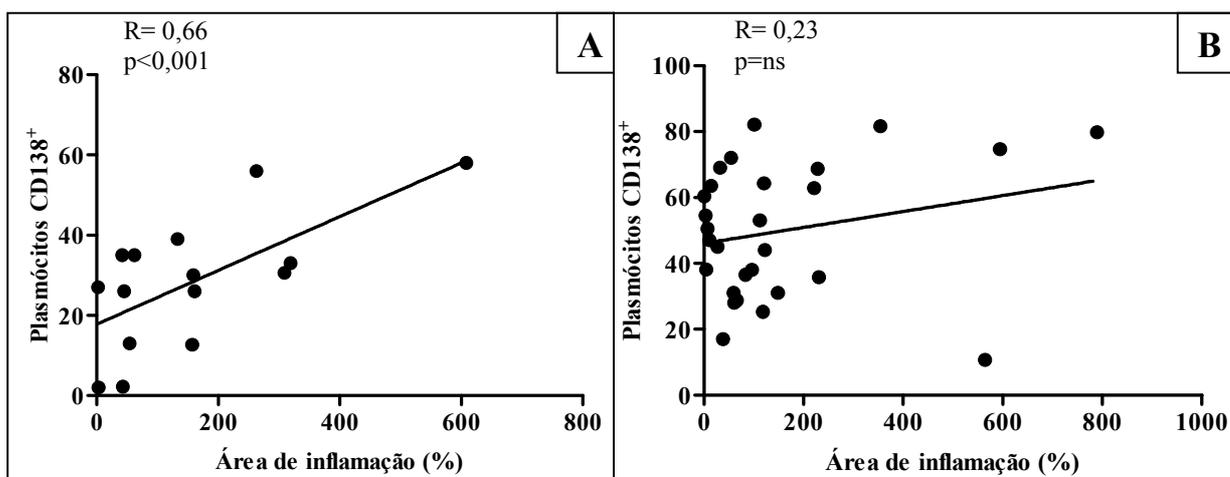


Figura 20. Correlações lineares entre o número de células B CD138⁺ e área de inflamação (A) na LCR (n=15) e (B) na LCC (n=28). Teste de Pearson.

5.5 RESPOSTA TERAPÊUTICA

As comparações entre a resposta terapêutica e os parâmetros estudados não apresentaram resultados estatisticamente significantes. Contudo, destacamos os principais aspectos que tiveram o mínimo de diferença, apontando para uma tendência, dentre os indivíduos que curaram ou falharam após o tratamento com antimonial pentavalente. Pacientes com LCR que apresentaram biópsias com maior área de inflamação teriam maior índice de falha terapêutica (Figura 21A). Maiores áreas de necrose foram mais frequentes nos indivíduos que curam (Figura 21B). Já o número de amastigotas poderia influenciar na falha ao tratamento, pelo menos, nas lesões iniciais em que a carga parasitária, em geral, foi maior (Figura 21C).

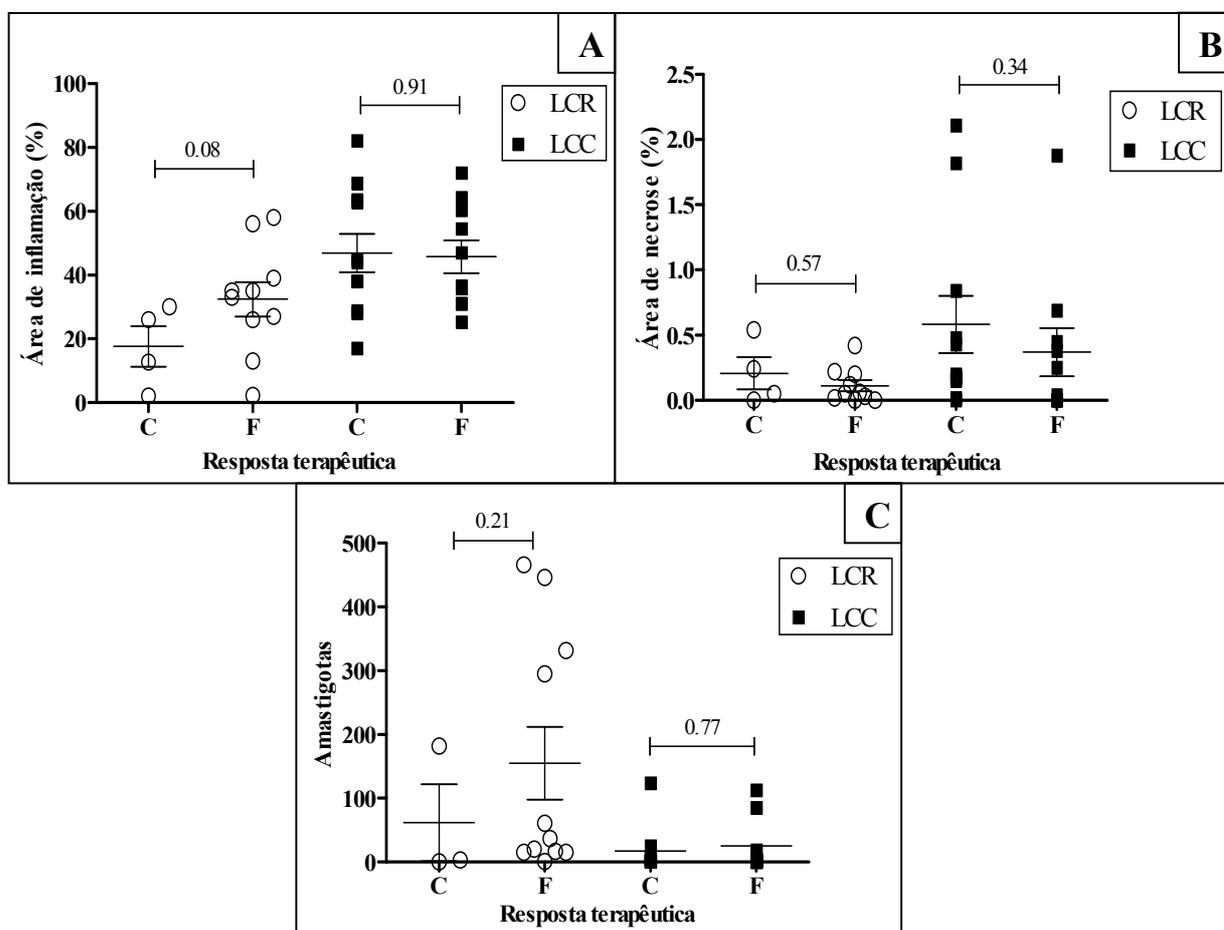


Figura 21. Comparações entre a resposta terapêutica e (A) área de inflamação (B) área de necrose e (C) número de amastigotas na LCR (n=14) e LCC (n=21). Teste estatístico t de student, pós-teste Mann-Whitney. As barras representam a média e o erro padrão. C= cura; F= falha.

5.6 ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS

A partir da análise em microscópio eletrônico de transmissão observamos células infiltradas na derme, com predominância de macrófagos que foram identificados morfolologicamente. Destacaram-se a presença amplas áreas de fibras colágenas e a eucromatina no núcleo de células na LCR (Figura 22).

