

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

FERNANDA NAZARÉ MORGADO

**COMPARAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR *IN SITU* E *IN VITRO* NA EVOLUÇÃO DAS
DUAS FORMAS MAIS COMUNS DA ESPOROTRICOSE
E DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
HUMANAS**

Rio de Janeiro

2011

**COMPARAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR *IN SITU* E *IN VITRO* NA EVOLUÇÃO DAS
DUAS FORMAS MAIS COMUNS DA ESPOROTRICOSE
E DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
HUMANAS**

FERNANDA NAZARÉ MORGADO

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação *Stricto sensu* em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica em Doenças infecciosas para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Fátima da Conceição-Silva.

Rio de Janeiro

2011

Morgado, Fernanda Nazaré.

Comparação do papel da resposta imune celular *in situ* e *in vitro* na evolução das duas formas mais comuns da esporotricose e da leishmaniose tegumentar americana humanas / Fernanda Nazaré Morgado – Rio de Janeiro, 2011.

118 f.

Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas, 2011.

1. Esporotricose. 2. *Leishmania*. 3. Resposta celular.
4. Lesão ativa. 5. Imunohistoquímica.

CDD

FERNANDA NAZARÉ MORGADO

**COMPARAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR *IN SITU* E *IN VITRO* NA EVOLUÇÃO DAS
DUAS FORMAS MAIS COMUNS DA ESPOROTRICOSE
E DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
HUMANAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
Stricto sensu em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica em
Doenças infecciosas para obtenção do grau de
Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas em 30 de março de 2011.

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Conceição-Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach (Presidente)
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Prof. Dra. Cintia de Moraes Borba
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Prof. Dra. Mônica Bastos de Lima Barros
Escola Nacional de Saúde Pública – Fiocruz

Prof. Dr. Cynthia Silveira Horn
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Prof. Dra. Mariana Reuter Palmeiro (Suplente)
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz

Aos meus filhos Raphaela e Gabriel,
por encherem minha vida de alegria.
Ao meu amado esposo Raphael,
por todo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Fátima Conceição-Silva pelos ensinamentos que levarei por toda a minha vida profissional e pessoal. Obrigada pelo apoio e amizade sempre.

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunoparasitologia.

Ao Dr. Armando Schubach e toda a equipe do VigiLeish por todo apoio científico, clínico e diagnóstico, como também pelo companheirismo nos momentos necessários. Em especial ao Dr. Armando por todo apoio e colaboração à minha permanência nesta Instituição desde os tempos da Iniciação Científica.

A todos os funcionários do IPEC-FIOCRUZ, em especial ao Serviço de Enfermagem e ao Serviço de Coleta, pelo auxílio na obtenção do material biológico usado neste estudo.

Aos vários Serviços que realizaram o diagnóstico laboratorial dos casos: meus agradecimentos.

À Dra Joseli de Oliveira-Ferreira pela revisão criteriosa da tese e dos artigos.

Aos Doutores Armando Schubach, Cynthia Horn, Joseli de Oliveira-Ferreira, Cintia Borba, Mônica Bastos de Lima Barros e Mariana Reuter Palmeiro por aceitarem participar da banca de defesa desta tese. Desde já agradeço as críticas e sugestões.

À Coordenação da Pós-graduação, na figura de seus secretários, meus agradecimentos pela colaboração e auxílio.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas – IPEC – FIOCRUZ pela dedicação e paciência.

Aos pacientes que padecem de esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, pois são o motivo para a realização do estudo e sem os quais ele seria impossível.

Ao IOC- e IPEC-FIOCRUZ, ao CNPq e à Faperj pelo auxílio financeiro.

À minha mãe, pois sem ela eu nada seria.

À Deus, pela saúde e força para superar os obstáculos mais difíceis.

Morgado, F N. **Comparação do papel da resposta imune celular *in situ* e *in vitro* na evolução das duas formas mais comuns da esporotricose e da leishmaniose tegumentar americana humanas.** Rio de Janeiro, 2011. 103 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A esporotricose é produzida por inoculação traumática do fungo *Sporothrix schenckii* no tegumento cutâneo do homem e outros animais suscetíveis. No local surge reação inflamatória com aspecto nodular que tende à ulceração. A lesão pode ficar restrita ao local ou se estender no trajeto dos vasos linfáticos regionais. Apesar de alguns dados já publicados, o papel da resposta imune na esporotricose ainda não é totalmente esclarecido. Estudar os mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção pode auxiliar na compreensão dos fatores envolvidos no aparecimento das diversas formas clínicas. Devido à semelhanças clínicas com outras doenças granulomatosas da pele, em especial a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) endêmica no Rio de Janeiro, a observação de marcadores específicos para cada doença seria útil para o diagnóstico diferencial. O objetivo desta tese foi comparar dados qualitativos e quantitativos das populações celulares e marcadores funcionais envolvidos na resposta imune celular de pacientes com esporotricose (forma cutânea fixa e forma cutânea-linfática) e com LTA. Foram utilizadas as técnicas de imunohistoquímica e Elispot. Foram evidenciadas diferenças na reação inflamatória *in situ* e sistêmica entre as formas clínicas da esporotricose e LTA. Foram observadas diferenças na expressão sistêmica e *in situ* de IFN- γ e IL-10 entre indivíduos sadios e pacientes acometidos por esporotricose, LTA e outras etiologias (lesões bacterianas, dermatofitose, úlceras hipertensivas e de estase). A técnica de quantificação de células produtoras de IFN- γ através de Elispot se mostrou uma ferramenta útil para o diagnóstico diferencial entre a esporotricose e a LTA quando a visualização do agente etiológico não for possível. Em conjunto os dados possibilitaram a redação de três artigos científicos, um já publicado, e permitiram o entendimento de alguns aspectos da resposta imune em pacientes acometidos principalmente de esporotricose.

Palavras-chave: 1. Esporotricose. 2. Leishmania. 3. Resposta Celular. 4. Lesão Ativa. 5. Imunohistoquímica

Morgado, F N. **Evaluation of the role of cellular immune response in situ and in vitro on evolution of the two most common types of human sporotrichosis and american tegumentary leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2011.103 f. Tese [Science dissertation in Clinic research in infectious diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a mycosis caused by *Sporothrix schenckii* through traumatic inoculation in human's and other susceptible animals' skin. In the beginning, there is an inflammatory reaction with nodular aspect and tendency to ulceration. The skin lesion can be as localized or disseminate through lymphatic vessels. Although some aspects of sporotrichosis have been discussed, the role of immune response in sporotrichosis has not been fully elucidated. The analysis of immunopathological aspects of sporotrichosis could highlight the mechanisms related to various clinical presentations. Due to clinical similarities to other granulomatous skin diseases, especially endemic ATL in Rio de Janeiro, the results evidenced some useful aspects for differential diagnosis. The study was done in order to compare cell profile and functional markers related to cellular immune response between sporotrichosis (lymphocutaneous and fixed forms) and ATL patients. The clinical samples were analyzed through immunohistochemical and Elispot methods. Differences in the *in situ* and systemic inflammatory reaction between sporotrichosis and ATL patients were observed. Differences in systemic and *in situ* IFN- γ and IL-10 expression between healthy subjects and sporotrichosis, ATL and others etiologies (bacterial lesions, dermatophytosis, hypertensive ulcer and stasis ulcer) patients were observed. The data obtained by interferon gamma Elispot assay suggest this method is useful for differential diagnosis between sporotrichosis and ATL patients when the etiological agent cannot be determined. Altogether, the data were organized in three papers, one paper has been already published, and the data highlighted some aspects of immune response especially in sporotrichosis patients.

Keywords: 1. sporotrichosis. 2. *Leishmania*. 3. Cellular response. 4. Skin lesions. 5. Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

p.

Artigo 1 The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis

- Figure 1 Patients with sporotrichosis showing typical lesions (a) the lymphocutaneous form (LC) and (b) the fixed cutaneous form (F);(c, d) demonstration of neutrophils (red, red arrows) and fungal cells (brown, black arrows) by immunohistochemistry. Original magnification: 400 X (scale bar = 25 μ m); (e, f) neutrophilic elastase-positive cells forming neutrophil extracellular traps (red arrows). Original magnification: 200 X (scale bar = 50 μ m)..... 24
- Figure 2 Number of (a) fungal cells/mm², (b) neutrophilic elastase-positive cells, (c) CD68⁺ cells, (d) CD3⁺ cells, (e) CD4⁺ cells, (f) CD8⁺ cells, (g) CD22⁺ cells, and (h) CD1a⁺ cells/mm² tissue in lesions of patients with the lymphocutaneous (LC) and the fixed form (F) of sporotrichosis. The line indicates the median of the group. A p value < 0.05 was considered significant..... 27
- Figure 3 Expression of (a) NOS2 and percentage of (b) CLA⁺ cells, (c) Ki-67⁺ cells, (d) granzyme B⁺ cells, (e) E-selectin⁺ cells, (f) Bcl-2⁺ cells, (g) Bax⁺ cells and (h) FasL⁺ cells in lesions of patients with the lymphocutaneous (LC) and the fixed form (F) of sporotrichosis. The line indicates the median of the group. A p value < 0.05 was considered significant..... 29

Artigo 2 Differences in the *in situ* inflammatory reaction of the American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis as an example of the skin immune system response patterns

- Figure 1 Comparison of the clinical presentations of patients with the fixed (A) or lymphocutaneous (C) form of sporotrichosis (SP) and localized (B) or sporotrichoid (D) American tegumentary

leishmaniasis (ATL). Note the similarities between the forms of SP and ATL.....	57
Figure 2 Distribution of (A) CD3 ⁺ cells, (B) CD8 ⁺ cells, (C) CD68 ⁺ cells, (D) nitric oxide synthase 2 (NOS2) expression, (E) neutrophilic elastase-positive cells, (F) Fas ⁺ cells, (G) FasL ⁺ cells, and (H) Ki-67 ⁺ cells. The line indicates the median of the group. p < 0.05 was considered statistically significant. LC, lymphocutaneous form of sporotrichosis; F, fixed cutaneous form of sporotrichosis; ATL, American tegumentary leishmaniasis.....	58
Figure 3 NOS2 expression (A,C,E) and neutrophils (B,D,F) in active lesions of ATL (A,B), LC (C,D), and F (E,F) patients. Magnification 200× (scale bar = 50 μm). ATL, American tegumentary leishmaniasis; LC, Lymphocutaneous form of sporotrichosis; F, fixed form of sporotrichosis.....	59
 Artigo 3 Differences in interferon gamma and IL-10 expression between sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis patients detected by elispot assay	
Figure 1 Number of IFN-γ responder cells/2 x 10 ⁵ cells from peripheral blood (a) no stimulation, (b) Ss-Ag stimulation, (c) Lb-Ag stimulation, (d) specific-antigen stimulation. OE – others etiologies; LC – lymphocutaneous sporotrichosis; F- fixe sporotrichosis; ATL – American tegumentary leishmaniasis.....	83
Figure 2 Number of IFN-γ responder cells/2 x 10 ⁵ cells from active lesion (a) no stimulation, (b) Ss-Ag stimulation, (c) Lb-Ag stimulation. LC – lymphocutaneous sporotrichosis; F- fixe sporotrichosis; ATL – American tegumentary leishmaniasis.....	84
Figure 3 Number of IL-10 responder cells/2 x 10 ⁵ cells from peripheral blood (a) no stimulation, (b) Ss-Ag stimulation, (c) Lb-Ag stimulation, (d) specific-antigen stimulation. OE – others	

etiologies; LC – lymphocutaneous sporotrichosis; F- fixe
sporotrichosis; ATL – American tegumentary leishmaniasis..... 85

LISTA DE TABELAS

	p.
Artigo 1 The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis	
Table 1 Clinical data of patients with the lymphocutaneous (LC) and fixed cutaneous forms of sporotrichosis.....	26
Table 2 Intensity of the inflammatory infiltrate in active lesions of patients with the lymphocutaneous (LC) and fixed cutaneous forms of sporotrichosis.....	26
Table 3 Cellular markers profile in lesions of lymphocutaneous (LC) or fixed (F) forms of sporotrichosis.....	28
Table 4 Number of patients with lymphocutaneous (LC) and fixed cutaneous (F) forms of sporotrichosis according to the intensity of NOS2 and E-selectin expression.....	28
Artigo 2 Differences in the <i>in situ</i> inflammatory reaction of the American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis as an example of the skin immune system response patterns	
Table 1 Distribution of age, duration of infection and number of lesions in patients.....	53
Table 2 Intensity of the inflammatory infiltrate in the lesions of patients.	54
Table 3 Percentage composition of cell types and inflammatory markers in American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis lesions.....	55
Artigo 3 Differences in interferon gamma and IL-10 expression between sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis patients detected by elispot assay	
Table 1 Frequency of positive and negative IFN-g responses to Ss-Ag and Lb-Ag by PBMC between LC, F, ATL and OE patients.....	80
Table 2 Frequency of positive and negative IL-10 responses to Ss-Ag	

and Lb-Ag by PBMC between LC, F, ATL and OE patients..... 81

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS – acquired immunodeficiency syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida)

ATL – American tegumentary leishmaniasis (leishmaniose tegumentar Americana)

BCIP - 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

CFU – colony forming unit (unidade formadora de colônia)

CLA – cutaneous lymphocyte antigen (antígeno de linfócito cutâneo)

ConA – Concanavalin A

DAB – diaminobenzidine

DGC – doença granulomatosa crônica

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)

Elispot – Enzyme-linked immunosorbent spot assay

F – forma cutânea-fixa (fixed cutaneous form)

FCS – fetal calf serum (soro fetal bovino)

HIV – human immunodeficiency vírus (virus da imunodeficiência humana)

IFA – immunofluorescence assay (ensaio de imunofluorescência)

IFN- γ – interferon-gama (Interferon gamma)

IgG – imunoglobulina G

Lb-Ag – antígenos de *Leishmania braziliensis*

LC – lymphocutaneous form (forma cutânea-linfática)

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

NBT – nitro blue tetrazolium

NET – neutrophil extracellular trap (redes extracelulares de neutrófilos)

NO – nitric oxide (óxido nítrico)

NOS2 – nitric oxide synthase 2 (óxido nítrico sintase 2)

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

RNA-m – ácido ribonucléico mensageiro

ROI – intermediários reativos do oxigênio

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

SALT – skin associated lymphoid tissue (tecido linfóide associado à pele)

SIS – skin immune system (sistema immune da pele)

Ss-Ag – antígenos de *Sporothrix schenckii*

TH – T helper (célula T auxiliar)

TLR – toll like receptor (receptor semelhante ao toll)

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A DOENÇA E SEU AGENTE.....	1
1.2 A RESPOSTA IMUNE NA ESPOROTRICOSE.....	5
1.3 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E SEU AGENTE.....	11
1.4 A RESPOSTA IMUNE NA LTA.....	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO	21
4.1 THE <i>IN SITU</i> INFLAMMATORY PROFILE OF LYMPHOCUTANEOUS AND FIXED FORMS OF HUMAN SPOROTRICHOSIS.....	22
4.1.1 Artigo publicado no periodic Medical Mycology	23
4.1.2 Conclusões referentes ao artigo publicado no periódico Medical Mycology	32
4.2 DIFFERENCES IN THE <i>IN SITU</i> INFLAMMATORY REACTION OF THE AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS AND SPOROTRICHOSIS AS AN EXAMPLE OF THE SKIN IMMUNE SYSTEM RESPONSE PATTERNS.....	33
4.2.1 Registro de submissão à revista Microbes and Infection	35
4.2.2 Differences in the <i>in situ</i> inflammatory reaction of the American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis as an example of the skin immune system response patterns...	36
4.2.3 Conclusões referentes ao artigo submetido à revista Microbes and Infection	60
4.3 DIFFERENCES IN INTERFERON GAMMA AND IL-10 EXPRESSION BETWEEN SPOROTRICHOSIS AND AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS PATIENTS DETECTED BY ELISPOT ASSAY.....	61
4.3.1 Differences in interferon gamma and IL-10 expression between sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis patients detected by elispot assay	62
4.3.2 Conclusões referentes ao terceiro artigo	86
5 DISCUSSÃO GERAL	87
5.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE.....	87
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	96
6 CONCLUSÕES	100

6.1	ESPOROTRICOSE.....	100
6.2	ESPOROTRICOSE X LTA.....	100
6.3	GERAIS.....	101
7	PERSPECTIVAS.....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
	ANEXOS.....	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESPOROTRICOSE E SEU AGENTE

A esporotricose é uma micose subcutânea causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. É doença cosmopolita, mas a maioria dos casos é relatada no Japão e nas Américas do Norte e Sul (Kauffman 1999). O microrganismo é encontrado em solo e vegetação e a infecção se dá por inoculação traumática (Chapman & Daniel 1994).