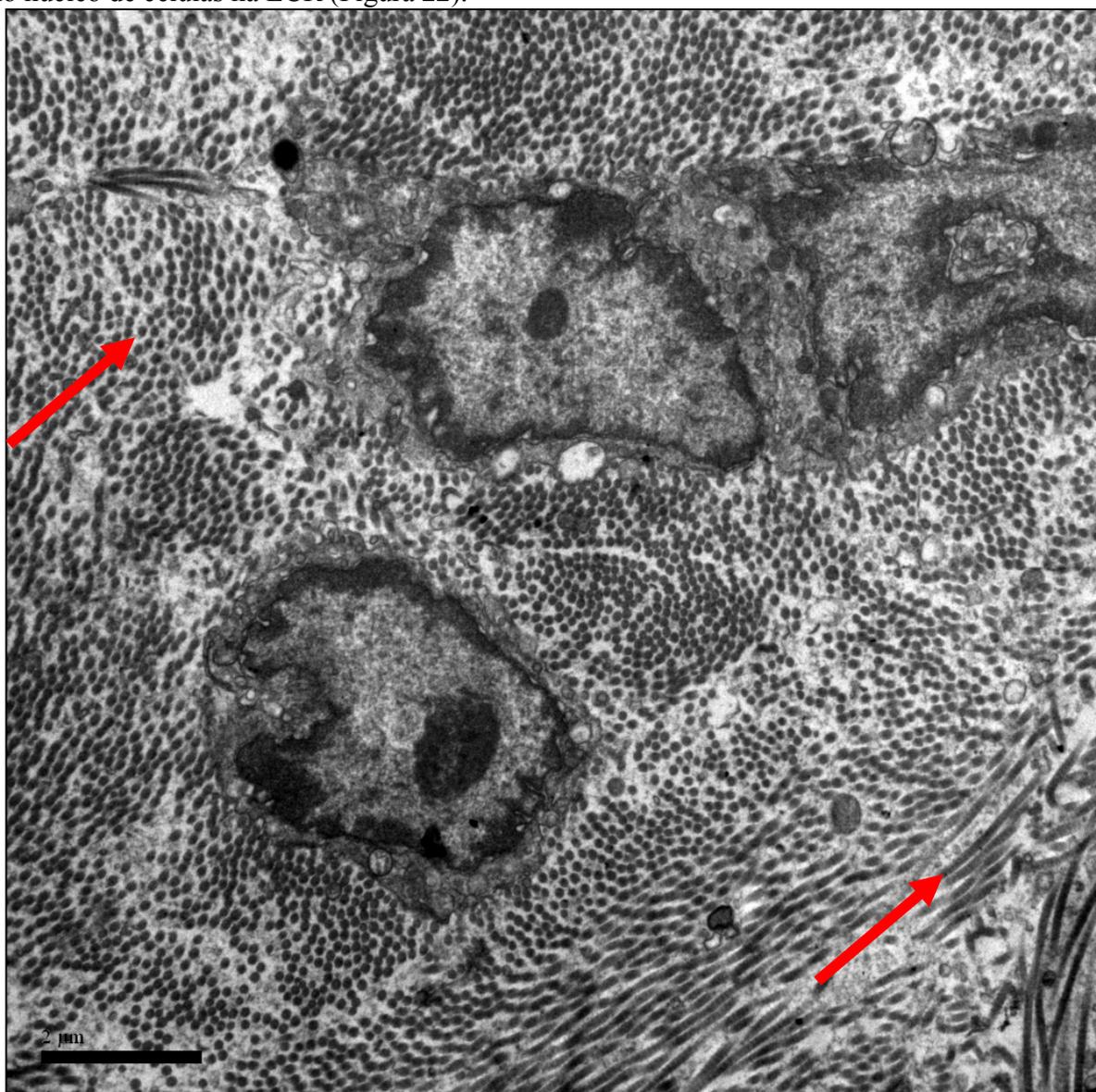


Figura 22. Células entre fibras colágenas que exibem bandas claras e escuras intercaladas, visualizadas como feixes com cortes longitudinais ou transversais (setas) (7.000X).

Em biópsias de úlceras clássicas foi encontrado um infiltrado inflamatório misto, com a presença de células com aspecto vacuolizado e vesículas de tamanhos variados. Nesta fase, observamos poucas áreas de colágeno, dando espaço ao agrupamento de células inflamatórias (Figura 23).

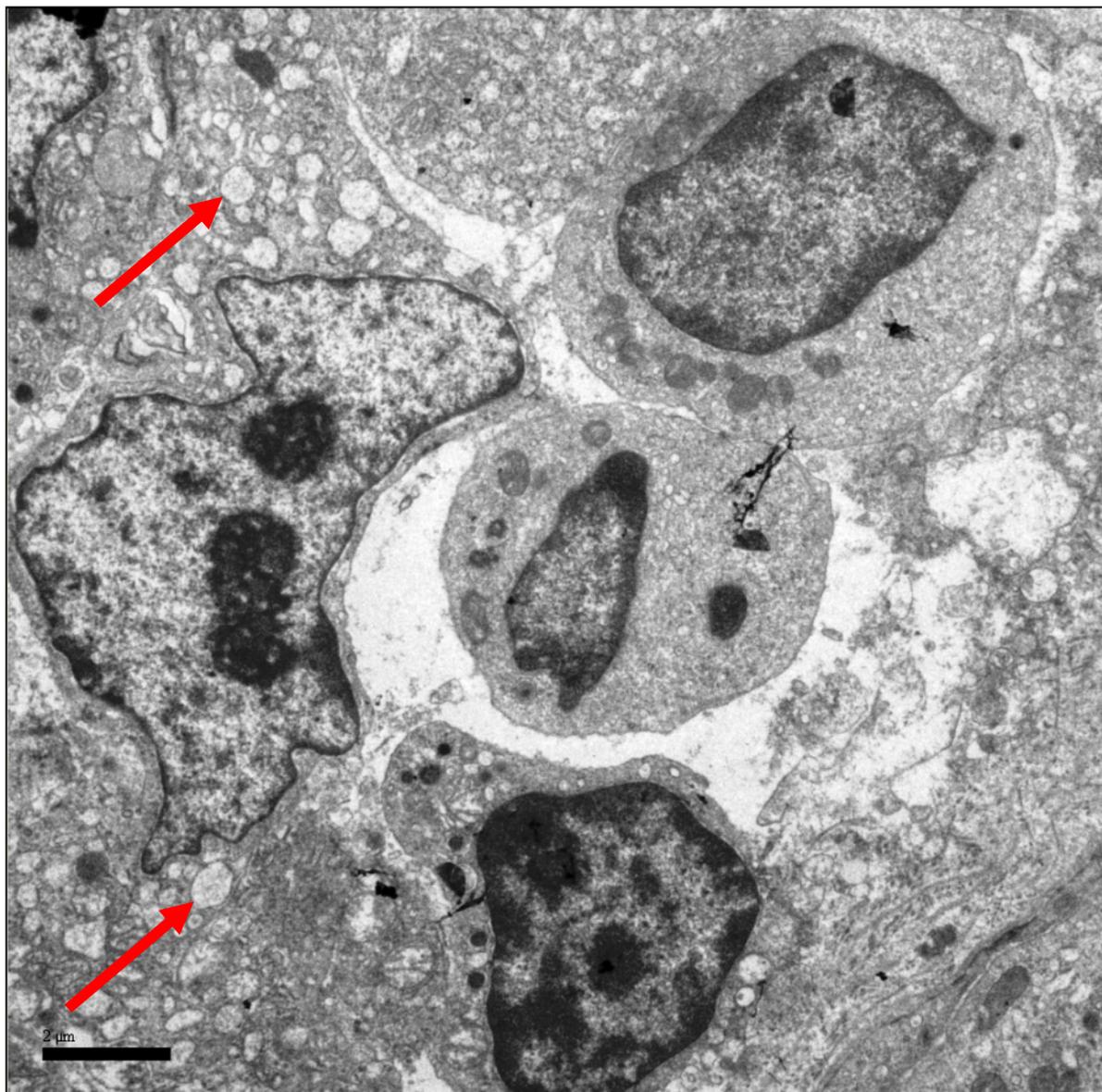


Figura 23. Células inflamatórias infiltradas na derme de paciente com LCC. No citoplasma das células foram observadas muitas vesículas (setas) (7.000x).

Identificamos que a maioria das amastigotas encontradas nas amostras de LCR estava localizada no vacúolo parasitóforo de macrófagos (Figura 24). Foi registrada uma amastigota próxima a uma célula, porém sobre as fibras de colágeno (Figura 25). Todos os parasitas encontravam-se caracteristicamente íntegros, com a membrana e estruturas sem alterações degenerativas.