Em temperaturas na faixa de 25 a 30° C, há o crescimento fúngico na forma de micélio filamentosos septado, podendo ser cultivado em meios de cultura padrões como Sabouraud dextrose ágar. Poucos dias após a semeadura, o fungo forma colônias de coloração creme que escurecem nas semanas subsequentes. Nestas condições produz conídios hialinos ou escuros ao longo e hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas, que devido a sua disposição tipo pétalas de flor apresentam aspecto de rosetas. Pode ser cultivado a 37° C em meios suplementados como o BHI (infusão de cérebro e coração). Nesse caso apresenta-se na fase leveduriforme e as características microscópicas se assemelham às encontradas no sítio das lesões. *In vivo*, a 37°C, *S. schenckii* se apresenta na forma de leveduras que se reproduzem por brotamento. Apresentam de 4 – 6 µm de diâmetro com forma navicular, charuto, redondo, oval ou globuloso. Contudo, algumas cepas crescem melhor em temperaturas não superiores a 35°C. Estas cepas são geralmente isoladas da forma fixa da doença (Kauffman 1999).

Classicamente, a doença é considerada ocupacional, de maior ocorrência no sexo masculino e em profissões como jardineiros, fazendeiros e horticulturistas (Chapman & Daniel 1994). Nestes casos, afeta na maioria das vezes as mãos e pés. No entanto, nos últimos anos houve uma mudança na transmissão da doença no Rio de

Janeiro. Durante o período de 1987 a 1998, foram relatados 13 casos de esporotricose humana pelo antigo Centro de Pesquisa do Hospital Evandro Chagas, hoje Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Barros et al. 2004). Destes, dois casos estavam associados a arranhaduras de gatos. Posteriormente houve um grande aumento da incidência da doença: entre 1998 e 2001 um total de 178 casos com cultura positiva para *S. schenckii* foram diagnosticados. Destes, 156 casos apresentaram histórico de contato domiciliar ou profissional com gatos com esporotricose e 97 foram arranhados ou mordidos (Barros et al. 2004). Neste mesmo período, Schubach et al. (2004) descreveram a apresentação clínica e tratamento de 347 gatos com a doença. Os gatos desenvolvem infecção grave, frequentemente fatal, caracterizada por úlceras crônicas de pele e/ou acometimento do sistema respiratório, podendo disseminar para outros órgãos (Kauffman 1999). Schubach et al. (2001) isolaram o fungo das unhas de gatos domésticos e, em trabalho posterior, (Schubach et al. 2002) foram capazes de isolá-lo a partir de animais não doentes contatos domiciliares de animais acometidos por esporotricose. Neste mesmo estudo (Schubach et al. 2002), o fungo foi isolado em 100% dos animais doentes, a partir de diversos espécimes clínicos, incluindo lesões cutâneas, cavidades oral e nasal, unhas, sangue e testículos, sugerindo a disseminação do patógeno pelo organismo de gatos reforçando o potencial zoonótico da esporotricose felina. Associado ao comportamento natural destes animais e a necessidade de lutas por território, o gato passou a ser o principal transmissor da doença nesta epidemia. Assim, a transmissão zoonótica, anteriormente considerada ocasional, tornou-se a forma mais comum de transmissão afetando mais frequentemente mulheres (Barros et al. 2004), o que caracterizou uma mudança das características epidemiológicas desta micose em nosso meio. A análise genotípica de diferentes isolados de pacientes humanos e de gatos evidenciou que os isolados eram idênticos ou muito similares sugerindo uma fonte comum de infecção tanto para o ser humano quanto para os gatos (Reis et al. 2009). Por ser o gato mais suscetível e apresentar maiores cargas fúngicas associado ao seu comportamento natural, ficou claro o seu papel de disseminador de *S. schenckii*.

No ser humano, clinicamente a esporotricose se manifesta como infecção cutânea e subcutânea de evolução subaguda à crônica (Kauffman 1999). A infecção

costuma ocorrer após um pequeno trauma com rompimento da integridade da epiderme. Uma vez inoculado, o fungo penetra em camadas mais profundas, onde adquire a forma parasitária, leveduriforme, podendo permanecer localizado no tecido subcutâneo (forma cutânea fixa), estender-se aos linfáticos (forma cutâneo-linfática) ou mais raramente disseminar-se à distância pela corrente sanguínea (forma cutânea disseminada ou sistêmica) (Schubach et al. In: Coura 2006).

A forma cutâneo-linfática é a manifestação mais comum da infecção por *S. schenckii* (Kauffman 1999, Lopes-Bezerra et al. 2006). No sítio de inoculação, a lesão primária se desenvolve em dias a semanas, após a inoculação de conídios na pele ou no tecido subcutâneo. A lesão inicialmente se apresenta como pápula, que gradualmente aumenta de tamanho formando nódulo que frequentemente ulcera. A progressão da infecção é caracterizada por lesões nodulares que aparecem ao longo do trajeto linfático. Alguns pacientes não manifestam a disseminação linfática e mantêm lesão cutânea fixa, que persiste no sítio de inoculação. Esta lesão pode se apresentar como placas ou aspecto verrucoso, e mais frequentemente úlcera.

A forma cutânea disseminada tem sido observada principalmente em pacientes imunossuprimidos, especialmente indivíduos HIV positivos (Lopes-Bezerra et al. 2006).

A forma mucosa não é comum. Afeta preferencialmente a conjuntiva (Vieira-Dias et al. 1997; Schubach et al. 2005), mas também pode ocorrer em nariz (Kumar et al. 2005), boca e faringe (Lopes-Bezerra et al. 2006).

As formas extracutâneas são pouco comuns. Entre estas o envolvimento pulmonar e osteoarticular são os mais relatados (Badley & van Scoy 1996, Ramirez et al. 1998, Callens et al. 2006). As manifestações da esporotricose pulmonar são semelhantes àquelas da tuberculose pulmonar. É descrito a associação com doença obstrutiva crônica e alcoolismo. A febre, suor noturno, anorexia, perda de peso e fadiga são sintomas comuns. Tosse produtiva com escarro purulento, hemoptise e dispnéia são queixas pulmonares freqüentes. A infecção osteoarticular pode ocorrer tanto a partir de inoculação cutânea quanto por disseminação hematogênica a partir dos pulmões (Kauffman 1999).

A exemplo da forma cutânea disseminada, a forma sistêmica tem sido pouco relatada e é mais comum em pacientes com comprometimento do sistema imunológico.

Pacientes com AIDS constituem grupo de risco para esporotricose sistêmica e cutânea disseminada. Nestes pacientes, pode ocorrer disseminação para meninges, e as lesões de pele são frequentemente ulcerações atípicas com mínima resposta inflamatória (Kauffman 1999).

No Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2001 a forma cutâneo-linfática foi a mais comum totalizando 55,6% dos casos, seguido pela forma cutânea fixa que atingiu 25,3%. A forma mucosa foi detectada em 2,8% e 16,3% apresentaram a forma cutânea disseminada (Barros et al. 2004).

Devido à diversidade das formas clínicas da esporotricose, algumas condições patológicas que devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial (Lopes-Bezerra et al. 2006). Por exemplo, as formas cutâneas devem ser diferenciadas da leishmaniose, nocardiose, cromoblastomicose, blastomicose, paracoccidioidomicose e infecções por micobactérias. A forma pulmonar deve ser diferenciada da histoplasmose, blastomicose, coccidioidomicose, tuberculose e sarcoidose (Kauffman 1999).

O diagnóstico definitivo da esporotricose depende do isolamento do fungo a partir do sítio de infecção. O material pode ser coletado com “swab”, por aspirado da lesão cutânea ou ser proveniente de biópsia. Outros espécimes clínicos têm sido relatados como possíveis para uso em diagnóstico como escarro, fluido sinovial, fluido cérebro-espinhal, e mais raramente sangue. Geralmente o isolamento primário é realizado em Sabouraud dextrose Agar adicionado de antibióticos mantido à temperatura ambiente e costuma ser bastante eficiente. A conversão para a forma de levedura a 37° C deve ser realizada para confirmar o diagnóstico da esporotricose (Kauffman 1999).

O exame histopatológico das lesões de pele geralmente revela uma inflamação mista granulomatosa e piogênica, com células gigantes multinucleadas e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Colorações especiais, como ácido periódico de Schiff e prata metenamina, são necessárias para identificação das leveduras no tecido. No entanto, na esporotricose os fungos são de difícil visualização direta (Kauffman 1999). Em trabalho recente, foram observados granulomas em todas as amostras de tecidos de pacientes acometidos por esporotricose no Rio de Janeiro (Quintella et al. 2011). Foram observados granulomas supurativos em 84% e dermatite difusa em 95,8% dos

pacientes. Necrose caseosa e de liquefação estiveram presentes em 65,5% e 43,7% dos pacientes, respectivamente.

Quando o parasita não é identificado o diagnóstico conclusivo pode ser bastante complexo. Mesmo testes imunológicos que teoricamente seriam específicos, como a sorologia e os testes intradérmicos, podem apresentar reações duvidosas. Neste contexto, Barros et al. (2005) analisaram 52 pacientes com esporotricose confirmada por isolamento do fungo e observaram positividade no teste intradérmico de Montenegro em 39% dos casos. Os soros de 6,7% dos pacientes geraram respostas positivas em reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e 22,2% em ELISA para leishmaniose. Assim, a confirmação parasitológica torna-se ainda mais importante no Rio de Janeiro onde há a sobreposição de áreas endêmicas para leishmaniose e esporotricose, e existe a possibilidade do diagnóstico incorreto baseado no aspecto das lesões, informações epidemiológicas e testes imunológicos.

Diferentes regimes terapêuticos podem ser adotados para o tratamento da esporotricose incluindo iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina, fluconazol e anfotericina B. A escolha é baseada na condição clínica do indivíduo, extensão das lesões cutâneas, envolvimento sistêmico, avaliação de interações medicamentosas e efeitos adversos (Lopes-Bezerra et al. 2006). Atualmente o itraconazol é a droga de primeira escolha e a regressão completa das lesões ocorre em torno do 3º mês de tratamento, que deve ser mantido por no mínimo quatro semanas após a resolução das lesões. Por ser um tratamento prolongado, dois fatos devem ser considerados: os iodetos são pouco tolerados devido a sua alta toxicidade e o alto custo do itraconazol dificulta seu uso nos países em desenvolvimento (Chapman & Daniel 1994, Schubach et al. In: Coura 2006).

1.2 A RESPOSTA IMUNE NA ESPOROTRICOSE

A pele e a mucosa intactas promovem uma significativa barreira à invasão por fungos. A desestabilização desta barreira, como em queimaduras ou feridas

traumáticas, possibilitam invasão local e fungemia. Uma vez esta defesa local sendo insuficiente, a próxima linha de defesa são os leucócitos polimorfonucleares. Os neutrófilos podem exercer a sua atividade antifúngica por fagocitose e eliminação intracelular de conídios e leveduras através de mecanismos dependentes ou independentes de oxigênio (Cunningham et al. 1979, Lei et al. 1993, Chapman & Daniel 1994). Sua atividade antifúngica direcionada para hifas é, no entanto, primariamente extracelular (Chapman & Daniel 1994).

Receptores do tipo *Toll* têm sido implicados no reconhecimento de vários patógenos, inclusive no reconhecimento de *S. schenckii* em infecção experimental utilizando camundongos deficientes de TLR-4 (Sassá et al. 2009). Observou-se que animais deficientes apresentavam redução da translocação de NFκ-β, além da redução tanto de mediadores pró-inflamatórias (óxido nítrico e TNF-α) quanto citocina anti-inflamatória (IL-10), sugerindo o envolvimento deste receptor no reconhecimento do *S. schenckii*.

Quando a resposta imune inata não é suficiente para conter a infecção, a imunidade celular mediada por linfócitos T, citocinas e macrófagos ativados passam a ser os maiores efetores da resistência imune adquirida contra as infecções fúngicas. Contudo, a doença varia com o estado imunológico do hospedeiro. Pacientes com imunidade celular deficiente, incluindo aqueles tratados com agentes citotóxicos ou esteróides, transplantados, doenças metabólicas descompensadas como o diabetes mellitus, linfomas ou AIDS, constituem grupo de risco para infecções fúngicas invasivas (Chapman & Daniel 1994, al-Tawfiq & Wood 1998, Ware et al. 1999, Callens et al. 2006). No entanto, *S. schenckii* é considerado um patógeno verdadeiro e mesmo hospedeiros hígidos apresentam risco de infecção assim como aqueles imunodeprimidos.

No caso particular da esporotricose, são poucos os trabalhos na literatura que apresentam como foco de estudo a resposta imune, sendo a grande maioria no modelo murino de infecção experimental. A partir destes estudos tem sido sugerida a importância da imunidade celular na resistência do hospedeiro a esta infecção fúngica (Carlos et al. 2009). Camundongos atímicos (nu/nu) reconstituídos com timócitos normais apresentaram maior resistência à infecção intravenosa com *S. schenckii* do

que aqueles nu/nu intactos, sugerindo que células derivadas do timo participam na resistência à infecção (Dickerson et al. 1983). Shiraishi et al. (1992), estudando estes mesmos camundongos atímicos homozigotos, e comparando com infecção em camundongos heterozigotos (nu/+), observaram que nu/nu continham maiores quantidades de fungos, sugerindo a participação de células T na inibição do crescimento fúngico. Através de ensaios de inibição e ativação de macrófagos, e análise de fagocitose e morte de fungos, observaram que estas células ativadas também apresentavam função importante na resistência à infecção.

Tachibana et al. (1999) mostraram que a imunidade protetora contra *S. schenckii* no modelo murino de infecção experimental era expressa principalmente por macrófagos ativados por células TCD4⁺. Os autores determinaram através de RT-PCR a expressão de RNA-m de IFN- γ , TNF- α e IL-10 nas células linfonodais de camundongos imunes, após estimulação frente ao fungo morto por aquecimento. Ao contrário das citocinas de tipo 1, a expressão de IL-4 não foi observada (citocina chave da resposta do tipo TH2). Baseados nestes dados os autores sugeriram que linfócitos do tipo TH1 são induzidos após imunização com *S. schenckii* e estão relacionados à resistência à infecção. Estes autores também observaram que esta resistência não era alterada pela transferência passiva de soro imune, corroborando mais uma vez a importância da resposta imune do tipo celular na imunopatologia da esporotricose.

Carlos et al. (1992) estabeleceram um modelo de doença sistêmica em camundongos a partir da infecção intravenosa e intraperitoneal com leveduras. Os autores observaram uma depressão da resposta imune celular entre a 4^a e 6^a semana de infecção, associada ao agravamento da doença. O mesmo grupo, posteriormente, observou que a deficiência da resposta celular coincidia com a redução marcante de IL-1 e TNF- α (Carlos et al. 1994). Maia et al. (2006) observaram valores elevados de NO e NOS2 durante este período de depressão e alta carga fúngica. Sugeriram, então, uma atividade supressora de NO durante a infecção fúngica. Após 5^a e 6^a semanas houve aumento da produção de IL-4 sugerindo a participação da resposta TH2 nos estágios avançados da esporotricose.

Silva et al. (2001) compararam a evolução de distintas linhagens de camundongos infectados experimentalmente e observaram que a resistência era

conseqüência da redução da carga fúngica tecidual, imunidade mediada por célula T específica e consistente, e atividade de TNF- α no início da infecção. Na linhagem suscetível estas respostas não foram precocemente observadas e a ausência de resposta de células TCD4⁺ na primeira semana de infecção pôde explicar a não eliminação do patógeno. No entanto, esta linhagem após a primeira semana de infecção mostrou aumento dos níveis de TNF- α e resposta do tipo tardia. Também houve expansão e aumento de focos granulomatosos e CFU (unidades formadoras de colônia) no baço. A expansão dos focos granulomatosos e aumento de TNF- α e carga fúngica tecidual em níveis elevados induziram severa destruição tecidual, falha geral dos órgãos, caquexia e morte dos animais suscetíveis.

Os resultados aparentemente conflitantes podem ser devidos a diferenças intrínsecas nos modelos ou na intensidade de resposta. Desta forma, a resposta imune celular bem modulada seria importante para o controle da infecção e em casos de exacerbação da função efetora a lesão tecidual conseqüente poderia ser agravada. Estes dados são muito semelhantes aos identificados em outras patologias cutâneas, notadamente na leishmaniose (Gaze et al. 2006).

Ainda com relação à função efetora da resposta imune, Kajiwara et al. (2004) estudando camundongos com doença granulomatosa crônica (DGC) sugeriram que a deficiência da NADPH oxidase é fator de risco para infecção letal por *S. schenckii* e que ânions superóxidos e seus metabólitos oxidantes produzidos por neutrófilos e macrófagos estão envolvidos nas atividades fungistáticas e fungicidas. Mostraram que o defeito da NADPH oxidase resultava na incapacidade de eliminar e controlar o microrganismo no sítio de infecção apesar da aparente resposta inflamatória, resultando em disseminação do fungo a órgãos internos e eventual morte. Este dado corrobora a importância do estudo da resposta imune no foco de lesão e sua possível função no controle da carga fúngica e contenção da infecção.

Alguns estudos mostraram a influência de componentes da parede do fungo na resposta imune (Carlos et al. 1998, Nascimento & Almeida 2005, Maia et al. 2006). Nascimento e Almeida (2005) avaliaram a produção de anticorpos e determinaram os componentes antigênicos envolvidos na resposta imune humoral na infecção experimental. Os autores observaram que os soros de todos os animais testados

tinham anticorpos que reagiam apenas ao antígeno de 70 kDa com predominância de IgG1 e IgG3, ou seja, antígenos de *S. schenckii* induziram resposta humoral específica em camundongos infectados. O aumento de imunoglobulinas específicas coincidiu com a redução da carga fúngica, mostrando que a resposta imune humoral específica poderia estar relacionada à proteção em camundongos ou a efeito secundário da destruição do patógeno.

A melanina é um pigmento identificado na parede de diversos fungos, inclusive em leveduras e conídios de *S. schenckii* (Almeida-Paes et al. 2009). Em estudo recente, isolados capazes de produzir melanina foram comparados aos isolados deficientes deste pigmento, através da inoculação experimental em ratos (Madrid et al. 2010). Observou-se que isolados produtores de melanina apresentavam maior capacidade de invasão tecidual e formação de granulomas multifocais. Já as cepas albinas induziam uma reação inflamatória mais acentuada com a contenção de células fúngicas no centro dos granulomas.

Teixeira et al. (2009) evidenciaram a correlação entre a expressão de adesinas e fibronectinas de superfície das leveduras de diferentes isolados humanos e ambientais com a virulência após infecção experimental em modelo murino. A virulência foi avaliada pela curva de sobrevivência dos animais, disseminação, aspectos macroscópicos e microscópicos dos órgãos, carga fúngica e capacidade de adesão. Apesar da evidenciação de correlação entre capacidade de adesão e virulência em camundongos, não foi possível correlacionar a virulência dos isolados com as formas clínicas das quais as cepas foram isoladas.

Apesar de excelente, o modelo murino pode não se mostrar apropriado para a compreensão de fatores relacionados à evolução clínica das diferentes formas de apresentação da esporotricose humana, no entanto, devido à escassez de casos, as informações existentes na literatura sobre a resposta imune específica ao *S. schenckii* em pacientes é inconsistente. Um dos poucos resultados existentes na literatura foi publicado por Plouffe et al. (1979). Os autores estudaram a resposta imune mediada por células em pacientes com esporotricose cutânea ou sistêmica. Os resultados mostraram que nos pacientes com doença grave a resposta celular está diminuída se comparada com pacientes apresentando doença localizada. Um dado importante é o

estudo feito por Streilein et al. (1978), verificando a possibilidade de indivíduos sem história de doença apresentarem teste intradérmico e resposta proliferativa primária positiva a antígenos de *S. schenckii*. Como todos os pacientes apresentavam resposta a *Candida albicans*, os autores sugeriram a possibilidade de reação cruzada entre antígenos dos dois fungos. Mais intrigantes ainda foram os resultados obtidos por Barros et al. (2005) que demonstraram a presença de reação positiva ao teste intradérmico e à sorologia para detecção de infecção por protozoários do gênero *Leishmania* em indivíduos com esporotricose e sem história clínica ou epidemiológica de Leishmaniose. Ainda precisa ser determinado se a presença desta reação cruzada é específica ou inespecífica, mas esta observação torna a diferenciação diagnóstica entre as duas infecções ainda mais difícil nas áreas onde a transmissão se superpõe. Encontrar meios de identificar corretamente o agente da infecção nos casos em que o mesmo não pode ser identificado seria de grande valia no manejo dos pacientes.

Resultados preliminares de nosso grupo apontam para a heterogeneidade de resposta celular *in vitro* em pacientes com fase ativa da esporotricose (dados não publicados). No entanto, um maior número de pacientes deve ser estudado para verificar possíveis perfis de respostas associados à formas clínicas ou diferentes tipos de evolução das lesões inclusive no tocante à resposta ao tratamento. Com a possibilidade de acesso ao material biológico de pacientes infectados durante a epidemia atual da doença em nosso meio, estamos diante de uma oportunidade ímpar de estudar esta micose.

Se pouca informação foi publicada no tocante à resposta imune sistêmica, menos ainda tem sido relatado no contexto da resposta imune *in situ*. Ao nosso conhecimento, existem apenas dois trabalhos, publicados pelo mesmo grupo de autores, onde a resposta imune local foi avaliada em apenas cinco pacientes (Koga et al. 2001, Koga et al. 2002). Na publicação de 2001 verificaram que 0,2 a 0,8% das células do inflamatório eram células dendríticas. No trabalho publicado em 2002, observaram um infiltrado misto de células CD4⁺ e CD8⁺ nestas lesões, e células IFN- γ ⁺, semelhantes a células linfóides mononucleares na periferia dos granulomas. Curiosamente, não foi encontrada expressão de NOS2 em nenhuma das amostras estudadas.

Como o acometimento principal da esporotricose ocorre no tegumento cutâneo nos parece importante a compreensão da dinâmica do processo inflamatório tanto ao nível sistêmico quanto no compartimento tegumentar. Os imunologistas durante muito tempo negligenciaram a pele. O tegumento cutâneo era visto como órgão de choque ou barreira inata à entrada de agentes agressores, situação esta que vem mudando ao longo dos últimos anos. Na revisão publicada por Spellberg (2000) a pele é descrita como um órgão que cobre uma superfície de aproximadamente 2 m² e, representa pelo peso (16% do peso corporal) o maior órgão do corpo humano. Em particular, o tegumento cutâneo hoje é descrito como sendo fundamental no desenvolvimento e seleção da resposta imune a vários agentes causais (Conceição-Silva et al. 1990, Pirmez et al. 1990, Conceição-Silva et al. 1994, Ahmed et al. 1994, Conceição-Silva et al. 1998, Khanolkar-Young et al. 1998, Orteu et al. 1998, Bertho et al. 2000). Hoje podemos falar inclusive em sistemas organizados como o sistema imunológico da pele (SIS – skin immune system; SALT – skin associated lymphoid tissue) (Bos & Kapsenberg 1993, Spellberg 2000) e dos folículos pilosos (Christoph et al. 2000). Chapman e Daniel (1994) já apontavam que o estudo da pele e de suas lesões era de grande valia, pois a pele frequentemente representava um “sistema de alarme recente” das infecções graves. Em pacientes infectados com HIV, as infecções fúngicas de membranas mucosas, pele e unhas podem ser as primeiras indicações de imunodeficiência severa. Assim, nos últimos anos uma grande quantidade de conhecimento sobre este órgão tem se acumulado, ajudando a se montar um quebra-cabeça bem mais complexo do que se imaginava inicialmente. Neste sentido, o estudo *in situ* das lesões de esporotricose pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório localizado. Este conhecimento pode gerar novas abordagens no manejo clínico dos pacientes com esporotricose.

1.3 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E SEU AGENTE

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre através da

picada do inseto vetor, pertencente ao gênero *Lutzomya*, cujas espécies envolvidas dependem da localização geográfica.

Durante a hematofagia, as formas promastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor são inoculadas no hospedeiro vertebrado. Uma vez no tecido, estes parasitos são internalizados por fagócitos, e dentro do vacúolo parasitóforo convertem-se nas formas amastigotas. A multiplicação do parasito no interior de macrófagos, associada à resposta imune estimulada pela presença do antígeno parasitário, produz uma reação inflamatória com predominância celular (processo inflamatório crônico do tipo granulomatoso). Com a continuidade do binômio replicação parasitária/processo inflamatório vão surgir lesões teciduais que podem acometer o tegumento cutâneo e/ou mucoso (Leishmaniose Tegumentar) ou órgãos viscerais (Leishmaniose Visceral). Apesar de estar em expansão, a forma visceral ainda é restrita a áreas bem determinadas do território brasileiro. Já a forma tegumentar (LTA) pode ser encontrada em todo o país tanto em área rural quanto urbana.

A LTA pode ser dividida em três formas clínicas básicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). A forma cutânea localizada tem como principal característica uma lesão ulcerada que se desenvolve no local de inoculação do parasito, pelo inseto vetor. O indivíduo desenvolve úlcera de bordos elevados e fundo granuloso, geralmente única e autolimitada. O teste de Montenegro é positivo e é possível evidenciar resposta imune celular específica *in vitro* (Conceição-Silva et al. 1990).

A leishmaniose mucosa geralmente se caracteriza por destruição tecidual progressiva associada à intensa resposta inflamatória (Amato et al. 2003). Esta lesão surge semanas ou anos após o desaparecimento da lesão cutânea inicial, por provável disseminação hematogênica a partir do foco primário. Trabalhos experimentais em hamsters parecem corroborar esta hipótese (Kanan 1975). Mais raramente, a lesão mucosa pode surgir na vigência de úlcera cutânea em atividade.

O quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizado por infiltrações, pápulas e tubérculos envolvendo extensas áreas cutâneas (Brasil 2000). Tem caráter progressivo e não responde ao tratamento antimonial, com ciclos contínuos

de remissão (após o tratamento) e atividade. Os pacientes com LCD não apresentam resposta imunológica do tipo tardio especificamente ao antígeno do parasito *in vivo* (DTH, teste de hipersensibilidade tardia ou reação de Montenegro negativa) nem *in vitro* (resposta proliferativa) (Castes et al. 1983, Castes et al. 1984).

A LTA com sua ampla distribuição constitui uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (Brasil 2000).

As principais espécies envolvidas são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A *L. (V.) guyanensis* é classicamente encontrada no extremo norte do país, sendo responsável por casos de lesões cutâneas e mais raramente lesões mucosas. Já os indivíduos infectados por *L. (L.) amazonensis* podem desenvolver, além da forma cutânea clássica, o quadro de leishmaniose cutânea difusa (LCD). Nestes indivíduos a doença se torna de difícil controle, refratária ao tratamento e as lesões tendem a se disseminar pelo tegumento cutâneo de forma lenta, mas progressiva.

O Rio de Janeiro é tradicionalmente considerado área endêmica de LTA, e a espécie circulante em nosso meio tem sido identificada como *L. braziliensis* (Schubach et al. 1998). A maioria dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresenta a forma cutânea típica (como descrito anteriormente), com localizações variadas, às vezes acompanhada de linfadenopatia regional precoce. Podem ocorrer lesões múltiplas, e em alguns pacientes a doença se apresenta como leishmaniose cutânea disseminada (Barral et al. 1992, Barral et al. 1995, Bittencourt e Barral-Neto 1995, Grimaldi et al. 1989). Alguns pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis*, (1 a 10%), desenvolvem leishmaniose mucosa (LM), uma forma destrutiva que compromete nariz, faringe, palato, lábio superior e laringe. Em 42% dos pacientes ocorre perfuração do septo nasal (Marsden 1986). A LM tem como característica uma resposta imunológica exacerbada, mediada por células, e é interessante a observação de grande destruição tecidual acompanhada de dificuldade de detecção de parasitos (Carvalho et al. 1985).

Estes pacientes apresentam resposta positiva ao teste de Montenegro e a resposta proliferativa *in vitro* de células do sangue periférico, frente ao antígeno. A magnitude desta resposta é geralmente maior que na forma localizada (Carvalho et al. 1985, Castes et al. 1983).