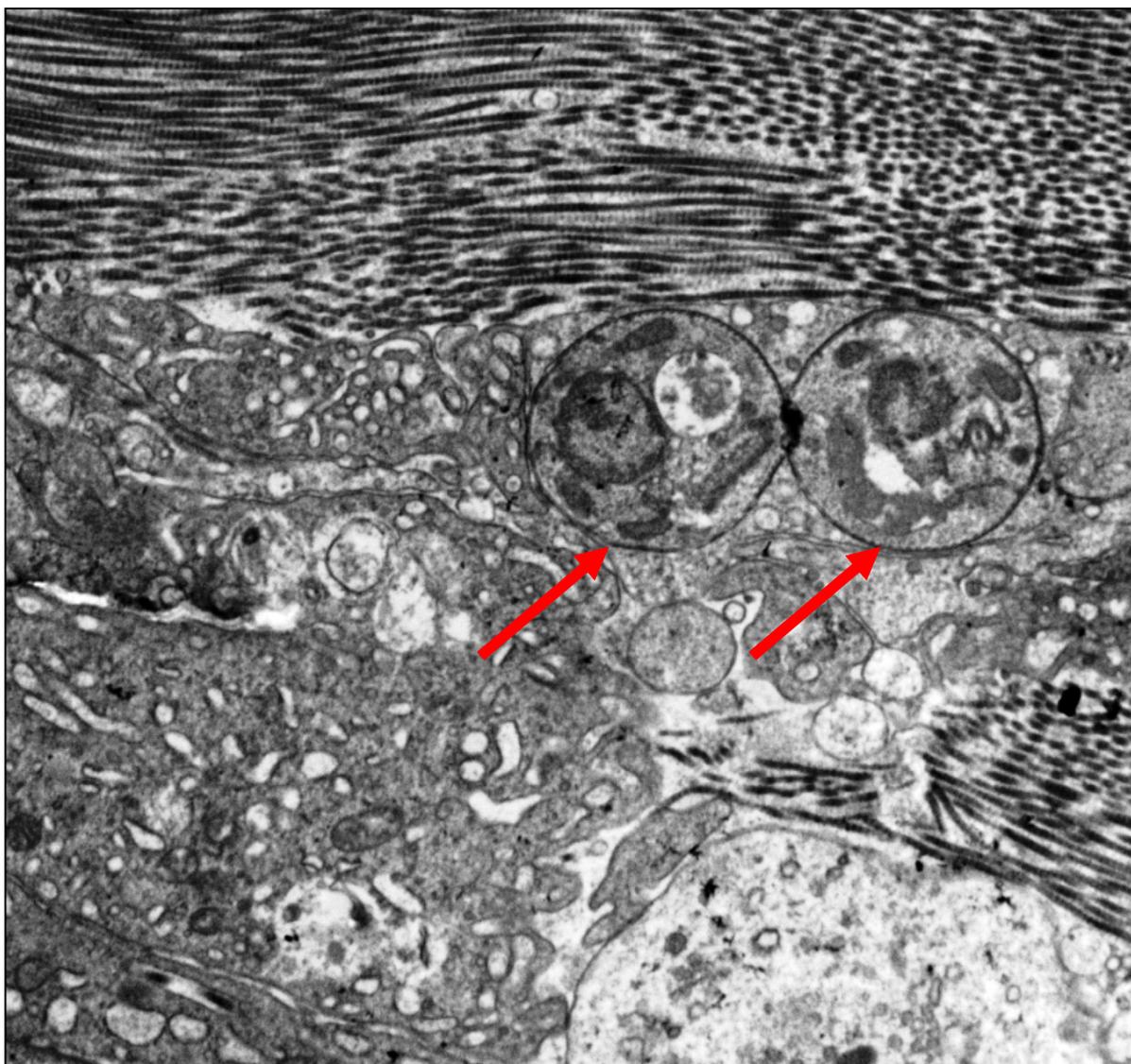


Figura 24. Amastigotas de *L. braziliensis* em vacúolo parasitóforo de célula fagocítica observadas no fragmento de pele de paciente com LCR (setas) (12.000X).

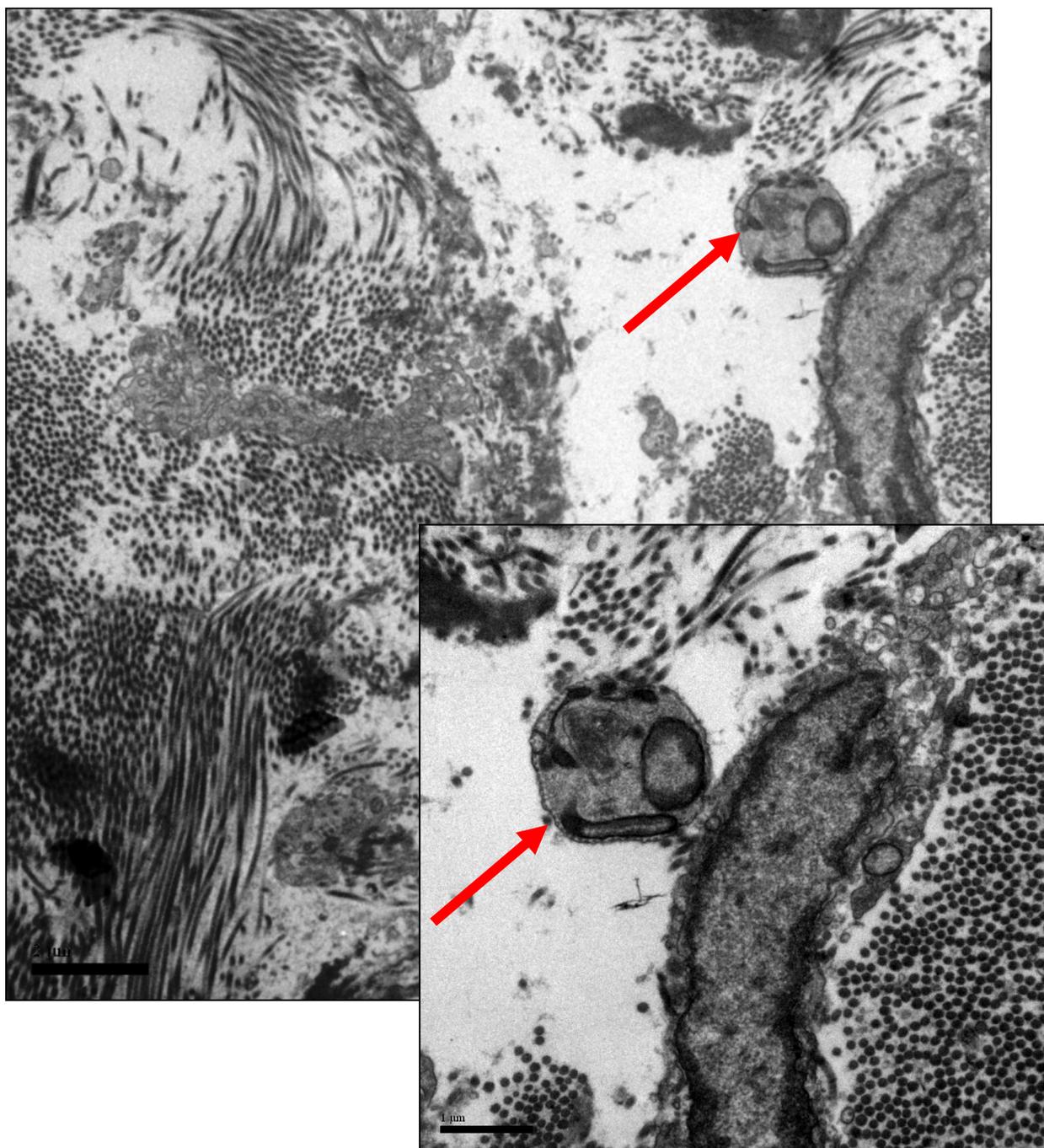


Figura 25. Amastigota de *L. braziliensis* aparentemente externa ao macrófago em meio às fibras colágenas em fragmento de pele de paciente com LCR (setas) (7.000X). Detalhe (12.000X)

Indícios de ativação macrofágica, como a presença de grande número de microvilosidades e de vesículas pinocíticas, e aumento do número de lisossomas, foram identificados nos macrófagos, incluindo os parasitados, observando-se também o surgimento de figuras de mielina próximas ao parasita (Figura 27).

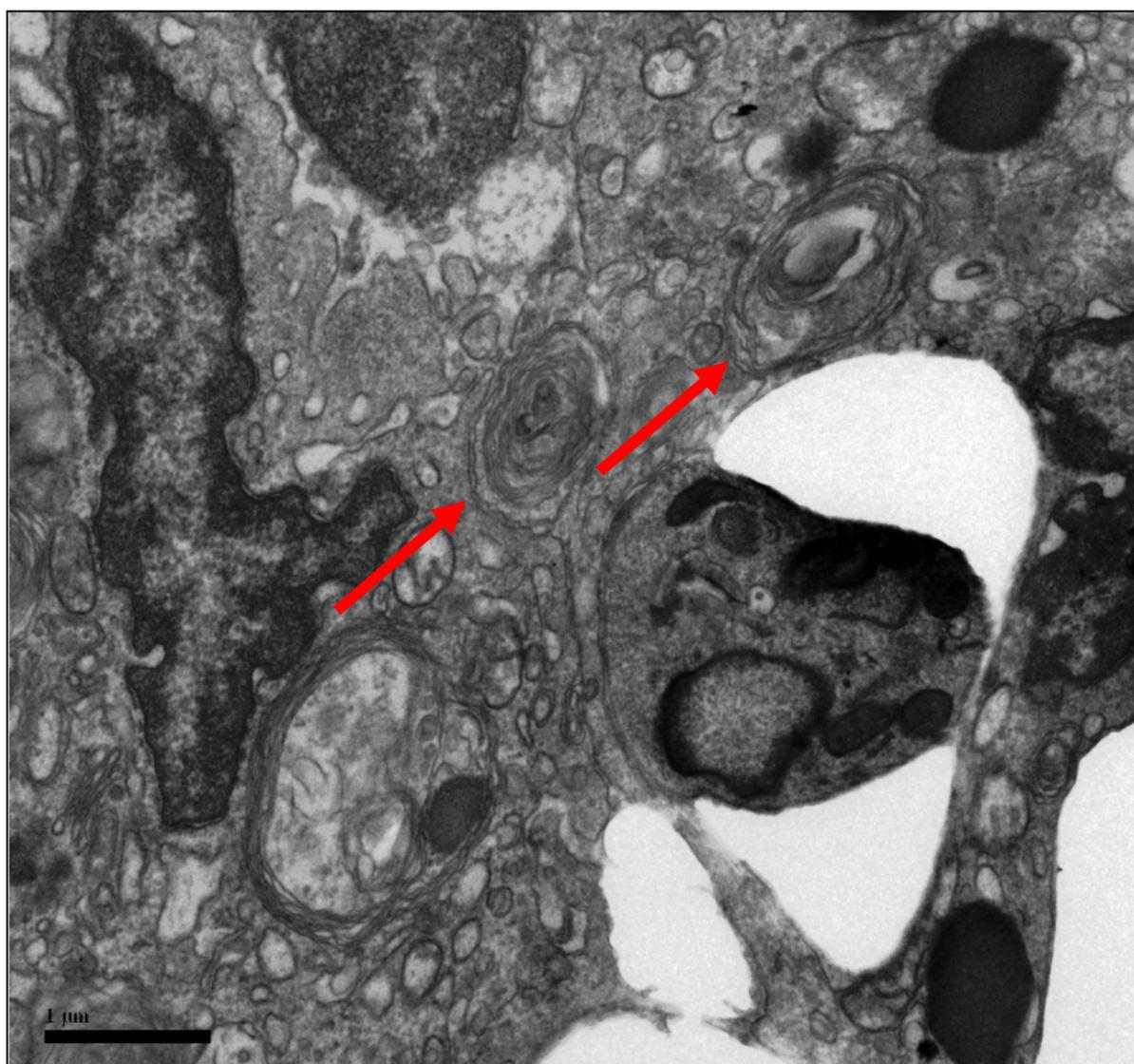


Figura 26. Amastigota de *L. braziliensis* dentro de macrófagos e envolto por figuras de mielina, observado no fragmento de pele de paciente com LCR (setas) (20.000X).

Normalmente as biópsias de lesões ulceradas apresentam um decréscimo na quantidade de parasitas, por isso, não foram visualizadas amastigotas nas secções de LCC. Os linfócitos foram frequentemente encontrados nesta fase da doença, por vezes, próximos a outros tipos celulares (Figura 27). Além disso, foi identificada a presença de mastócitos somente nos fragmentos de úlceras (Figura 28).

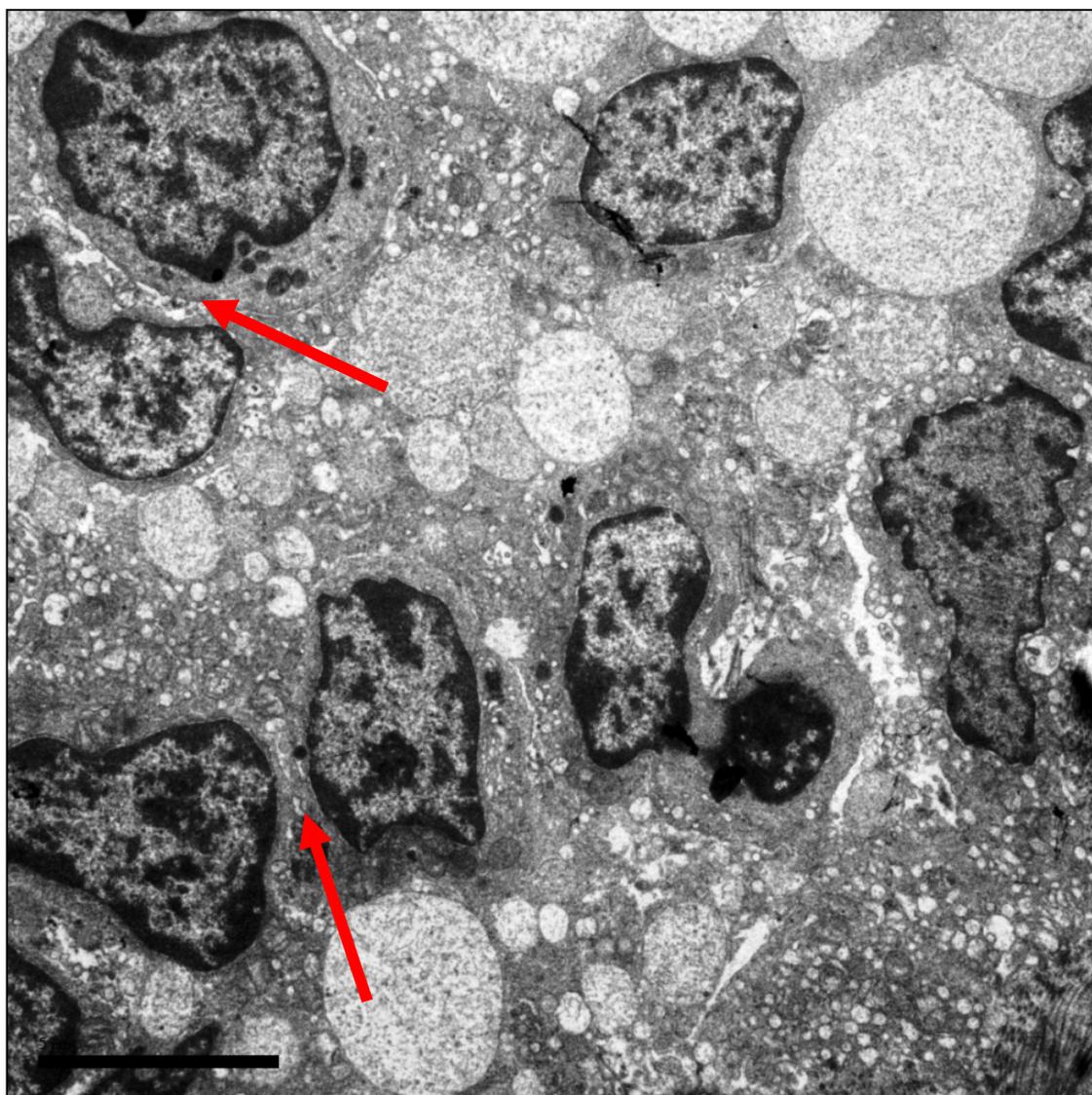


Figura 27. Possíveis interações entre células inflamatórias observadas no fragmento de pele de paciente com LCC (setas) (7.000X).

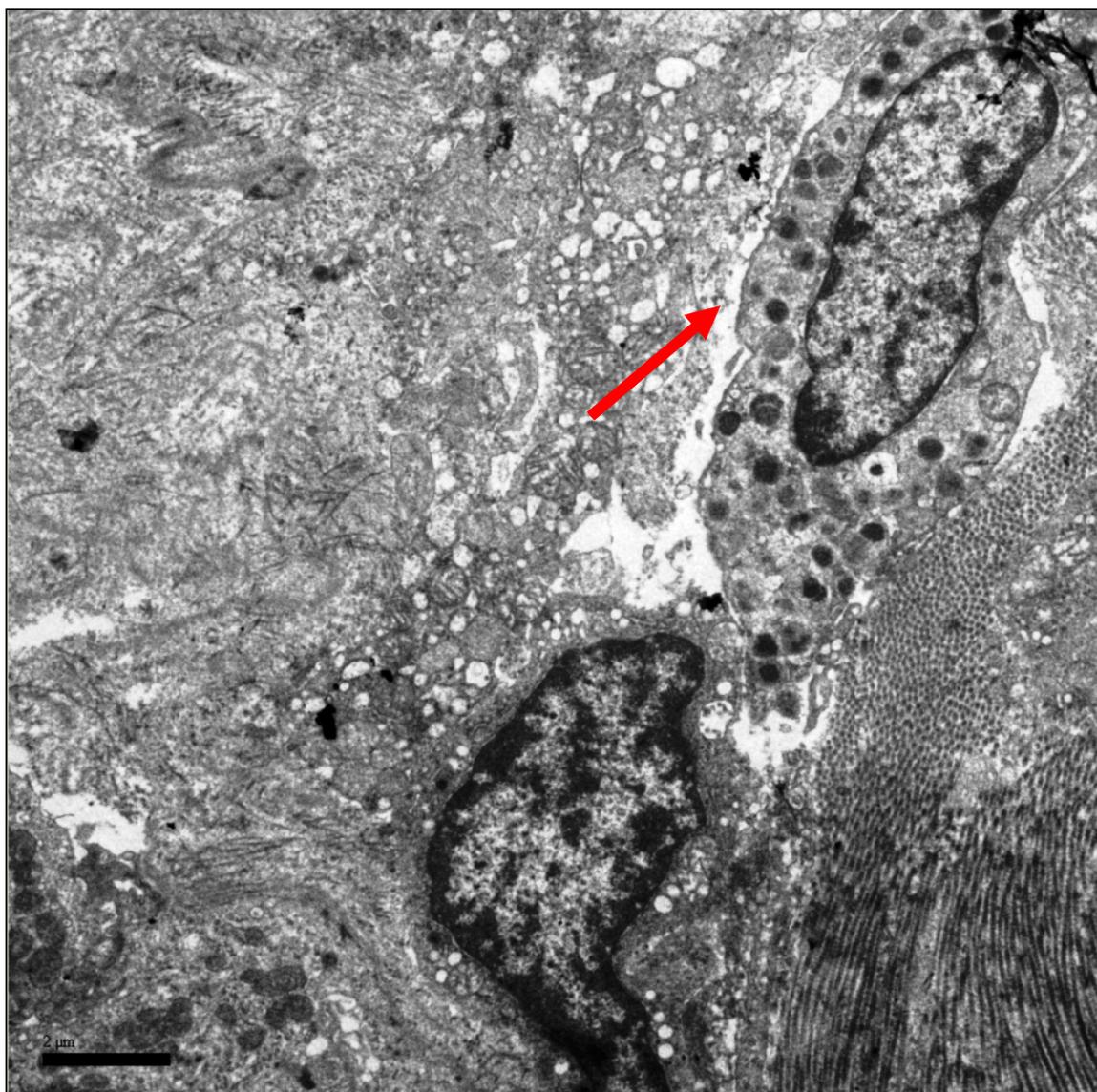


Figura 28. Mastócito, característico pela presença de grânulos de forma e tamanho irregulares, encontrado em biópsia de paciente com LCC (seta) (20.000X).