De um modo geral, não importando o parasito envolvido, a forma clássica da infecção se caracteriza pelo aparecimento de lesões tegumentares com característica predominantemente ulcerativa e com a formação de um infiltrado granulomatoso crônico evidenciado na histopatologia. A úlcera leishmaniótica típica tende à cronicidade e pode evoluir para expansão ou regressão, mesmo sem tratamento. A cicatrização pode dar-se num prazo de seis meses a vários anos, curando-se muitas vezes, dentro de 12 a 15 meses (Rey 1991).

O diagnóstico da LTA compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais consistem na evidenciação do parasito e em provas imunológicas. Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico podem ser obtidos a partir de escarificação ou biópsia de lesão. Também pode ser feita a punção aspirativa quando houver necessidade de investigação de comprometimento ganglionar primário. No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão por aposição ou material proveniente de escarificação e punção aspirativa, corados pela técnica de Giemsa ou Leishman. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, como por exemplo NNN, Scheneider ou BHI. Outro método de diagnóstico indireto é a inoculação em animais de laboratório, sendo o hamster o animal de escolha (Brasil 2000). A análise histopatológica dos fragmentos de biópsia também é de fundamental importância no diagnóstico da LTA, pois pode identificar as formas parasitárias e ao mesmo tempo contribuir para o diagnóstico diferencial. Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de implementação de outras metodologias auxiliares como a imunohistoquímica e o PCR para o diagnóstico da LTA, através da detecção de parasitos nas lesões ativas (Kenner et al. 1999).

A detecção de resposta imune específica pode ser feita através da intradermorreação de Montenegro (IDRM), imunofluorescência indireta (IFI) e/ou ensaio

imunoenzimático (ELISA), além de resposta proliferativa primária de linfócitos (RPL). Esta última é pouco utilizada na prática.

Para o tratamento da LTA o Ministério da Saúde (Brasil 2000) preconiza a utilização do antimonial pentavalente (antimoniato-N-metil-glucamina) como droga de primeira escolha. A anfotericina B é considerada droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial ou na impossibilidade de seu uso.

1.4 A RESPOSTA IMUNE NA LTA

Nos últimos anos as técnicas de estudo *in situ* como a hibridização e a imunohistoquímica se tornaram ferramentas importantes para o entendimento da imunopatologia de uma grande variedade de doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, pois permitem a identificação *in situ* do agente infeccioso e do tipo de células e citocinas envolvidas na resposta inflamatória (Amato et al. 2003). Pirmez et al. (1993) sugeriram que o curso clínico da infecção por *Leishmania braziliensis* no homem estaria associado com o padrão local específico de produção de citocinas, pois observaram predominância relativa de RNAs de citocinas do tipo 1 como a IL-2, IFN- γ e linfotoxinas em lesões cutâneas localizadas e em reações de hipersensibilidade tardia provocadas pelo teste de Montenegro. Nas lesões provenientes de formas crônicas e mucocutâneas destrutivas da leishmaniose havia a presença simultânea de RNAs de citocinas do tipo 1 e 2, porém com marcante abundância de IL-4.

Esterre et al. (1992) caracterizaram a resposta imune celular na leishmaniose cutânea localizada e observaram que o infiltrado inflamatório era composto em sua maior parte por linfócitos T, macrófagos e uma pequena porção de células B, *natural killer* e granulócitos. Além disso, as células CD4⁺ e CD8⁺ apresentavam-se em quantidades iguais. Lima et al. (1994) encontraram resultados semelhantes quanto à proporção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, e quando relacionaram o tempo de lesão e o fenótipo celular notaram que a porcentagem das células positivas se mantinha fixa para todos os tipos celulares com exceção das células T $\gamma\delta$ que reduziram com o tempo. A partir destes resultados, estes pesquisadores concluíram que provavelmente

estas células seriam importantes na fase inicial da resposta imune na doença granulomatosa. Em estudo posterior (Diaz et al. 2002) foi realizada a caracterização fenotípica de leucócitos e de moléculas associadas à ativação nos sítios de lesões de pacientes com diferentes formas clínicas (leishmaniose cutânea difusa - LCD, leishmaniose cutânea localizada - LCL e leishmaniose cutânea crônica - LCC). Foi observado que os números de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ foram semelhantes nas lesões dos pacientes de LCL e LCC, e significativamente diferentes nas lesões dos pacientes de LCD. Além disso, as lesões de LCL apresentaram cerca da metade do número de células $CD69^+$ recentemente ativadas quando comparado às lesões de LCC, porém a maioria era CLA^+ , enquanto LCC apresentaram os números mais altos de células $CD69^+$, estando somente um terço expressando CLA. Segundo os autores, isso sugere que o granuloma de pacientes LCC contém muitas células T ativadas que não são “marcadas/primadas” com o antígeno cutâneo, contribuindo assim para uma resposta imune aberrante. Por outro lado, o granuloma dos pacientes LCD apresentavam os menores números de células CLA^+ e $CD69^+$, o que poderia ser associado ao estado tolerogênico característico destes pacientes.

Morgado et al. (2008) avaliaram lesões ativas recentes e tardias de LTA humana e observaram uma associação inversa entre a expressão de NOS2 e a carga parasitária sugerindo a participação da enzima no controle da carga parasitária. Além disso, a expressão de NOS2 se correlacionava diretamente com a quantidade de células $CD3^+$. Ainda, os autores observaram redução da carga parasitária e acúmulo de células $CD4^+$ e macrófagos com a evolução das lesões, o que coincidia com o acúmulo de tecido fibroso em meio a reação inflamatória sugerindo uma possível participação destas células no controle do processo inflamatório.

2 JUSTIFICATIVA

O aumento do número de casos de esporotricose atendidos nos Ambulatórios do IPEC possibilitou o aprofundamento no estudo do envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões cutâneas desta micose e a sua associação às formas variadas da doença. Os dados gerados neste trabalho podem servir de suporte para avaliações de eficácia de futuros esquemas vacinais e tratamento, e possivelmente imunomodulação. Devido a semelhanças clínicas e histopatológicas com outras doenças causadas por agentes infecciosos, os fenômenos observados poderiam ser aplicados às doenças de curso semelhante, como, por exemplo, a leishmaniose.

Outro ponto importante é o fato de que o maior número de casos de esporotricose no Rio de Janeiro gerou uma maior dificuldade no diagnóstico de lesões ulcerativas de caráter infeccioso, notadamente com a leishmaniose já que em muitos casos, os indivíduos com esporotricose provêm de áreas endêmicas de leishmaniose e apresentam teste intradérmico de Montenegro positivo. Além disto, as lesões podem ser extremamente semelhantes, notadamente quando da forma fixa da esporotricose ou na presença de comprometimento linfático na leishmaniose tegumentar recente ou atípica. Como o Rio de Janeiro é tradicionalmente considerado área endêmica para leishmaniose tegumentar americana e, em muitos Serviços de Saúde o diagnóstico é realizado com base no exame clínico e história epidemiológica, a possibilidade de problemas na diferenciação destas duas infecções é uma realidade. Isto se torna importante nos casos cujo diagnóstico etiológico não seja possível (culturas negativas ou com contaminação bacteriana).

Por fim, como já demonstrado para outras doenças (toxoplasmose, tuberculose, etc.) a injúria depende de um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Para entender este equilíbrio, alguns trabalhos foram ou estão sendo conduzidos com foco nos fatores de virulência do patógeno. No caso do presente estudo, tentou-se entender

o outro lado da balança: a resposta imune do hospedeiro, e sua relação com a dinâmica desta patologia.

Compreender alguns aspectos sobre a formação do processo inflamatório presente nos diferentes tipos de lesão de esporotricose e Leishmaniose tegumentar americana pode revelar informações que poderiam auxiliar na compreensão de alguns mecanismos imunes da pele, e que poderiam agir durante a resposta imune neste tecido, independente do patógeno. Em adição, verificar e comparar o tipo e a intensidade da resposta imune celular tanto no compartimento periférico (sangue periférico) quanto no sítio das lesões em grupos com características clínicas comuns, poderia trazer subsídios ao desenvolvimento das futuras estratégias de manejo clínico e terapêutico. Isto se torna particularmente importante na esporotricose, pois o volume de conhecimento sobre a dinâmica desta infecção ainda é pequeno.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o papel da resposta imune celular *in situ* e *in vitro* na evolução das duas formas clínicas mais comuns da esporotricose e da leishmaniose tegumentar americana humanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar a expressão *in situ* de vários marcadores de populações celulares e marcadores funcionais (citocinas, marcadores de ativação celular e morte celular) entre as formas fixa e cutânea-linfática de apresentação da esporotricose.
2. Comparar a distribuição de marcadores funcionais e celulares nas lesões das diferentes formas clínicas da esporotricose com as lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana (LTA).
3. Comparar (por Elispot) a resposta imune celular específica em células isoladas do sangue periférico e das lesões das diferentes formas de apresentação clínica da esporotricose, correlacionando os achados com tempo de evolução, doenças associadas.
4. Comparar os resultados obtidos pelo Elispot no material biológico dos pacientes com esporotricose e LTA.
5. Comparar, num mesmo paciente, a resposta imune observada nos ensaios utilizando sangue periférico (resposta sistêmica) com aquelas dos estudos *in situ* (resposta local) de lesões de esporotricose e LTA.

4 ARTIGOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

A metodologia empregada neste estudo e os resultados obtidos serão apresentados no formato de artigos científicos. Nesta seção encontram-se três artigos com os resultados relacionados ao projeto.

4.1 THE *IN SITU* INFLAMMATORY PROFILE OF LYMPHOCUTANEOUS AND FIXED FORMS OF HUMAN SPOROTRICHOSIS

Artigo publicado no periódico Medical Mycology

Entre os anos de 2001 e 2004, foram coletados fragmentos de lesão ativa de pacientes acometidos de esporotricose nas suas diferentes formas clínicas. Como objetos deste estudo, foram utilizados somente os fragmentos obtidos de pacientes com as formas cutânea-linfática e fixa. Foi feito estudo *in situ* através da técnica de imunohistoquímica e os dados obtidos foram comparados entre as duas formas clínicas estudadas. O estudo das lesões consistiu na quantificação da carga fúngica e na análise do perfil celular através da detecção e quantificação de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺, CD68⁺, neutrófilos, células de Langerhans e células dendríticas foliculares. Além disso, realizou-se a detecção e quantificação dos seguintes marcadores de inflamação: óxido nítrico sintase 2 (NOS2), selectina-E, células CLA⁺, BCL-2⁺, Ki-67⁺, FasL⁺, Fas⁺, Bax⁺ e granzima B⁺. Foi possível detectar diferenças entre as formas clínicas com relação à intensidade de células fúngicas, linfócitos T CD4⁺, células B (CD22⁺), neutrófilos e NOS2.

Os resultados obtidos respondem o objetivo de nº 1 da tese de doutorado.

4.1.1 Artigo publicado no periódico *Medical Mycology*

Medical Mycology Month 2011, Early Online, 1–9

informa
healthcare

Original Article

The *in situ* inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis

FERNANDA N. MORGADO*†, ARMANDO O. SCHUBACH†, MÔNICA B. L. BARROS† & FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA*

*Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, and †VigiLeish and Serviço de Infectologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

The most common clinical presentations of sporotrichosis are the lymphocutaneous (LC) and fixed cutaneous (F) forms, but little is known about the immunopathologic differences between them. The aim of this study was to evaluate through immunohistochemistry the composition of the *in situ* inflammatory reaction so as to correlate the results with the clinical presentation of the disease. The following two groups of patients were involved in the studies, i.e., LC ($n = 19$) and F ($n = 11$) patients. Those with the LC form, in contrast to F patients, were found to have a larger number of lesions ($P = 0.001$), of longer duration ($P = 0.026$) and require a more extended course of treatment ($P = 0.049$). LC patients also presented a greater fungal burden (LC:0–6.5; F:0–1.5; $P = 0.021$), a higher percentage of neutrophils (median LC:24.7%; F:6.7%, $P = 0.002$), CD4⁺ cells (median LC:40.9%; F:30.0%, $P = 0.0024$), CD22⁺ cells (median LC:15.3%; F:2.9%, $P = 0.048$), and higher intensity of NOS2 expression ($P = 0.009$). Thus, our data identified differences in cell profile and inflammatory activity in lesions of LC and F forms of human sporotrichosis.

Keywords skin immune system, *Sporothrix schenckii*, lymphocutaneous sporotrichosis, fixed cutaneous sporotrichosis, immunohistochemistry, NET

Introduction

Sporotrichosis is a mycosis caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* [1] which classically is initiated by traumatic inoculation of the etiologic agent in individuals working with soil and plants [2]. However, since 1998 in Rio de Janeiro, Brazil, there has been a progressive increase in the number of cases of the disease in the home environment, as well as among veterinarians, caused by the bite or scratch of cats with sporotrichosis [3–6].

After inoculation of the fungus, the individual may develop one of two clinical forms of the disease depending

on the depth of the inoculation, host immunological status and strain virulence. The fixed cutaneous (F) form is characterized by one lesion at the site of the fungus inoculation without lymphatic involvement. The lesion can be verrucous, ulcerated or plaque-like. The lymphocutaneous (LC) form is distinguished by lymphatic involvement, accompanied by the occurrence of subcutaneous nodules that may progress to necrosis, liquefaction of their contents and eventual ulceration, showing the sporotrichoid aspect [1,7]. In Rio de Janeiro, the LC form of sporotrichosis is more common than the F form [3].

While factors related to the host immune response and to the infectious agent are involved in determining the occurrence of benign lesions or extensive involvement of the skin in other infections [8–10], little is known about these aspects in sporotrichosis. Few studies have demonstrated differences between isolates recovered from humans [11–13] and animals [14] and investigations focusing on the

Received: 15 October 2010; Received in final revised form 16 December 2010; Accepted: 4 January 2010

Correspondence: F. Conceição-Silva, Lab Imunoparasitologia, IOC/FIOCRUZ, Pavilhão 26-4º andar, sala 406-C, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900/Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Tel: +55 21 38658222; fax: +55 21 22900479; E-mail: fconcei@ioc.fiocruz.br

host immune response are few in number and have generally been performed using animal models. These studies suggested that cellular immunity may be an important factor in the resistance of the host to fungal infection, with the participation of CD4⁺ T cells and activated macrophages [15–17]. Neutrophils have also been implicated in fungistatic and fungicidal activities through the production of superoxide anions and their oxidant metabolites [18].

Since data derived from experimental infections often cannot be fully applied to humans, a better understanding of some aspects of the inflammatory reactions involved in human lesions would be essential to the design of therapeutic and vaccine strategies to prevent the disease, as well as limit extensive involvement of the skin in sporotrichosis.

The objective of the present study was to investigate the *in situ* inflammatory reaction in active sporotrichosis

lesions found in the two main clinical presentations of the disease.

Material and methods

Patients

The present study was designed to investigate cases of the most common clinical presentations of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. The patients (LC: $n = 19$; F: $n = 11$) (Fig. 1a,b) were included in the study after formal written consent approved by the Institutional Ethics Committee on Human Research (protocol 014/2002).