6 DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea localizada caracterizada pela formação de uma úlcera típica é a forma mais comum da infecção causada pelo *L. braziliensis* e está bem descrita na literatura. Os macrófagos são relatados como as principais células envolvidas no processo patogênico, uma vez que são responsáveis pela destruição dos parasitas, mas também permitem que estes se multipliquem em seu citoplasma (GIUDICE *et al.*, 2012). Encontramos que os macrófagos CD68⁺ estão diretamente relacionados à carga parasitária, necrose e tamanho da lesão e, identificamos aspectos clínicos e inflamatórios das lesões clássicas que diferem das lesões iniciais.

As lesões de pele foram mais comuns em adultos do sexo masculino e localizadas frequentemente nos membros inferiores, características que se devem, respectivamente, ao trabalho rotineiro no campo realizado por homens e à área de alcance alçado pelos flebótomos. Contudo, em alguns casos tem sido relatado o surgimento de lesões em outras regiões do corpo, como face e abdome, mostrando que podem ocorrer mudanças no padrão de infecção, que é muito frequente nas matas em áreas endêmicas, porém com incidência de casos em áreas peri e intradomiciliares.

Neste trabalho, os dados registrados sobre a IDRM e o tamanho das lesões foram compatíveis com o tempo de doença referido pelos pacientes, servindo de base para o estudo comparativo. A presença de linfadenopatia ocorreu em mais da metade dos pacientes com LCC e em quase todos os casos na LCR, com exceção de apenas um paciente. Um estudo de Machado *et al.* (2002) mostrou que quatro indivíduos com ausência de adenopatia tiveram uma resposta favorável ao tratamento, considerando que este fenômeno poderia estar relacionado à patogenia.

As alterações na epiderme e derme foram frequentes em ambos os grupos e, como descrito por Martins *et al.* (2014), após a infecção, a ativação e infiltração de leucócitos e fibroblastos promovem a destruição da constituição normal do tecido. A hiperplasia da epiderme ocorre em função da proliferação de queratinócitos na camada basal, o que pode explicar a alta frequência de alterações epidérmicas constatadas neste trabalho, quando observado os níveis de acantose, espongiose, exocitose e hiperkeratose tanto nas lesões papulares quanto nas ulceradas.

Encontramos uma maior frequência de biópsias apresentando células gigantes na LCC, sendo que estas células foram descritas e relacionadas com o tempo de infecção e com a diminuição do número de amastigotas, sugerindo sua participação no final do processo de destruição intracelular do parasita. A formação de granulomas foi observada em ambos os grupos de lesões e foi sugerida por Silva (1999) como um mecanismo da resposta imunológica efetiva contra o parasita e relacionada a uma intensa presença de linfócitos e ao baixo parasitismo. Da mesma forma, focos de fibrose foram encontrados nas lesões recentes e ulceradas e estas alterações podem estar relacionadas à regressão da lesão. Experimentos com modelo murino descreveram que a presença de neutrófilos na fase inicial da doença poderia favorecer o parasitismo (POMPEU, 1988). Contudo, em nosso estudo foi identificada uma diferença estatisticamente significativa da presença de neutrófilos na LCC. O recrutamento de neutrófilos observado em fases posteriores da lesão sugere a atividade das células Th17. Foram encontrados neutrófilos no tecido positivos para IL-17, interleucina que está associada tanto ao controle da infecção quanto à destruição tecidual (BOAVENTURA *et al.*, 2010; NOVOA *et al.*, 2011). No desenvolvimento de uma resposta inflamatória o estímulo à degranulação e a formação de *Neutrophils Extracellular Traps (NETs)* atingem os parasitas extracelulares, sendo estas células associadas à redução da carga parasitária (MORGADO *et al.*, 2015).

Nossos dados corroboram com a hipótese de que na LC, em parte, os mecanismos patogênicos das lesões relacionam-se aos distúrbios vasculares (SILVA, 1999). A vasculite, diferente das demais alterações da derme anteriormente citadas, foi encontrada com maior frequência nas secções de LCR. Essas alterações podem ocorrer em consequência da ativação constante do endotélio venular, podendo influenciar no desenvolvimento da úlcera. Todavia, a ulceração da pele também está relacionada a uma forte resposta inflamatória envolvendo macrófagos infectados e necrose da derme, o que ocorre, geralmente, em poucas semanas após o desenvolvimento da lesão inicial.

Em nossos dados foi predominante o número de biópsias de LCC apresentando focos de fibrose. Este achado é consonante com dados da literatura que consideram a leishmaniose tegumentar uma doença fibrosante (BITTENCOURT *et al.*, 1990). Silva (1999), que relatou que o colágeno dérmico mostrou graus variáveis de degradação, notando-se que quanto mais acentuado o acúmulo de células inflamatórias, de granulomas e de necrose mais extensa era a degradação da matriz conjuntiva da derme. Dependendo do período da doença podemos visualizar um processo destrutivo ou reconstrutor, existindo na fase precoce uma tendência à destruição da matriz colagênica e nas fases tardias os aspectos fibrogênicos corresponderiam à fase de reparo.

Conforme Faria *et al.* (2009), observamos que a intensidade do infiltrado inflamatório é maior nos casos de LCC, sendo compatível com o progresso da lesão. O mesmo não ocorreu na análise da área de necrose e, ao contrário do que tínhamos por hipótese, não há relação entre as áreas de inflamação e de necrose. Em nossos resultados não foi encontrada uma relação direta entre estes parâmetros individualmente e o tamanho da lesão em nenhum dos grupos estudados.

Na coloração de Hematoxilina e Eosina, nem sempre é possível identificar parasitas em todos os casos examinados. Segundo De Oliveira *et al.* (2003), amastigotas são mais facilmente detectáveis quando é empregada a reação de imunohistoquímica utilizando anticorpos anti-

Leishmania spp. Neste trabalho tivemos um alto grau de detecção de amastigotas utilizando esta técnica e, conforme observado durante o diagnóstico de rotina, confirmamos que o número de amastigotas foi mais expressivo nas biópsias de LCR quando comparadas às de LCC. A carga parasitária não teve efeito sobre as áreas de inflamação e de necrose nem com o tamanho da lesão, mostrando que o parasita não participa diretamente no desenvolvimento da lesão. Esse resultado foi comum a outros dados, como os de Silva (1999) que relatou uma desproporção entre o número de amastigotas e a intensidade dos eventos inflamatórios e necróticos.

O perfil de células inflamatórias em lesões de LC foi descrito a partir de experimentos em camundongos e do aspirado sanguíneo ou do linfonodo de pacientes (POMPEU, 1988; BOMFIM *et al.* 2007). Entretanto, o sítio das lesões apresentam reações imunológicas específicas, tanto ao agente etiológico quanto às reações teciduais, podendo a resposta local não ser semelhante à ocorrida no sangue periférico (PIRMEZ *et al.*, 1990).

A caracterização fenotípica das células do infiltrado inflamatório permitiu identificar que o padrão celular não difere muito entre as lesões. Encontramos nos grupos proporções similares de macrófagos, linfócitos B CD20⁺ e plasmócitos CD138⁺ e a correlação positiva destas células com a extensão da inflamação. Apesar do número de amostras reduzido em ambos os grupos de lesões devido às inconsistências na técnica de IHQ durante a padronização de anticorpos, foi mostrado que os linfócitos T CD3⁺ estavam intensamente relacionados aos níveis de inflamação, sendo estas células, também, as que estavam presentes com maior frequência no tecido, com ampla distribuição quando comparada aos demais tipos de células analisadas.

A análise de células de lesões por citometria de fluxo revelou aumento no número de linfócitos T CD4⁺ na fase tardia comparada com a inicial (MELBY *et al.*, 1994). Da-Cruz *et al.* (2005) e Faria *et al.* (2009) relataram que quanto maior o tempo da doença, maior a frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na lesão (DA-CRUZ *et al.*, 2005). Nossa avaliação *in situ* ratifica

estes achados, pois observamos que os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ também são mais frequentes na lesão tardia que na recente. Estes linfócitos, presentes tanto nas lesões papulares quanto nas ulceradas, poderiam contribuir com a diminuição da carga parasitária, no caso dos T CD4⁺, enquanto que os linfócitos T CD8⁺ estariam relacionados à lesão tecidual (SANTOS *et al.*, 2013).

Nosso grupo, anteriormente, havia encontrado uma correlação positiva entre as células T CD4⁺ e a inflamação nas lesões recentes e tardias e o aumento das células T CD8⁺ de acordo com a duração da lesão (DANTAS *et al.*, 2013; DANTAS *et al.*, 2014). Acredita-se que linfócitos T CD8⁺ teriam na LCL capacidade de regular a resposta imunológica dependendo do tipo de atividade e dos produtos secretados durante a evolução da infecção. Neste estudo não foram encontradas associações entre estas células e o dano tecidual, todavia, a quantificação de linfócitos com perfil citotóxico e ativado é uma evidência indireta da participação destes na patogênese das lesões (DANTAS, 2012; FARIA *et al.*, 2009). A presença de atividade citotóxica dos linfócitos em lesões de LTA ainda não está esclarecida na infecção, podendo estar relacionadas ao controle parasitário, mas também favorecer a lesão tecidual. (FARIA *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2002a) Uma forte expressão de TIA-1, um marcador de grânulos citotóxicos oriundos de células T e NK, foi encontrada no infiltrado dérmico celular na LC (MACHADO *et al.*, 2002b). A produção de granzima A parece participar na progressão da lesão em lesões ulceradas e de granzima B em lesões recentes, considerando o aumento da expressão destas em conjunto com a inflamação. Foi sugerido que essa função citolítica das células T CD8⁺ poderia também ser importante para a eliminação do parasita, mas também não observamos nenhum tipo de correlação entre o número de amastigotas de *L. braziliensis* e este tipo celular.

Os macrófagos CD68⁺, por sua vez, estão diretamente envolvidos com o tamanho da lesão nas fases iniciais da doença e com o número de amastigotas na LCC. Além disso, a relação entre macrófagos e a área de necrose foi classificada como moderada em ambos os grupos de lesões.

Em estudo anterior, nosso grupo apontou para uma forte correlação positiva entre os macrófagos CD68⁺ e a área de inflamação, principalmente nas lesões iniciais de LC (DANTAS *et al.*, 2013). De acordo com Silva (1999), não se observou correlação entre a quantidade de macrófagos no sítio de inflamação e a intensidade do parasitismo, porém uma correlação positiva foi verificada com a intensidade de necrose e a quantidade de células CD68⁺.

Podemos aferir que as células do infiltrado inflamatório continuam migrando para o local de lesão em resposta a estímulo quimiotático, devido à intensidade do parasitismo ou de seus antígenos, podendo os macrófagos participar na patogênese da lesão ao promover a necrose.

Os achados de linfócitos B CD20⁺ e plasmócitos CD138⁺ apontaram para dois aspectos ainda pouco abordados em estudos histológicos na LC. Bomfim *et al.* (2007), explicou que células B e plasmócitos são mais frequentemente observados em pacientes que apresentaram linfadenopatia com lesão ulcerada, no entanto, a maioria dos casos incluídos no estudo apresentaram aumento do linfonodo, tanto os de lesões papulares como no das lesões ulceradas, não havendo distinção entre os valores destas células entre os grupos. Células B e plasmócitos são comuns em infiltrados inflamatórios e podem indicar a participação de anticorpos no processo patológico ou na resposta imune para leishmaniose. Apesar do pequeno número de linfócitos B e plasmócitos em relação às demais populações de células avaliadas, foi observado uma correlação positiva de 59% e 66% das células B CD20⁺ e CD138⁺, respectivamente, com a área de inflamação. Por outro lado, não foi possível afirmar a existência de uma correlação positiva entre os linfócitos B CD20⁺ e plasmócitos CD138⁺. Dantas *et al.* (2013), também descreveu a participação de linfócitos B e plasmócitos em lesões de LC e afirmou que uma maior frequência destas células no tecido sugere a importância que estas exercem no desenvolvimento da doença.

O fato do tratamento precoce não inibir a evolução da doença e ter altas taxas de falha ainda é uma incógnita e raramente discutido. Coutinho *et al.* (1996), discutiu que um percentual semelhante de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico foi encontrado na fase de cura da LCL causada por *L. braziliensis*, sugerindo que estes linfócitos poderiam desempenhar um papel protetor nesta fase de doença. Por outro lado, existem relatos do papel deletério destas células e, em nosso estudo, não encontramos relação entre estes tipos celulares e o estabelecimento da cura.

A análise dos nossos dados revelou discretas diferenças entre as taxas de falha e cura dentro de cada grupo de lesão, porém os valores encontrados não se comprovaram estatisticamente. Contudo, observamos que pacientes com lesões recentes apresentaram biópsias com maiores áreas de inflamação e necessitaram de mais de um ciclo de tratamento com Glucantime. Curiosamente, nas lesões de LCR e LCC, as taxas de cura foram maiores naqueles com maior área de necrose. Por fim, os indivíduos com lesões papulares e maiores níveis de carga parasitária, tenderam à falha terapêutica, comparado com aqueles poucos pacientes com lesões papulares e número tecidual de amastigotas reduzido. Estudos *in vitro* relataram que o antimoniato de meglumina, substância ativa do Glucantime®, intensifica a função fagocitária de monócitos e neutrófilos de indivíduos saudáveis, causando um aumento na produção de TNF- α e óxido nítrico, levando à morte as amastigotas intracelulares (MUNIZ-JUNQUEIRA; DE PAULA-COELHO, 2008). Portanto, podemos aferir que apenas a morte do parasita não é suficiente para se estabelecer a cura clínica.

O estudo ultraestrutural revelou que as células infiltradas na derme podem participar da destruição tecidual no decorrer da doença evidenciada pelas diminutas áreas de colágeno presentes nas biópsias de lesões ulceradas. Reafirmamos a presença de macrófagos e linfócitos e a possível cooperação entre estas células, ou mesmo uma ação citotóxica dos linfócitos sobre

macrófagos infectados e não infectados. A distribuição de vesículas intracelulares sugerem uma ativação celular e atividade leishmanicida que, aparentemente, não se apresentaram efetiva nas fases iniciais da doença, uma vez que os parasitas encontrados apresentavam sua morfologia preservada.

Barral *et al.* (1995), relatou que os parasitas nem sempre são encontrados nas amostras e, em caso positivo, estes podem estar no interior de macrófagos ou, eventualmente, no espaço extracelular. Uma vez que os parasitas fossem encontrados em meio extracelular, estes ficariam passíveis de mecanismos líticos provenientes dos neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, além do anticorpo e complemento (POMPEU, 1988). No entanto, todas as amastigotas encontradas amostras de LCR, presentes nos meios intra ou extracelular, permaneciam aparentemente incorruptíveis, independentemente se localizadas próximas às figuras de mielina, sugestivas de ação autofágica ou dispostas sobre fibras de colágeno. Não identificamos parasitas nos fragmentos de LCC, mas observamos a presença de mastócitos, células residentes no tecido que estão envolvidas no processo inflamatório. Estas células foram reconhecidas apenas após a análise da ultraestrutura e, talvez pela quantidade reduzida destas no tecido não a observamos por microscopia óptica, porém não descartamos a importância do papel destas células no conjunto de ações contra o parasita.

A associação dos fatores internos e externos que interferem nas condições normais do tecido, provocando alterações na derme e epiderme, desencadeia a manifestação clínica observada pelas lesões de cada paciente. Além disso, estes fatores em conjunto podem ser a causa, ainda desconhecida, que conduziria à ineficiência do tratamento. As técnicas de microscopia de luz e eletrônica nos permitiu investigar o tecido sob diferentes perspectivas, acrescentando sentido aos resultados do trabalho e gerando informações complementares. A partir deste trabalho, outras abordagens podem ser criadas, realizando novas correlações entre os

dados sócio-demográficos, clínicos e imunológicos. Uma vez que identificamos a população celular, estas podem ser caracterizadas de acordo com a expressão de citocinas e demais moléculas envolvidas na patogênese das doenças infecciosas e, então, levar a compreensão do complexo percurso de uma doença contraditória ao tratamento precoce.

7 CONCLUSÃO

A resposta inflamatória compõe-se de um amplo espectro de células, principalmente linfócitos T CD3⁺ e seus subtipos TCD4⁺ e TCD8⁺, além de macrófagos CD68⁺. As células inflamatórias estão envolvidas no processo que permanece ativo mesmo após a diminuição significativa da carga parasitária. Desta maneira, não se caracterizam as amastigotas de *L. braziliensis* protagonistas do dano tecidual, mas a composição de uma resposta inflamatória com extenso conteúdo linfocitário e com destaque para os macrófagos que, em tese, deveriam garantir a efetiva destruição do parasita, mas associam-se a destruição tecidual. Contudo, observamos que os macrófagos foram correlacionados ao número de amastigotas na LCC, à área de necrose durante todo o curso da doença, e ao tamanho da lesão na LCR, sugerindo seu papel deletério. Podemos concluir com nossos achados que a resposta inflamatória é importante para conter o parasita, mas contribui para a destruição tecidual, levando uma lesão papular recente à progressão para uma úlcera típica de leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6734–6740, 2002.

BARRAL, A *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 4, p. 947–954, 1995.

BARRAL, A. *et al.* Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 587-592, 1992.

BARRAL, A.; BITTENCOURT, A. Evaluation of the histopathological classifications of american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51–56, 1991.

BARRAL, A. *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 256-259, 1995.

BELKAID, Y. *et al.* A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, v. 165, p. 969–977, 2000.

BITTAR, R. C. *et al.* T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 625–630, 2007.

BITTENCOURT, A L. *et al.* Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 53–59, 1990.

BOAVENTURA, V. *et al.* Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, p. 2830–2836, 2010.

BOAVENTURA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Imunopatologia da Leishmaniose Cutânea. In: BARRAL, A.; COSTA, J. (Eds.). **Leishmanias e Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1a. ed. 2011.

BOMFIM, G. *et al.* Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 854–859, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª. ed. Brasília-DF, Ministério da Saúde. 2010.