Three tissue fragments from each patient were collected at the time of diagnosis for; (1) identification of *Sporothrix schenckii* (in sterile saline), (2) histopathology (in 10%

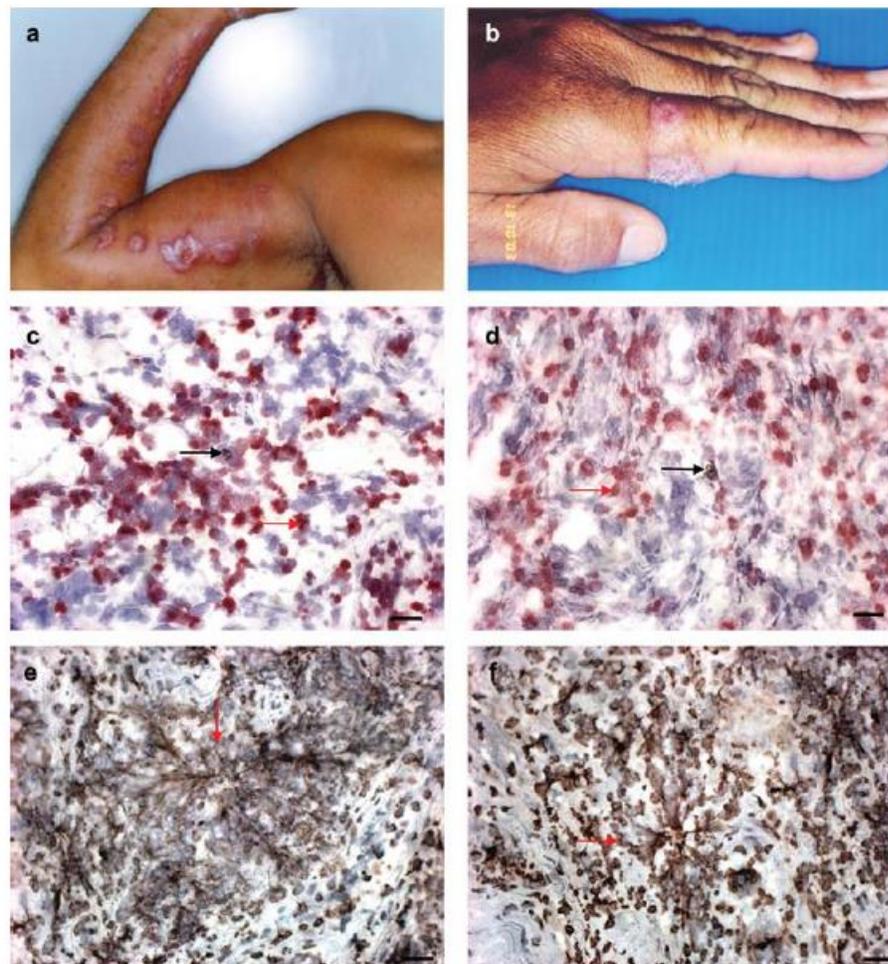


Fig. 1 Patients with sporotrichosis showing typical lesions of (a) the lymphocutaneous form (LC) and (b) the fixed cutaneous form (F); (c,d) Demonstration of neutrophils (red, red arrows) and fungal cells (brown, black arrows) by immunohistochemistry. Original magnification: 400 × (scale bar = 25 μm); (e,f) Neutrophilic elastase-positive cells forming neutrophil extracellular traps (red arrows). Original magnification: 200 × (scale bar = 50 μm).

buffered formalin fixed), and (3) immunohistochemistry (embedded in OCT freezing medium – Sakura Finetech, USA) and stored at -196°C until analysis. The etiological diagnosis was based on the recovery of the fungus from clinical samples in appropriate media (Agar Sabouraud supplemented with 20 U of penicillin per ml and 40 μg of streptomycin per ml at 26°C for filamentous phase identification, followed by conversion to yeast-like phase in brain-heart infusion (BHI) at 37°C). The patients were treated with itraconazole.

Histopathology

The hematoxylin-eosin stained fragments were examined by light microscopy (Zeiss, Jena, Germany). The inflammatory infiltrate was quantified in at least 12 microscopic fields at $200\times$ magnification using a grid-scale consisting of 20×20 subdivisions in an area of 10 mm^2 . The intensity of the inflammatory infiltrate was determined by counting the number of cells/ mm^2 and results were expressed as discrete (<300 cells/ mm^2), moderate (300–1,000 cells/ mm^2), or intense ($>1,000$ cells/ mm^2) [19].

Immunohistochemistry

The immunohistochemistry analysis was performed as previously described [19]. The specific primary antibodies were; CD3 (clone UCHT1), CD4 (clone MT310), CD8 (clone DK25), CD22 (B lymphocytes, clone 4KB128), CD1a (Langerhans cells, clone NA1/34), CD68 (macrophages, clone KP1), CD62E (E-selectin, clone 1.2B6), Bcl-2 (clone 124), Ki67 (clone Ki-S5), Bax (purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum) and anti-neutrophilic elastase (clone NP57) (all from DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), NOS2 (clone 6; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), CLA (cutaneous lymphocyte antigen clone HECA-452), FasL (clone G247-4) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), and granzyme B (clone B18.1; Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA), as well as a polyclonal rabbit anti-*S. schenckii* serum kindly provided by Dr Madeira (IPEC-FIOCRUZ). The percentage of stained cells was determined by counting 500 cells as standard, with the fungal burden calculated as number of yeast cells/ mm^2 . The intensity of NOS2 and E-selectin staining was scored in ten microscope fields ($20\times$ magnification) as discrete (at least one positive site per field), moderate (2 or 3 positive sites per field), intense (4 or 5 positive sites per field), and very intense (more than 5 positive sites per field). Double staining was performed for the colocalization of neutrophils and fungal elements using the Dako Envision Doublestain System kit (Dako). Fungal elements were detected with 3,3'-diaminobenzidine and neutrophils with a fast red

chromogen system. The experiments were performed at least twice and the suppression of primary antibody was used as negative control of reaction.

Statistical analysis

The SPSS16 for windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA), was used for statistical analysis, using the nonparametric Mann-Whitney test and Spearman's rank correlation coefficient for comparison between the LC and F forms. Clinical data are reported as means \pm standard deviation. The other data are reported as median and range.

Results

Patients

The diagnosis of sporotrichosis was established by isolation of *S. schenckii* in culture ($n = 29$) or by visualization of yeast-like structures upon histopathology ($n = 1$). The age of the patients, number of lesions, disease duration and length of treatment are shown in Table 1.

Histopathology

The inflammatory infiltrate present in lesions of patients with both forms of sporotrichosis was mainly located in the reticular dermis in those areas containing sweat glands and glandular ducts, as well as around vessels. Although no significant difference in cellularity per area was observed (Table 2), fixed lesions presented more focal infiltrates in these areas and were surrounded by fibrous tissue. In contrast, the inflammatory infiltrate present in LC lesions was diffuse and often extended to the papillary dermis with abscesses and/or necrosis.

Fungal elements. Fungal cells were mainly detected in areas around sweat glands and their ducts, in hair follicles, and other tissue areas. A higher fungal burden was observed in LC when compared to F lesions (Fig. 2a). In addition, a correlation was observed between the time necessary for clinical cure of the lesions and the number of fungal elements per tissue area ($r = 0.426$, $P = 0.034$).

Neutrophils, macrophages, lymphocytes and Langerhans cells. In LC lesions, neutrophils were heterogeneously distributed in the dermis, especially in areas of abscesses and/or necrosis, reaching a concentration of 80% in these areas. Neutrophils were also observed inside vessels and close to sweat glands. The percentage of neutrophils was significantly higher in the LC than in the F (Fig. 2b) form of the disease. A correlation was observed between the percentage of neutrophils and the number of lesions ($r = 0.397$, $P = 0.049$).

Table 1 Clinical data of patients with the lymphocutaneous (LC) and fixed cutaneous (F) forms of sporotrichosis.

Clinical data		LC	F	<i>P</i>
Gender	Female	14	7	0.69
	Male	5	4	
Age (years)		41.8 ± 15.91 (16–68)	31.2 ± 12.99 (18–53)	0.085
Co-morbidities ^a	Yes	10	5	1.00 ^b
	No	9	6	
RJ regions ^c	Rio de Janeiro	9	5	
	Duque de Caxias	6	3	
	São João de Meriti	1	0	
	Nova Iguaçu	1	2	
	São Gonçalo	0	1	
	Nilópolis	2	0	
Disease duration (months)		1.78 ± 1.28 (0.25–4.5)	0.88 ± 0.48 (0.5–1.75)	0.026
Number of lesions		10.13 ± 8.75 (1–28)	1.82 ± 1.08 (1–4)	0.001
Duration of treatment (months)		4.15 ± 1.46 (2–7)	3.21 ± 2.14 (1–9)	0.049

^aRecurrent urinary infections, hepatitis, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, stomach disorders, mental illness and alcoholism were considered as co-morbidities.

^bFisher test.

^cRJ regions = municipalities of Rio de Janeiro state.

Data are reported as the mean ± standard deviation and range (in parentheses).

A *P* value ≤ 0.05 in bold were considered to be significant (Mann-Whitney test).

The concomitant identification of neutrophils and fungal cells demonstrated the frequent proximity of these two elements (Fig. 1c,d). However, areas containing only neutrophils were observed. The formation of neutrophil extracellular traps (NETs) was noted in some lesions (Fig. 1e,f) and were more frequently detected in lesions in which the percentage of neutrophils was higher than 15%, i.e., LC lesions.

Macrophages, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells were homogeneously distributed throughout the inflammatory

infiltrate and were also detected in the epidermis, inside vessels and close to glands. No differences in macrophages, CD3⁺ and CD8⁺ cells were observed between the two groups (Fig. 2c,d,f) of patients. In contrast, the percentage of CD4⁺ cells was significantly higher in the LC than in the F (Fig. 2e) form of the infection. The percentage of CD4⁺ cells was correlated with disease duration ($r = 0.586$, $P = 0.001$) and with the number of lesions ($r = 0.394$, $P = 0.047$). In view of the heterogeneous distribution of CD4⁺ and CD8⁺ cells in LC and F forms, the CD4/CD8 ratio was similar in the two groups (Table 3).

CD22⁺ B cells also presented a heterogeneous distribution, forming small cell groups amidst the inflammatory infiltrate in the dermis and the percentage of these cells was significantly higher in LC than in F (Fig. 2g) sporotrichosis. Langerhans cells were present in the epidermis and papillary dermis but did not differ between the two groups (Fig. 2h).

Markers of inflammation. The intensity of NOS2 expression ranged from discrete to intense in LC lesions and from discrete to moderate in F lesions (Tables 3 & 4). In addition, no expression of this enzyme was observed in one (5.3%) LC and in three (27.3%) F samples. Comparison of the two groups showed a higher intensity of NOS2 expression in LC (Fig. 3a) form. Correlations were observed between the expression of NOS2 and the intensity of the inflammatory infiltrate ($r = 0.40$, $P = 0.031$) and the number of neutrophils ($r = 0.467$, $P = 0.012$).

Table 2 Intensity of the inflammatory infiltrate in active lesions of patients with the lymphocutaneous and fixed cutaneous forms of sporotrichosis.

	Intensity of the inflammatory infiltrate upon histopathology			
	Cellularity/mm ² Median (range)	Discrete <i>n</i> (%)	Moderate <i>n</i> (%)	Intense <i>n</i> (%)
Lymphocutaneous	1.353.0 (365.0–2.844.0)	1 (5.3)	7 (36.8)	11 (57.9)
Fixed	898.0 (287.0–1.972.0)	2 (18.2)	6 (54.5)	3 (27.3)

Data are reported as the median, minimum and maximum values, and as the number and percentage of individuals; *n* = number of individuals.

Mann-Whitney test: $P = 0.175$. Lymphocutaneous × fixed (cellularity/mm²).

Fisher's exact test: $P = 0.14$, OR = 0.27. Lymphocutaneous × fixed in relation to intensity of the inflammatory infiltrate upon histopathology.

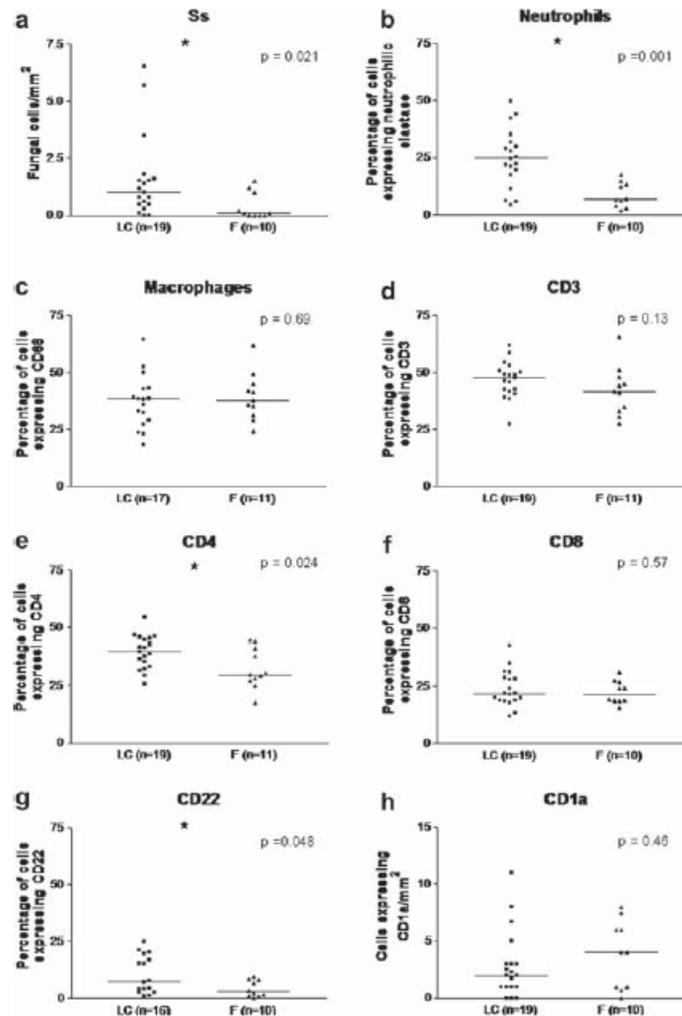


Fig. 2 Number of (a) fungal cells/mm², (b) neutrophilic elastase-positive cells, (c) CD68⁺ cells, (d) CD3⁺ cells, (e) CD4⁺ cells, (f) CD8⁺ cells, (g) CD22⁺ cells, and (h) CD1a⁺ cells/mm² tissue in lesions of patients with the lymphocutaneous (LC) and the fixed form (F) of sporotrichosis. The line indicates the median of the group. A *P* value < 0.05 was considered significant.

The distribution of cells expressing CLA, Ki67, granzyme B, E-selectin, Bcl-2, Bax, or FasL did not differ significantly between the groups studied (Fig. 3b–h). CLA⁺ cells, granzyme B, Bcl-2, Bax and FasL presented a heterogeneous distribution.

Ki67⁺ cells were homogeneously distributed in the dermis. A correlation was observed with CD3⁺ cells ($r = 0.605$, $P = 0.0001$) and with CD4⁺ cells ($r = 0.553$, $P = 0.001$), and between CD3⁺ and Bcl-2⁺ cells ($r = 0.638$, $P = 0.0001$), CD4⁺ and Bcl-2⁺ cells ($r = 0.684$, $P = 0.0001$).