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos clínico e diferencial**. 1^a. ed. Brasília-DF, Ministério da Saúde, 2006.
- BRYCESON, A.D.M. Diffuse cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia, the clinical and histological features of the disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, p. 708-737, 1969.
- CAMPANELLI, A. P. *et al.* Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. **Human Immunol.**, v. 71, n. 12, p. 1220–1227, 2010.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 56, p. 315–325, 1994.
- COSTA, J. M. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 319–323, 1986.
- COSTA, J. M. L. *et al.* Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gaz. Méd. Bahia**, p. 70–83, 2009.
- DA-CRUZ, A M. *et al.* Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **Brit. J. Dermatol.**, v. 153, n. 3, p. 537–543, 2005.
- DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.
- DANTAS, M. L. **Aspectos comparativos da resposta inflamatória em lesões de leishmaniose cutânea localizada e disseminada**. 93 fls. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.
- DANTAS, M. L. *et al.* Major Article CD8⁺ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, p. 728–734, 2013.
- DANTAS, M. L. *et al.* Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 202-209, 2014.
- DE OLIVEIRA, C. I. *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, n. 11, p. e149–153, 2003.
- DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 145, 2012.
- DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 827–829, 1998.

- DIMIER-DAVID. Histopathology of mucocutaneous. **Ann. Dermatol. Venereol.**, v. 121, n. 12, p. 935, 1994.
- EL HASSAN, A.; VERESS, B.; KUTTY, M. K. The ultrastructural morphology of human cutaneous leishmaniasis of low parasite load. **Acta Dermatol. Venereol.**, v. 64, n. 6, p. 501–505, 1984.
- ELDER, D. **Histopathology of the skin**. 10. ed. Philadelphia: [s.d.].
- FARIA, D. R. *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal Leishmaniasis. **Infect Immun.** v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.
- FARIA, D. R. *et al.* Recruitment of CD8⁺ T cell expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 31, n. 8, p. 432–439, 2010.
- FOLLADOR, I. *et al.* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 11, p. E54–8, 2002.
- GIUDICE, A. *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 75, 2012.
- GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revi. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.
- GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 4, p. 300–306, 1996.
- GRIMALDI JR. G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, p. 687–725, 1989.
- GUIMARÃES, L. H. *et al.* Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n. 1, p. 66–74, 2005.
- HARING, J. S.; BADOVINAC, V. P; HARTY, J. T. Inflaming the CD8⁺ T cell response. **Immunity**, v.25, n.1, p.19-29, 2006.
- JONES, T. C. *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infect. Dis.**, v. 156, p. 73–83, 1987.
- KUMAR, V. *et al.* **Robbins Basic Pathology**. 8. ed. Philadelphia: Editora Saunders, 2007.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 569–596, 1983.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, v. 213, p. 183-91, 2008.

LIMA, G. M. C. A. *et al.* Susceptibility and resistance to *Leishmania amazonensis* in H-2(q) syngeneic high and low antibody responder mice (Biozzi mice). **Scand. J. Immunol.**, v. 48, p. 144–151, 1998.

MACHADO, P. *et al.* Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 12, p. E69-73, 2002.

MACHADO, P.; KANITAKIS, J. *et al.* Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Dermatol.**, v. 12, n.5, p.449-451, 2002.

ly via TNF A. V *et al.* Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 6, p. 421–430, 1986.

MARSDEN, P. D. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L (V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v. 27, n. 2, p. 93–101, 1994.

MARTINS, A L. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Ans Bras. Dermatol.**, v. 89, n. 1, p. 52-58, 2014.

MELBY, P. C. *et al.* Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 3, p. 837–842, 1994.

MELLO, M. *et al.* Padronização do antígeno de Montenegro. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 19, p. 161-164, 1997.

MENDES, D. S. *et al.* Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4⁺, CD20⁺, CD68⁺, CD31⁺ and vW⁺ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 18–22, 2013.

MORGADO, F. *et al.* Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.

MÜLLER, K. *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, p. 73–76, 2001.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; DE PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **Internat. Immunopharmacol.**, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, 2008.

- NEVES, D. **Parasitologia Médica**. 9. ed. : São Paulo., Ed. Atheneu, 1997. p. 135–139.
- NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J. Immunol.**, v. 183, p. 8088–8098, 2009.
- NOVOA, R *et al.* IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. **Parasite Immunol.**, v. 33, n. 2, p. 132–136, 2011.
- NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 34, n. 12, p. 551–561, 2012.
- OLIVEIRA, F. *et al.* Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 70–73, 2011.
- PAVELKA, M.; ROTH, J. **Functional Ultrastructure: An Atlas of Tissue Biology and Pathology**. New York, SprigerWien, 2005. p. 313-325.
- PIRMEZ, C. *et al.* Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J. Immunol.** v. 145, n. 9, p. 3100-3104, 1990.
- POMPEU, M. M. de L. **Análise Imunopatológica do curso da lesão por *Leishmania mexicana amazonensis* em camundongos BALB/c imunizados**. 105 fls. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 1988.
- REINER, N. E. *et al.* Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. **Procee. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 12, p. 4330–4334, 1988.
- RIBEIRO DE JESUS, A. *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 143–148, 1998.
- ROCHA, P. N. *et al.* Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 5, p. 1731–1734, 1999.
- RODRIGUES DE SANTANA, F. *et al.* Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30cH. **Homeopathy**, v. 103, n. 4, p. 264-274, 2014.
- SAMPAIO; RIVITTI. **Dermatologia**. 2. ed. Artes Médicas. São Paulo, 1998.
- SANTOS, C. D. S. *et al.* CD8⁽⁺⁾ granzyme B⁽⁺⁾-mediated tissue injury vs. CD4⁽⁺⁾IFN γ ⁽⁺⁾-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **J. Investig. Dermatol.**, v. 133, n. 6, p. 1533–1540, 2013.
- SARAVIA, N. G. *et al.* The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 159, p. 725–735, 1989.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; SHER, A. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 137, p. 1017–1021, 1986.

SHIRIAN, S. *et al.* Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Arch. Pathol. & Lab. Med.**, v. 138, n. 2, p. 235–240, 2014.

SILVA, T. **The immune-inflammatory response in human cutaneous leishmaniasis.** Salvador, Universidade Federal da Bahia, 1999.

SUVISA. PORTAL DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. SINAN Disponível em <<http://www3.saude.ba.gov.br/cgi/tabcgi.exe?tabnet/sinan/lta.def>>em Acesso em: 11 maio 2015.

UNGER, A. *et al.* Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 4, p. 574–579, 2009.

VANNIER-SANTOS, M. A; MARTINY, A; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Curr. Pharmaceut. Design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

GLOSSÁRIO

ACANTOSE: hiperplasia difusa da epiderme (KUMAR *et al.*, 2007).

CÉLULA GIGANTE: frequentemente, células epitelióides se fusionam para formar as células gigantes na periferia ou, às vezes, no centro de granulomas. Essas células têm uma grande massa citoplasmática e pode conter cerca de 20 ou mais pequenos núcleos (KUMAR *et al.*, 2007).

ESPONGIOSE: Edema intercelular da epiderme (KUMAR *et al.*, 2007).

EXOCITOSE: Infiltração da epiderme por células mononucleares (KUMAR *et al.*, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

HIPERCERATOSE: Espessamento do estrato córneo moderado ou excessivo, frequentemente associado com uma anormalidade qualitativa da queratina (KUMAR *et al.*, 2007).

FIBROSE: alteração do colágeno com fibras espessas, compactas e hialinizadas. Está associada com doenças inflamatórias crônicas e pode ser encontrada em cicatrizes hipertróficas e quelóides (SAMPALIO; RIVITTI, 2001).

GRANULOMA: caracterizam-se por uma disposição constantemente ordenada em arranjo peculiar dos seus elementos inflamatórios, isto é, alterações e neoformações vasculares, proliferação fibroblástica, infiltrações celulares de histiócitos, células epitelióides, linfócitos, plasmócitos e caracteristicamente células gigantes (KUMAR *et al.*, 2007).

NECROSE: refere-se ao espectro de alterações morfológicas seguidas de morte celular em tecidos vivos, resultante de um processo de degradação progressivo. Ocorre após condições anormais de estresse, como isquemia e lesão química, e é sempre patológico. A aparência morfológica da necrose é resultado da desnaturação de proteínas

intracelulares e digestão enzimática das células durante reações inflamatórias (KUMAR *et al.*, 2007).

PLASMÓCITOS: tem um citoplasma abundante extremamente basofílico, homogêneo e nitidamente definido. A distribuição regular de partículas de cromatina dá ao núcleo uma aparência de “roda de carroça”. Dado que estas células são teciduais, incomuns na circulação periférica, pode presumir-se que, na derme, se desenvolvem a partir de linfócitos B.

(ELDER, 2009).

VASCULITE: é um processo clínico-patológico caracterizado por inflamação e necrose de vasos sanguíneos. É frequentemente associada ao comprometimento da luz vascular e alterações isquêmicas relacionadas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

APÊNDICE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

<p>CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA</p>									
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP									
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA									
Título da Pesquisa: Avaliação da resposta inflamatória in situ na Leishmaniose Cutânea Recente.									
Pesquisador: Sérgio Marcos Arruda									
Área Temática:									
Versão: 2									
CAAE: 18763713.6.0000.0040									
Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA									
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio									
DADOS DO PARECER									
Número do Parecer: 533.032									
Data da Relatoria: 13/02/2014									
Apresentação do Projeto:									
<p>Segundo o proponente, as fases iniciais da infecção por Leishmania foram bem descritas em modelos experimentais, revelando que essas lesões se assemelham à doença humana(13), porém, as fases iniciais da leishmaniose humana causada pela L. braziliensis ainda é pouco conhecida nos seus aspectos inflamatórios, padrão morfológico e ultraestrutural. Para melhor compreender a imunopatologia da LC, faz-se necessário avaliar a resposta inflamatória e o envolvimento de citocinas em células mononucleares in situ nas fases iniciais da infecção por L. braziliensis e compará-las com LC clássica ulcerada. Em nossos resultados preliminares temos encontrado presença de amastigotas principalmente nas fases iniciais da infecção e importante infiltrado inflamatório em ambas as fases.</p>									
Objetivo da Pesquisa:									
Objetivo Primário:									
<p>Descrever o aspecto inflamatório celular in situ em biópsias da infecção humana por L. braziliensis na fase inicial comparando-os com a forma de LC clássica ulcerada.</p>									
Objetivo Secundário:									
<ul style="list-style-type: none"> -Quantificar e qualificar área de infiltrado inflamatório; -Quantificar amastigotas imunomarcadas; 									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121</td> <td style="padding: 2px;">CEP: 40.296-710</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Bairro: Candeal</td> <td style="padding: 2px;">Município: SALVADOR</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">UF: BA</td> <td style="padding: 2px;">E-mail: cep@bahia.fiocruz.br</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Telefone: (71)3176-2327</td> <td style="padding: 2px;">Fax: (71)3176-2285</td> </tr> </table>		Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121	CEP: 40.296-710	Bairro: Candeal	Município: SALVADOR	UF: BA	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br	Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3176-2285
Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121	CEP: 40.296-710								
Bairro: Candeal	Município: SALVADOR								
UF: BA	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br								
Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3176-2285								

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 533.032

- Identificar e quantificar por imunohistoquímica(IHQ) linfócitos T CD4+ e CD8+ e respectivas enzimas citotóxicas envolvidas no processo da lesão;
- Identificar e quantificar por IHQ linfócitos B CD20+ e macrófagos CD68+
- Identificar e quantificar por IHQ células mononucleares que expressam TNF;
- Identificar e quantificar por IHQ células mononucleares que expressam IL-10;
- Caracterizar células do infiltrado inflamatório e amastigotas ultraestruturalmente ao microscópio de transmissão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

vide parecer no. 505491

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

vide parecer no. 505491

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram solicitadas algumas adequações:

1. Apresentar TALE;
2. Adequar linguagem do TCLE;
3. Informar como se dará o conhecimento do menor sobre os procedimentos a serem realizados;

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Na resposta à pendências informou que não haverá a participação de menores no estudo.

A adequação da linguagem no TCLE foi apresentada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este projeto, segundo o cronograma apresentado, apresenta dois anos de execução a partir da data deste parecer. Favor apresentar relatórios semestrais e o relatório final.

Endereço: RuaWaldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 533.032

SALVADOR, 18 de Fevereiro de 2014

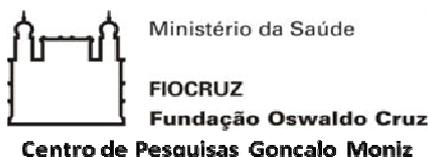
Adriana Lanfredi Rangel

Assinador por:
Adriana Lanfredi Rangel
(Coordenador)

Adriana Lanfredi Rangel
Coordenadora - SIAPE 1558448
Comitê de Ética em Pesquisa
CPEM / FIOCRUZ

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr(a). está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa sobre a doença Leishmaniose. Depois de ser informado sobre a pesquisa, se o(a) senhor(a) aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas cópias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. A sua não participação na pesquisa não afetará, de forma alguma, no seu tratamento.

O projeto de pesquisa tem o título de “Avaliação da resposta inflamatória *in situ* na leishmaniose cutânea recente”.

Objetivo do estudo:

Informamos que o(a) Sr(a). não será beneficiado(a) diretamente por este estudo. Esclarecemos que Os resultados do exame e as informações que o(a) Sr(a). der ao médico contribuirão para realizarmos técnicas de diagnóstico e na busca da cura da Leishmaniose cutânea humana (LC). Utilizaremos os dados clínicos do seu prontuário médico e o material biológico coletado será armazenado ao longo da execução do projeto de pesquisa de acordo com a resolução CNS 441/2011.

Caso o(a) Sr(a). participe desse estudo, sua informações pessoais serão mantidas em segredo e ninguém saberá sobre elas a não ser o pesquisador responsável e sua equipe, pois eles terão acesso aos dados do seu prontuário.

O(a) Sr(a). pode tirar dúvidas a qualquer momento com o pesquisador responsável pelo estudo Dr. Sérgio Arruda (telefone para contato: 71-3176-2232 ou 3176-2252) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-BA, CEP: 40296-710, tel (71) 3176-2285.

Favor assinar e preencher abaixo se estiver de acordo com o convite.

Eu, _____, concordo em participar deste projeto de pesquisa a ser desenvolvido pelo Dr. Sérgio Arruda no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP/CPqGM/Fiocruz), com o apoio do Serviço de Imunologia do Hospital Professor Edgard Santos (SIM - HUPES). Participarei por minha própria vontade, sem receber qualquer remuneração e para ajudar no sucesso da pesquisa.

Procedimentos: Começaremos aplicando uma anestesia local e superficial com o uso de uma seringa. A picada da seringa deve causar um leve e rápido desconforto. Quando a anestesia estiver fazendo efeito, um pedacinho da área da lesão será retirado (biopsia de pele), utilizando um instrumento simples chamado *punch*, esta biopsia servirá para o diagnóstico e pesquisa da

DADOS COMPLEMENTARES

Tabela com sumário de correlações não significativas.

Variável 1	Variável 2	Grupo (n)	p	R
Nº de amastigotas	Área de inflamação (%)	LCR (15)	0,83	0,05 ^a
Nº de amastigotas	Área de inflamação (%)	LCC (28)	0,70	0,07 ^a
Nº de amastigotas	Área de necrose (%)	LCR (15)	0,58	0,20 ^a
Nº de amastigotas	Área de necrose (%)	LCC (28)	0,14	0,32 ^a
Nº de amastigotas	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (14)	0,01	0,74 ^a
Nº de amastigotas	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (28)	0,14	0,09 ^a
Área de inflamação (%)	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (14)	0,18	0,39 ^a
Área de inflamação (%)	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (28)	0,35	-0,18 ^a
Área de necrose (%)	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (14)	0,36	0,27 ^a
Área de necrose (%)	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (28)	0,93	0,01 ^a
Linfócitos T CD3 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (9)	0,52	0,25 ^a
Linfócitos T CD3 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (10)	0,83	0,07 ^a
Linfócitos T CD3 ⁺	Área de necrose (%)	LCR (7)	0,84	-0,08 ^a
Linfócitos T CD3 ⁺	Área de necrose (%)	LCC (10)	0,89	-0,04 ^a
Linfócitos T CD3 ⁺	Nº de amastigotas	LCR (9)	0,84	0,08 ^a
Linfócitos T CD3 ⁺	Nº de amastigotas	LCC (10)	0,80	0,08 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Área de inflamação (%)	LCR (7)	0,10	0,67 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Área de inflamação (%)	LCC (8)	0,60	0,21 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Área de necrose (%)	LCR (6)	0,68	0,2 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Área de necrose (%)	LCC (10)	0,96	0,01 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Nº de amastigotas	LCR (7)	0,08	0,71 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Nº de amastigotas	LCC (8)	0,14	0,54 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (6)	1,00	0,02 ^a
Linfócitos T CD4 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (8)	0,14	0,54 ^a
Linfócitos T CD8 ⁺	Área de inflamação (%)	LCR (15)	0,13	0,40 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Área de inflamação (%)	LCC (27)	0,07	0,34 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Área de necrose (%)	LCR (15)	0,06	-0,48 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Área de necrose (%)	LCC (27)	0,83	-0,04 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Nº de amastigotas	LCR (15)	0,05	0,37 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Nº de amastigotas	LCC (27)	0,51	0,18 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (14)	0,88	-0,02 ^b
Linfócitos T CD8 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (27)	0,91	0,03 ^b
Plasmócitos CD138 ⁺	Área de necrose (%)	LCR (15)	0,56	0,16 ^b
Plasmócitos CD138 ⁺	Área de necrose (%)	LCC (28)	0,64	-0,09 ^b
Plasmócitos CD138 ⁺	Nº de amastigotas	LCR (15)	0,99	-0,00 ^b
Plasmócitos CD138 ⁺	Nº de amastigotas	LCC (28)	0,97	0,00 ^b
Plasmócitos CD138 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCR (14)	0,88	0,04 ^b
Plasmócitos CD138 ⁺	Tamanho da lesão (mm ²)	LCC (28)	0,21	0,24 ^b

NOTA:^a = Correlação linear de Spearman. ^b = Correlação linear de Pearson.