Bax expression was mainly found at the periphery of neutrophil accumulation and in areas of abscesses and necrosis.

Discussion

We analyzed the *in situ* inflammatory process of the most common clinical presentations of the sporotrichosis. LC lesions were found to have extensive involvement of the skin, longer disease duration, larger number of lesions (associated with lymphangitis), higher fungal burden and a more diffuse *in situ* inflammatory reaction involving the reticular and papillary layers of the dermis. Moreover, the time of treatment to healing was longer in LC when compared with the F form ($P < 0.05$). A positive correlation was observed in the LC lesions between the time of treatment and the number of yeast/mm².

Our results indicate that the dynamics of the *in situ* inflammatory process differs between LC and F clinical

Table 3 Cellular markers profile in lesions of lymphocutaneous (LC) or fixed (F) forms of sporotrichosis.

Cells or markers of inflammation	LC Median (min–max)	F Median (min–max)	P
Fungal cells/mm ²	1 (0–6.5)	0.85 (0–1.5)	0.021
Neutrophils (%)	24.7 (4.3–49.6)	6.7 (1.9–17.5)	0.001
Macrophages (%)	38.4 (18.4–64.7)	37.7 (24.2–62.2)	0.69
CD3 (%)	47.6 (27.5–62.1)	41.9 (27.5–65.8)	0.13
CD4 (%)	39.9 (25.7–54.4)	30 (17.8–44.6)	0.024
CD8 (%)	22 (12–42.9)	21.7 (15.6–31.2)	0.57
CD4/CD8	1.81 (0.93–2.9)	1.44 (1.12–1.6)	0.076
CD22 (%)	7.45 (1–25)	2.9 (0–9.4)	0.048
Langerhans cells/mm ²	2 (0–11)	4 (0–8)	0.46
NOS2 expression	2 (0–3)	1 (0–2)	0.009
CLA (%)	25.9 (3.2–47.1)	28.2 (10.6–41.5)	0.50
Ki-67 (%)	7.3 (1.7–16.9)	5.7 (1.8–15.5)	0.29
Granzyme B (%)	49.2 (2.7–66.2)	49.8 (34.3–63.3)	0.48
E-selectin expression	2 (1–4)	2 (1–4)	0.20
BCI-2 (%)	37.4 (22.6–48)	28.6 (12–48)	0.16
Bax (%)	47.5 (16.6–63)	30.9 (1.6–71.8)	0.17
FasL (%)	13.6 (4.2–29)	10.7 (3.4–25.5)	0.27

The data were reported as Median and minimum–maximum values. Mann-Whitney test was used for comparison between groups. *P*-values ≤ 0.05 in bold were considered significant.

forms. In the F form, the immune response is more balanced, leading to control of the infection without destruction of adjacent tissues. The restraint of inflammation by fibrous tissue commonly observed in this form of infection also could impair dissemination of the fungus, thus facilitating its control. In contrast, the inflammatory reaction in LC lesions was more intense and diffuse, with intense necrosis and pus formation, suggesting an imbalance in the immune response. The tissue destruction could facilitate lymphatic dissemination of the fungus probably as the result of an exacerbated host response or of a more virulent fungal strain.

Differences in clinical manifestations [3,20] and in the *in vitro* immune response [13] have been reported in the sporotrichosis. However, the role of different clinical *S. schenckii* isolates in the severity of disease is controversial.

Table 4 Number of patients with lymphocutaneous (LC) and fixed cutaneous (F) forms of sporotrichosis according to the intensity of NOS2 and E-selection expression.

	Clinical form	Intensity				
		Absent	Discrete	Moderate	Intense	Very intense
NOS2 (<i>P</i> = 0.009)	LC	1	3	9	6	0
	F	3	4	4	0	0
E-selectin (<i>P</i> = 0.284)	LC	0	4	7	4	4
	F	0	5	2	3	1

P-values ≤ 0.05 were considered to be significant (Mann-Whitney test). The intensity of NOS2 and E-selectin staining was scored in ten microscope fields (20 × magnification) as discrete (at least one positive site per field), moderate (2 or 3 positive sites per field), intense (4 or 5 positive sites per field), and very intense (more than 5 positive sites per field).

While some studies show a positive correlation between specific genotypes and clinical forms, other have failed to identify such associations [11,21]. Indeed, comparison between *S. schenckii* strains isolated from patients in Rio de Janeiro (Brazil) with different clinical forms did not reveal this association since all strains were genetically related [21]. In addition, no differences in the minimum inhibitory drug concentrations were detected when these isolates were tested *in vitro* with amphotericin B, itraconazole, posaconazole, ravuconazole or terbinafine [21].

Our data suggest the importance of fungal burden in the progression of human lesions and for the therapeutic control of sporotrichosis. However, it should be pointed out that the inflammatory process that occurs in the skin depends on both resident cells and cells that migrate to the site after the onset of inflammation. It is possible that the composition and organization of the local inflammatory reaction are factors in both the control of infection and tissue destruction with consequent lesion aggravation. In an *in vitro* study [22] the importance of reactive oxygen intermediates and of neutrophilic elastase for the action of neutrophils during human infection were observed. Our study revealed the presence of a moderate to intense inflammatory neutrophil infiltrate with NET formation, particularly in the LC form of the disease. The presence of NETs suggests a specific mechanism of cell death characterized by the formation of a network of nuclear material and enzymes that trap and destroy microorganisms [23–25]. We are currently studying this aspect in more detail.

The higher concentration of neutrophils in LC lesions, which are characterized by the formation of numerous nodules or plaques and regional lymphatic dissemination, was observed in areas of marked cell destruction close to or in

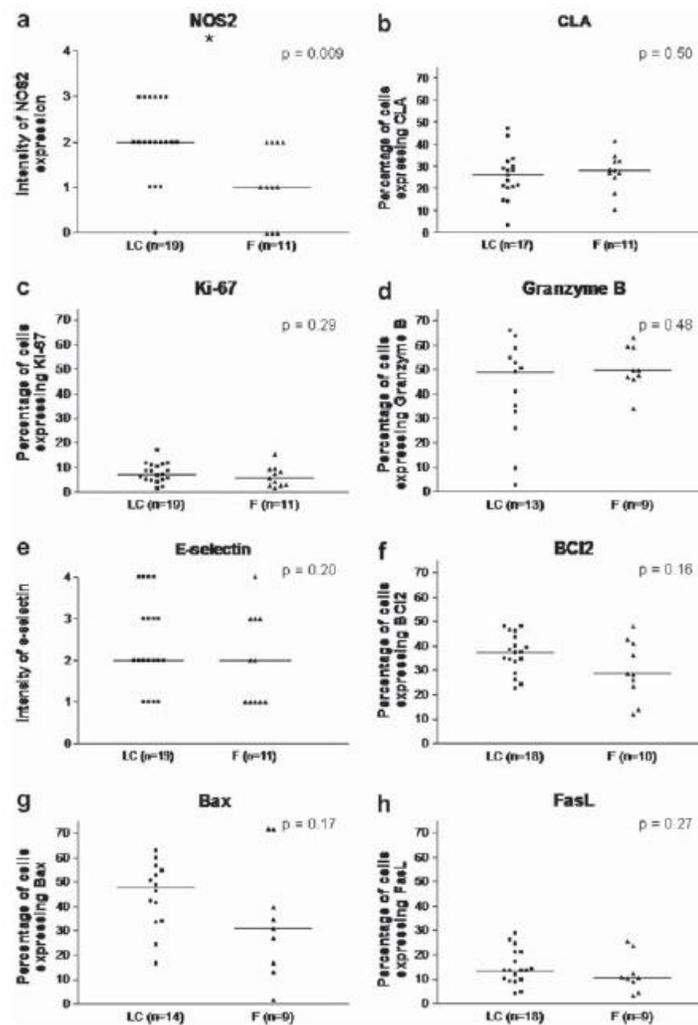


Fig. 3 Expression of (a) NOS2 and percentage of (b) CLA⁺ cells, (c) Ki67⁺ cells, (d) granzyme B⁺ cells, (e) E-selectin⁺ cells, (f) Bcl-2⁺ cells, (g) Bax⁺ cells, and (h) FasL⁺ cells in lesions of patients with the lymphocutaneous (LC) and the fixed form (F) of sporotrichosis. The line indicates the median of the group. A *P* value < 0.05 was considered significant.

contact with fungal elements, with the concomitant accumulation of Bax⁺ cells. The simultaneous observation of a higher concentration of neutrophils and CD3⁺/CD4⁺ cells in LC lesions suggests a more intense inflammatory infiltrate associated with involvement of neighboring tissue. The accumulation of CD4⁺ cells may indirectly maintain the local inflammatory process by the production of proinflammatory cytokines and immune modulators.

In the present study, a positive correlation was observed between the percentage of CD4⁺ cells and disease duration. Interestingly, this type of correlation was also observed in patients with American tegumentary leishmaniasis (ATL) [19]. Although both diseases present tegumentary involvement, their etiological agents have distinct characteristics.

Leishmania species are obligatory intracellular parasites, whereas the *S. schenckii* is generally extracellular. Thus the increase in CD4⁺ cells in these patients could be a general response of the skin immune system and not a specific response to an etiological agent. Accordingly, the higher percentage of CD4⁺ cells in LC lesions when compared with F form regardless the duration of the lesions (data not shown) could also suggest a relationship between the quantity of CD4⁺ cells and the intensity of tissue injury mediated by the inflammatory response and/or fungal burden.

LC lesions also had a significantly higher percentage of B cells than did F lesions. B lymphocytes are responsible for the production and secretion of antibodies, and also act as APC [26]. Since *S. schenckii* are easily detected

in extracellular compartments, the presence of B cells, and consequently the production of antibodies, might be important for the dynamic control of fungal burden. Since a higher parasite burden was observed for LC lesions, the accumulation of B cells and other effector cells such as neutrophils may suggest a greater stimulation of these cell types to migrate into the lesions. In addition, the yeast accumulation may indicate either an initial uncontrolled and ineffective inflammatory process and/or higher virulence of some *S. schenckii* strains as demonstrated in animal models [11–13].

Patients with LC lesions also presented with significantly higher expressions of NOS2 than patients with F lesions. A previous study [27] has demonstrated that the components of the *S. schenckii* wall inhibit phagocytosis *in vitro* and induce marked release of NO and TNF- α by macrophages in cultures. Furthermore, an *in vitro* study using murine macrophages [28] suggested that NO is an important cytotoxic mediator in the defense against *S. schenckii*, but virulence is associated with lower susceptibility of the fungus to NO. The authors also observed that animals infected with the more virulent form of the fungus presented a higher mortality rate and higher serum levels of NO. In the present study, our analysis showed a higher expression of NOS2 in human LC lesions that also presented a more intense inflammatory reaction. This exacerbated clinical evolution probably due to a larger quantity of fungi observed in these lesions. Although, an inverse association between fungal burden and NOS2 expression would be expected as suggested for ATL [19], it does not seem to occur in sporotrichosis lesions. Since most fungal elements are extracellular, other factors may participate in the *in vivo* elimination of the *S. schenckii*. Indeed, in LC lesions a higher expression of NOS2 and more severe lesions were observed in association with intense tissue destruction, a larger number of lesions and a higher percentage of CD4⁺ cells and neutrophils. Taken together, these data suggest that different mechanisms may act during infection with *S. schenckii* and further studies are necessary to elucidate the role of NO in fungal diseases. In contrast, no differences were observed between the two clinical forms in the other markers of inflammatory activity. Thus this finding suggests that even lesions of the fixed form, although less severe than LC lesions, present important inflammatory activity.

In conclusion, our work shows that LC patients have extensive involvement of the skin with more lesions and for a longer duration when compared to F lesions. The more marked inflammatory pattern of LC lesions correlated with increased numbers of neutrophils and CD4⁺ cells and higher NOS2 expression, as well as with higher fungal burden. Our study of the human immune response in sporotrichosis revealed differences in cellularity and

inflammatory activity that are likely related to the different clinical forms.

Acknowledgements

This work was supported by IOC and IPEC-FIOCRUZ, PAPES 4 and 5, FUNASA/MS, CNPq and FAPERJ, Brazil. The authors thank Dr Joseli Oliveira-Ferreira (IOC-FIOCRUZ) for the critical review of the manuscript, as well as Dr M. F. Madeira for the anti-*Sporothrix schenckii* antibody. FNM is PhD student from IPEC-FIOCRUZ.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- 1 Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 231–236.
- 2 Chapman SW, Daniel CR. Cutaneous manifestations of fungal infection. *Infect Dis Clin North Am* 1994; **8**: 879–910.
- 3 Barros MBL, Schubach AO, do Valle ACF, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 529–535.
- 4 Schubach TM, Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol* 2001; **39**: 147–149.
- 5 Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *J Am Vet Med Assoc* 2004; **224**: 1623–1629.
- 6 Schubach AO, Barros MBL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; **21**: 129–133.
- 7 Lopes-Bezerra LM, Schubach AO, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc* 2006; **78**: 293–308.
- 8 Lüder CG, Gross U, Lopes MF. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 2001; **17**: 480–486.
- 9 Lüder CG, Gross U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; **289**: 219–237.
- 10 Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol* 1999; **7**: 366–372.
- 11 Brito MMS, Conceição-Silva F, Morgado FN, et al. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Med Mycol* 2007; **45**: 721–729.
- 12 Neyra E, Fonteyne P, Swinne D, et al. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 1348–1352.
- 13 Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol* 2006; **18**: 1637–1646.
- 14 Nobre MDO, Antunes TDA, de Faria RO, et al. Differences in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. *Mycopathologia* 2005; **160**: 43–49.
- 15 Dickerson CL, Taylor RL, Drutz DJ. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. *Infect Immun* 1983; **40**: 417–420.
- 16 Shiraiishi A, Nakagaki K, Arai T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia* 1992; **120**: 15–21.

- 17 Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4 + T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol* 1999; **37**: 397–404.
- 18 Kajiwarra H, Saito M, Ohga S, *et al.* Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infect Immun* 2004; **72**: 5073–5079.
- 19 Morgado FN, Schubach AO, Rosalino CMV, *et al.* Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol* 2008; **158**: 50–58.
- 20 Carlos IZ, Sassá MF, da Graça Sgarbi DB, *et al.* Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* 2009; **168**: 1–10.
- 21 Galhardo MCG, De Oliveira RMZ, do Valle ACF, *et al.* Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 2008; **46**: 141–151.
- 22 Cunningham KM, Bulmer GS, Rhoades ER. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. *J Infect Dis* 1979; **140**: 815–817.
- 23 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **3**: 1532–1535.
- 24 Baker VS, Imade GE, Molta NB, *et al.* Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J* 2007; **7**: 41.
- 25 Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 6748–6753.
- 26 Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; **343**: 37–49.
- 27 Carlos IZ, Sgarbi DBG, Santos GC, Placeres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Scand J Immunol* 2005; **57**: 214–220.
- 28 Fernandes KS, Coelho AL, Lopes Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and the susceptibility to nitric oxide. *Immunology* 2000; **101**: 563–569.

This paper was first published online on Early Online on 27 January 2011.

4.1.2 Conclusões referentes ao artigo publicado no periódico *Medical Mycology*

- 1- A dinâmica do processo inflamatório se mostrou diferente entre as formas clínicas cutânea-linfática e fixa da esporotricose.
- 2- Nas lesões fixas, a resposta imune foi mais balanceada levando ao controle da infecção sem destruição do tecido adjacente.
- 3- A restrição do processo inflamatório por tecido fibroso frequentemente observado na forma fixa da esporotricose poderia impedir a propagação do fungo facilitando o controle da infecção.
- 4- De forma contrária, as lesões cutânea-linfáticas apresentaram reação inflamatória mais intensa e difusa associadas à intensa necrose e formação de pus caracterizando uma resposta imune descontrolada. A maior gravidade destas lesões pôde ser associada à maior carga fúngica e maior atividade inflamatória (maior percentual de linfócitos T CD4⁺, linfócitos B CD22⁺, neutrófilos e expressão de NOS2).
- 5- A resposta imune do hospedeiro, em especial da pele, mantém um padrão fenotípico e de atividade inflamatória, porém com algumas peculiaridades (percentuais de células CD4⁺, células B, neutrófilos e expressão de NOS2) que poderiam influenciar a progressão da doença.

4.2 DIFFERENCES IN THE *IN SITU* INFLAMMATORY REACTION OF THE AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS AND SPOROTRICHOSIS AS AN EXAMPLE OF THE SKIN IMMUNE SYSTEM RESPONSE PATTERNS.

Artigo submetido à revista *Microbes and Infection*

Neste segundo artigo, submetido à revista *Microbes and Infection*, foi discutida a participação do sistema imune da pele no estabelecimento de resposta inflamatória contra dois patógenos distintos: *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *S. schenckii*. Em adição, foi possível relacionar os dados encontrados, às diferentes formas clínicas, sugerindo um papel importante do sistema imune da pele no tipo de manifestação clínica, mesmo quando se trata do mesmo agente infeccioso, como no caso das lesões fixas e cutânea-linfáticas da esporotricose. Neste estudo foram comparadas os achados *in situ* entre lesões de leishmaniose tegumentar americana e esporotricose.

O estudo das lesões consistiu na quantificação das cargas fúngicas ou parasitárias e, como já citado anteriormente, análise do perfil celular através da detecção e quantificação de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺, CD68⁺, neutrófilos, células de Langerhans e células dendríticas foliculares. Além disso, foi feita a detecção e quantificação dos seguintes marcadores de inflamação: óxido nítrico sintase 2, selectina-E, células CLA⁺, BCL-2⁺, Ki-67⁺, FasL⁺ e Fas⁺. Os dados obtidos sugerem diferenças no perfil celular e atividade inflamatória entre as diferentes formas clínicas avaliadas. As lesões de LTA apresentaram maiores percentuais de linfócitos T CD8⁺, células FasL⁺, macrófagos e expressão de NOS2. Enquanto as lesões de esporotricose na sua forma cutâneo-linfática apresentaram maiores percentuais de neutrófilos e células B (CD22⁺). Desta forma, foi possível detectar dois padrões de resposta imune da pele: um padrão intracelular através dos achados referentes às lesões cutâneas de LTA, e um padrão extracelular referente ao infiltrado das lesões cutânea-linfáticas da esporotricose. Isto sugere que o sistema imune da pele é um sistema complexo capaz

de responder a diferentes patógenos e de montar padrões de respostas adaptadas a cada microrganismo. *S. schenckii* é patógeno extracelular que pode ser eventualmente encontrado no interior de células fagocíticas, enquanto amastigotas de *Leishmania* sp são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Assim, a resposta imune envolvida no controle da carga fúngica na esporotricose seria do tipo secretório através da cooperação entre neutrófilos, macrófagos e linfócitos B. Já mecanismos efetores envolvidos no controle da carga parasitária na leishmaniose dependem da ativação de células T CD3⁺, CD8⁺ e macrófagos, e da expressão de FasL e NOS2.

Os resultados obtidos respondem o objetivo de nº 2 da tese de doutorado.

4.2.1 Registro de submissão à revista *Microbes and Infection*

Elsevier Editorial System(tm) for *Microbes and Infection*
Manuscript Draft

Manuscript Number: MICINF-D-11-00151

Title: Differences in the in situ inflammatory reaction of the American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis as an example of the skin immune system response patterns.

Article Type: Original article

Keywords: skin immune system; in situ inflammatory reaction; extracellular pathogens; intracellular pathogens; American tegumentary leishmaniasis; sporotrichosis.

Corresponding Author: Dr. Fátima Conceição-Silva,

Corresponding Author's Institution: Instituto Oswaldo Cruz

First Author: Fernanda N Morgado, Dr.

Order of Authors: Fernanda N Morgado, Dr.; Armando O Schubach, Dr.; Mônica B Barros, Dr.; Érica C Vasconcellos, Msc.; Fátima Conceição-Silva

4.2.2 Differences in the *in situ* inflammatory reaction of the American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis as an example of the skin immune system response patterns.

Short title: The skin immune response to pathogens

Fernanda N. Morgado^{a,b}; Armando O. Schubach^b; Monica B.L. Barros^b; Erica C.F. Vasconcellos^b; Fátima Conceição-Silva^{a*}

^aLaboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

^bVigiLeish and Serviço de Infectologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence- Senior author: Fátima Conceição-Silva, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Pavilhão 26 – 4º andar, sala 406-C, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900/Rio de Janeiro – RJ, Brasil. Email: fconcei@ioc.fiocruz.br.

ABSTRACT

The clinical presentations of skin infectious diseases as American tegumentary leishmaniasis (ATL) and sporotrichosis (SP) could be influenced by the pathogen-skin immune system (SIS) interaction. To better clarify the underlying mechanisms of skin inflammation in the presence of different pathogens, we used immunohistochemistry to analyze 3 groups of patients with lymphocutaneous (LC) and fixed (F) forms of sporotrichosis and cutaneous form of ATL. ATL lesions had a significantly higher percentage of CD3⁺ cells than LC (p= 0.012) and F (p= 0.009), CD8⁺ cells (p= 0.001 and p= 0.002, respectively), macrophages (p= 0.003 and p= 0.025), FasL⁺ cells (p= 0.001 and p= 0.003) and NOS2 (p= 0.007 and p= 0.0001). In contrast, LC lesions had a significantly higher percentage of dendritic cells (p= 0.026), neutrophils (p= 0.009) and CD22⁺ cells (p= 0.024), than ATL lesions. The clinical presentation of ATL and sporotrichosis could be due to a combination of factors from the host SIS and etiological agent. In addition, the results also indicated a different profile of the *in situ* immune response when ATL, LC-SP and F-SP are compared, suggesting that the SIS is a complex, adaptable system that is capable of different responses to intracellular or extracellular pathogens.

Keywords: skin immune system; *in situ* inflammatory reaction; extracellular pathogens; intracellular pathogens; American tegumentary leishmaniasis; sporotrichosis.

1. INTRODUCTION

Immunologists have only recently begun to recognize the importance of the skin for immune surveillance. In humans, the skin, which covers approximately 2 m² and accounts for 16% of the body weight, is the largest organ in the body.^[1] This organ has several immune systems, such as the skin immune system (SIS), skin-associated lymphoid tissue (SALT), and hair follicle immune system (HFIS).^[1-6] Consequently, the cutaneous tegument is now considered essential for the development and selection of the immune response to many infectious agents.^[7-14]

As an immune surveillance organ, the skin continuously interacts with many infectious agents. Not surprisingly, some infectious and parasitic diseases primarily or secondarily target the skin.^[15-22] For example, *Leishmania* spp. and *Sporothrix schenckii* cause two granulomatous skin diseases, namely, American tegumentary leishmaniasis (ATL) and sporotrichosis (SP), respectively. Although these diseases share clinical similarities as ulcerated lesions that arise frequently in the limbs^[23], they differ in their duration and number of lesions as well as the degree to which skin is involved.^[20,23-25] Since SP is caused by an extracellular fungus that eventually enters phagocytic cells whereas ATL is caused by an obligatory intracellular parasite of mononuclear phagocytes, we hypothesized that these differences could elicit different SIS responses and, therefore, cause different clinical symptoms and signs. To test this hypothesis, we used immunohistochemistry to compare the *in* inflammatory reaction of active lesions in ATL and SP patients in order to elucidate some aspects underlying the mechanisms of localized inflammation of the skin by different infectious agents.

2. Material and methods

2.1. Patients

The patients in this study were diagnosed and followed up in the outpatient clinic of the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish–IPEC-FIOCRUZ-RJ). Three groups of patients were studied: (1) lymphocutaneous form of SP (LC, $n = 19$), (2) fixed form of SP (F, $n = 11$), and (3) cutaneous form of ATL (ATL, $n = 18$) (Fig. 1). The study was approved by the Ethics Committee of IPEC-FIOCRUZ and all patients provided informed written consent before participation.

2.2. Tissue samples

Lesion samples were obtained from the primary lesion from patients at the time of their diagnosis. These samples were prepared for the following analyses: (1) histopathology (stored in 10% formalin buffer), (2) immunohistochemistry (stored at -196°C after embedding in OCT cryostat medium (Tissue Tek, Sakura Finetek U.S.A., Torrance, CA, USA), and (3) collected in sterile saline and cultured to isolate fungal cells and *Leishmania spp.* To isolate fungal cells, the samples were cultured at 28°C in Sabouraud Dextrose Agar supplemented with $20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin and $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin (Sigma, St. Louis, MI, USA) during the hyphal phase, followed by growth at 37°C in Brain Heart Infusion medium (Sigma) until the yeast like phase. To isolate *Leishmania spp.*, the samples were cultured in biphasic medium Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) / Schneider's insect medium (Sigma) at 28°C .

2.3. Histopathology

Formalin-fixed samples were stained with hematoxylin-eosin, and then examined with a light microscope (Carl Zeiss Axioskop, Jena, Germany). The intensity of the inflammatory infiltrate was measured in at least 12 microscopic fields at 200× magnification using a grid scale with 20 × 20 subdivisions per 10 mm². The intensity was scored as discrete (<300 cells·mm⁻²), moderate (301–1000 cells·mm⁻²), or intense (>1000 cells·mm⁻²).

2.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as described previously.^[24] Three-micrometer-thick sections were mounted on silanized microscope slides (Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA), fixed in acetone (puriss, absolute; Merck, Darmstadt, Germany), and hydrated in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After blocking endogenous peroxidase with peroxidase blocking reagent (Dakocytomation) and nonspecific staining with normal goat serum (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), the slides were incubated with the following antibodies: CD3⁺ (clone UCHT1), CD4⁺ (clone MT310) and CD8⁺ (clone DK25) T lymphocytes, CD22⁺ (clone 4KB128) B lymphocytes, CD1a⁺ (clone NA1/34) Langerhans cells, CD68⁺ (clone KP1) macrophages, CD62E⁺ (clone 1.2B6) E-selectin, Bcl-2⁺ (clone 124), Ki67⁺ (clone Ki-S5) and neutrophil elastase (clone NP57 - neutrophils) (Dakocytomation); nitric oxide synthase 2 (NOS2) (clone 6) (BD Transduction Laboratories, KY, USA); cutaneous lymphocyte antigen (CLA; clone HECA-452), Fas (clone DX2), and FasL (clone G247-4) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA). After washing in PBS, the

specimens were incubated with a biotinylated secondary antibody (goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG – both from Zymed) followed by a streptavidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit, Dakocytomation) and aminoethylcarbazole (AEC kit, Zymed). Subsequently, the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (Dako) and examined under a light microscope (Zeiss). The percentage of stained cells was determined among 500 mononuclear cells. The intensity of NOS2 and E-selectin staining was measured in 10 microscope fields (200× magnification) and scored as discrete (maximum 1 positive), moderate (2 or 3 positive areas), intense (4 or 5 positive areas), or very intense (>5 positive areas), as described previously.^[24] All experiments were replicated at least twice and the suppression of the primary antibody was used as a negative control.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were calculated with SPSS16 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The Mann-Whitney U test was used to compare the ATL, LC, and F lesions. The data are reported as median and range. The p-value cutoff for statistical significance was 0.05.

3. Results

3.1. Sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis patients differ in the number of lesions and duration of infection before diagnosis

All 3 groups of patients had similar age distributions ($p > 0.05$; Table 1). The number of lesions in F and ATL patients was similar. However, LC patients had significantly more lesions than F ($p = 0.001$) and ATL patients ($p = 0.0001$). In addition, the duration of infection in ATL patients was significantly longer than LC ($p = 0.016$) and F ($p = 0.0001$) patients.

3.2. Sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis lesions differ in the distribution of their inflammatory reactions

The inflammatory infiltrate in SP lesions is strongly accumulated in the reticular dermis, near sweat glands and ducts, and around blood vessels, while that in ATL lesions it is accumulated in the papillary dermis and was diffusely distributed throughout the lesion. However, since the inflammatory cells were heterogeneously distributed, there were no significant differences in the cell density per mm^2 of tissue in any of the 3 groups ($p > 0.05$; Table 2).

3.3. The percentage composition of cell types and markers of in situ inflammatory reactions in American tegumentary leishmaniasis lesions differs significantly from that in lymphocutaneous or fixed sporotrichosis lesions.

We observed significant differences in the percentage composition of cell types and markers between ATL, LC, and F lesions (Table 3). ATL patients had a significantly higher percentage of CD3^+ cells than LC ($p = 0.012$) and F ($p = 0.009$) patients (Fig. 2 and Table 3), as well as more CD8^+ cells ($p = 0.001$ and $p = 0.002$, respectively),

macrophages ($p = 0.003$ and $p = 0.025$, respectively), and FasL⁺ cells ($p = 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). In addition, NOS2 expression was significantly higher in ATL lesions than in LC ($p = 0.007$) and F ($p = 0.0001$) lesions.

In contrast, LC lesions had a significantly higher percentage of neutrophils ($p = 0.009$) than ATL lesions. However, similar amounts of neutrophils were observed in both ATL and F lesions ($p > 0.05$) (Figs. 2 and 3). In addition, LC lesions had a significantly higher percentage of dendritic cells ($p = 0.026$) and a significantly higher density of CD22⁺ cells ($p = 0.024$). Finally, ATL lesions had more Fas⁺ ($p = 0.007$) and Ki-67⁺ ($p = 0.019$) cells than F lesions.

4. Discussion

In this study, we compared the *in situ* inflammatory response of ATL and SP lesions to evaluate how the skin immune system reacts to different pathogens. Although both infections primary target the skin, they can present different degrees of *in situ* granulomatous reactions and different courses of disease. In addition, SP is often a subacute infection, which is characterized by an exudative reaction, whereas ATL is a chronic disease, which is characterized by a long duration of infection and the presence of non-exudative ulcers.^[26-28] Furthermore, their infectious agents mainly affect different cellular compartments (extracellular and intracellular). As a result, we hypothesized that differences in the cellular composition and markers of the *in situ* inflammatory activity of ATL and SP lesions could reveal two different types of pattern, namely, intracellular and extracellular responses.

Our results showed that ATL lesions elicited a pattern of intracellular response that is characterized by more macrophages, CD3⁺, CD8⁺, and FasL⁺ cells as well as higher NOS2 expression than LC or F lesions. As *Leishmania* spp. infects and thrives inside phagocytes, to reduce the parasite burden these cells should be activated or eliminated.^[9,24,29] Since the cellular immune response and cytotoxicity have major roles in the effector immune response to control intracellular pathogens^[30], this profile would characterize the intracellular pattern of the skin immune response against intracellular pathogens.

On the other hand, our results demonstrated that LC lesions predominantly elicited an extracellular response that is characterized by more neutrophils and B cells, fewer T lymphocytes, and markers of cytotoxic response than ATL lesions. In response to extracellular pathogens like helminthes, Gram-negative bacteria, fungi or some protozoa, it is thought that secretory factors, antibodies, enzymes, antibiotic peptides, and various cells, such as mast cells, neutrophils, and eosinophils, are responsible for reducing the microorganism burden.^[31] However, there are few studies on the immune response in SP. In a murine model of SP infection, thymus-derived cells are involved in resistance to this infection, which suggests that cellular immunity is important in host resistance to this infection.^[32-34] On the other hand, the expression of specific immunoglobulins increases as the fungal load decreases in mice, which suggests that the humoral immune response could be related to pathogen elimination or a secondary protective mechanism.^[35]

In addition, active lesions of sporotrichosis, particularly the LC form, are often rich in neutrophil elastase (microabscesses), which causes tissue liquefaction (pus).^[25] Although tissue damage is usually harmful, small amounts of neutrophil-mediated tissue

damage is beneficial because it destabilizes collagen fibers leading to the collapse of capillaries and lymphatic vessels and confines the infectious agent to a local, toxic environment where they can be destroyed.^[36] In addition, neutrophils also secrete chemotactic factors for T cells and can induce T cell activation via interferon γ .^[37] However, our results showed that the highest concentration of neutrophils occurred in LC lesions which are characterized by a regional lymphatic spread. As a result, even in the presence of the correct stimulus, an unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and facilitate fungal spread. Consequently, both cellular and humoral immune responses seem to be important to control the *S. schenckii* infection. Nevertheless, during the active disease, the secretion of immunoglobulins, enzymatic granules, and cytokines are important to control the fungal burden. Collectively, our results suggested that the SIS is a complex, adaptable system that is capable of optimizing the response to intracellular or extracellular pathogens.

We also observed differences in the clinical presentation of ATL and SP. For example, ATL lesions developed more slowly than the LC or F lesions. In fact, after only 2 weeks of infection, 6 SP patients already developed lesions. On the other hand, in ATL lesions, the infection occurred more than 2 months before the patient's first medical visit. These observations suggest a relationship between the nature of the etiological agent and the immune response leading to the development of acute, subacute, or chronic lesions.

In addition to the differences that we observed in the localization of the inflammatory infiltrate in ATL and SP lesions in the dermis, we observed extensive tissue destruction in SP lesions, especially in the LC form. These differences could be due to a difference in the site of pathogen inoculation. Since the proboscis of sand flies

is very short, *Leishmania* promastigotes are usually inoculated into the upper papillary dermis.^[38] In contrast, *S. schenckii* yeast like cells or conidia are generally deep inoculated close to subcutaneous areas or the reticular dermis by cutaneous trauma, such as from vegetables and scratches or bites from infected cats.^[23] It is not known whether these differences can affect the *in situ* immune response to these pathogens.

Although these response models can account for the classical clinical presentation of ATL and LC form of sporotrichosis, some patients have atypical forms^[25,32-34] with different degrees of inflammation when compared with the typical clinical presentation. In this regard, F lesions have an intermediate severity and development time compared with LC and ATL lesions. Consistent with these characteristics, the *in situ* inflammatory reaction in F lesions exhibited fewer macrophages, CD3⁺, CD8⁺, and FasL⁺ cells as well as lower NOS2 expression than ATL lesions and fewer neutrophils and B cells than LC lesions. In addition, our previous study^[24] showed that F lesions have less fungal burden than LC lesions as well as clinical similarities (localized lesions without lymphatic alterations) compared with ATL lesions. On the other hand, when compared with F lesions, LC lesions presented higher fungal burden and are characterized by numerous nodules or plaques on the skin, regional lymphatic dissemination, and elevated necrosis. On the basis of these findings, we hypothesize that the SIS response in patients with the F form of SP rapidly controls the fungal burden which reduces the severity of lesions and the exudative reaction, thereby promoting a more balanced immune response. Although this model of immune response might not be completely applicable to the sporotrichoid form of ATL, it should be noted that even in sporotrichoid leishmaniasis, the lesions are less exudative and develop more chronically than LC lesions. Further studies of the *in situ* inflammatory

reaction and the parasites from sporotrichoid ATL are needed to determine whether this model also applies to this clinical presentation.

We cannot exclude the possibility that different pathogen isolates could affect the SIS response to infection. Although different human *S. schenckii* isolates can affect both the immune response and development of infection in experimental sporotrichosis^[39] there is no clear relationship between human isolates and clinical presentation when genotype, protein expression, or antifungal susceptibility patterns are considered.^[40,41] In addition, we cannot exclude the possibility that, during infection, *Leishmania* amastigotes and *S. schenckii* cells can be transiently localized in the extracellular and intracellular milieu, respectively. This possibility could be important to control the parasite and fungal burden; however, the duration of the transience and the effects on the skin immune response are not known. Nevertheless, our results suggested that the clinical presentation of infectious skin diseases could be due to a combination of factors from the host SIS and etiological agent.

Finally, it is possible that the pattern of response of the SIS could be also modulated by association of pathogens in secondary infections in skin wounds or co-infections. For example, we reported previously the maintenance of neutrophil infiltrate in late lesions of ATL.^[24] A secondary infection may have maintained this neutrophil infiltrate and, consequently, increased the severity of lesions.^[42] In addition, the presence of T cells that are reactive to unrelated antigens, such as *Toxoplasma gondii*, in ATL lesions has been reported and might influence the pathogenesis of skin infections.^[43]

Thus, our results suggested three conclusions. First, the SIS is a complex, adaptable system that is capable of responding with plasticity to intracellular or

extracellular pathogens in order to control of microorganism burden. Second, the clinical presentation of infectious skin diseases could be due to a combination of factors from the host SIS and etiological agent. Third, it is possible that the SIS response can be modulated by association of pathogens in secondary infections in skin wounds or co-infections.

5. Acknowledgements

This study was funded by IOC and IPEC-FIOCRUZ, PAPES 5, FUNASA/MS, CNPq and FAPERJ, Brasil. We thank the patients who participated in this study. A.O.S is recipient of fellowships from CNPq and FAPERJ.

6. Disclosures: The authors have no conflicts of interest.

7. References

- [1] B. Spellberg, The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity, *Life Sci* 67 (2000) 477-502.
- [2] J.W. Streilein, Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin, *J Invest Dermatol* 71 (1978) 167-71.
- [3] J.D. Bos, M.L. Kapsenberg, The skin immune system: progress in cutaneous biology, *Immunol Today* 14 (1993) 75-8.
- [4] T. Christoph, S. Müller-Röver, H. Audring, D.J. Tobin, B. Hermes, G. Cotsarelis, R. Rückert, R. Paus, The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege, *Br J Dermatol* 142 (2000) 862-73.
- [5] R. Paus, B.J. Nickoloff, T. Ito, A 'hairy' privilege, *Trends Immunol* 26 (2005) 32-40.
- [6] T. Ito, N. Ito, M. Saathoff, B. Stampachiachiere, A. Bettermann, S. Bulfone-Paus, M. Takigawa, B.J. Nickloff, R. Paus, Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege, *J Invest Dermatol* 125 (2005) 1139-48.

- [7] F. Conceição-Silva, R.C. Dórea, C. Pirmez, A. Schubach, S.G. Coutinho, Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis, *Clin Exp Immunol* 79 (1990) 221-6.
- [8] F. Conceição-Silva, B.L. Perlaza, J.A. Louis, P. Romero, *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses, *Eur J Immunol* 24 (1994) 2813-7.
- [9] F. Conceição-Silva, M. Hahne, M. Schröter, J. Louis, J. Tschopp, The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity, *Eur J Immunol* 28 (1998) 237-45.
- [10] C. Pirmez, C. Cooper, M. Paes-Oliveira, A. Schubach, V.K. Torigian, R.L. Modlin, Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions, *J Immunol* 145 (1990) 3100-4.
- [11] A.A. Ahmed, K. Nordlind, M. Schultzberg, S. Lidén, Interleukin-1 alpha- and beta-, interleukin-6- and tumour necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions, *Acta Derm Venereol* 74 (1994) 435-40.
- [12] S. Khanolkar-Young, D. Snowdon, D.N. Lockwood, Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions, *Clin Exp Immunol* 113 (1998) 438-42.
- [13] C.H. Orteu, L.W. Poulter, M.H. Rustin, C.A. Sabin, M. Salmon, A.N. Akbar, The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation, *J Immunol* 161 (1998) 1619-29.
- [14] A.L. Bertho, M.A. Santiago, A.M. Da-Cruz, S.G. Coutinho, Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis, *Braz J Med Biol Res* 33 (2000) 317-25.
- [15] F.G. Bravo, E. Gotuzzo, Cutaneous tuberculosis, *Clin Dermatol* 25 (2007) 173-80.
- [16] T. Narang, S. Dogra, I. Kaur, Localized lepromatous leprosy in household contact of multibacillary disease, *J Cutan Med Surg* 12 (2008) 139-41.
- [17] M. G. Araújo, Leprosy in Brazil, *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (2003) 373-82.
- [18] A.F. Marques, M.B. da Silva, M.A.P. Juliano, J.E. Munhöz, L.R. Travassos, C.P. Tabora, Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microbes Infect* 10 (2008) 1251-8.
- [19] A. Restrepo, G. Benard, C.C. de Castro, C.A. Agudelo, A.M. Tobón, Pulmonary paracoccidioidomycosis, *Semin Respir Crit Care Med* 29 (2008) 182-97.

- [20] A. Schubach, M.B.L. Barros, B. Wanke, Epidemic sporotrichosis, *Curr Opin Infect Dis* 21 (2008) 129-33.
- [21] J.A.L.Lindoso, A.A.B.P. Lindoso, Neglected tropical diseases in Brazil, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51 (2009) 247-53.
- [22] A.H.S. Gomes, I.M. Armelin, S.Z. Menon, V.L. Pereira-Chioccolla, *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis, *Exp Parasitol* 119 (2008) 319-24.
- [23] M.B.L. Barros, A.O. Schubach, A.C.F. do Valle, M.C. Gutierrez-Galhardo, F. Conceição-Silva, T.M. Schubach, R.S. Reis, B. Wanke, K.B. Marzochi, M.J. Conceição, Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases, *Clin Infect Dis* 38 (2004) 529-35.
- [24] F.N. Morgado, A. Schubach, C.M.V. Rosalino, L.P. Quintella, G. Santos, M. Salgueiro, F. Conceição-Silva, Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis?, *Br J Dermatol* 158 (2008) 50-8.
- [25] F.N. Morgado, A.O. Schubach, M.B.L. Barros, F. Conceição-Silva, The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis, *Med Mycol* [Internet]. (2011); Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254963>
- [26] A.O. Schubach, K.B.F. Marzochi, J.S. Moreira, T.M.P. Schubach, M.L. Araújo, A.C.F. Vale, S.R. Passos, M.C. Marzochi, Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate, *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (2005) 213-7.
- [27] A.O. Schubach, T.M.P. Schubach, M.B.L. Barros, Epidemic cat-transmitted sporotrichosis, *N Engl J Med* 353 (2005) 1185-6.
- [28] M.B.L. Barros, A.O. Schubach, T.M.P. Schubach, B. Wanke, S.R. Lambert-Passos, An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases, *Epidemiol Infect* 136 (2008) 1192-6.
- [29] A.M. Da-Cruz, R. Bittar, M. Mattos, M.P. Oliveira-Neto, R. Nogueira, V. Pinho-Ribeiro, R.B. Azeredo-Coutinho, S.G. Coutinho, T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy, *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002) 251-6.
- [30] J.A. Louis, F. Conceicao-Silva, H. Himmelrich, F. Tacchini-Cottier, P. Launois, Anti-leishmania effector functions of CD4+ Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice, *Adv Exp Med Biol* 452 (1998) 53-60.

- [31] P.Fietta, G. Delsante, The effector T helper cell triade, Riv Biol 102 (2009) 61-74.
- [32] N. Iftikhar, I. Bari, A. Ejaz, Rare variants of Cutaneous Leishmaniasis: whitlow, paronychia, and sporotrichoid, Int J Dermatol 42 (2003) 807-9.
- [33] M. López-Escobar, M. Drake-Monfort, R. Salesa-Gutiérrez de Rozas, S. Hermana-Ramírez, Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis, Actas Dermosifiliogr. 98 (2007) 444-5.
- [34] A.U. Bari, S.B. Rahman, Many faces of cutaneous leishmaniasis, Indian J Dermatol Venereol Leprol 74 (2008) 23-7.
- [35] R.C. Nascimento, S.R. Almeida, Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis, FEMS Immunol Med Microbiol 43 (2005) 241-7.
- [36] C. Nathan, Neutrophils and immunity: challenges and opportunities, Nat Rev Immunol 6 (2006) 173-82.
- [37] K. Venuprasad, S. Chattopadhyay, B. Saha, CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response, Hum Immunol 64 (2003) 38-43.
- [38] R.P.P. Soares, S.J. Turco, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review, An Acad Bras Cienc 75 (2003) 301-30.
- [39] M.M.S. Brito, F. Conceição-Silva, F.N. Morgado, P.S. Raibolt, A. Schubach, T.P. Schubach, G.M. Schäffer, C.M. Borba, Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model, Med Mycol 45 (2007) 721-9.
- [40] M.C.G. Galhardo, R.M.Z. De Oliveira, A.C.F. Valle, R.A. Paes, P.M. Silva-Tavares, A. Monzon, E. Mellado, J.L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil, Med Mycol 46 (2008) 141-51.
- [41] G.F. Fernandes, C. Do Amaral, A. Sasaki, P.M. Godoy, Z.P. De Camargo, Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates, Med Mycol 47 (2009) 855-61.
- [42] D. Van Der Vliet, A. Le Guern, S. Freitag, N. Gounod, A. Therby, H. Darie, P.A. Buffet, *Pseudomonas aeruginosa* otochondritis complicating localized cutaneous leishmaniasis: prevention of mutilation by early antibiotic therapy, Am J Trop Med Hyg 75 (2006) 270-2.

- [43] A.M. Da-Cruz, M.P. Oliveira-Neto, A.L. Bertho, C.O. Mendes-Aguiar, S.G. Coutinho, T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions, *J Invest Dermatol* 130 (2010) 1329-36.

Table 1. Distribution of age, duration of infection, and number of lesions in patients.

Clinical data	ATL^a	LC^b	F^c	P^d	p	p
	n = 18	n = 19	n = 11	LC vs. F	LC vs. ATL	F vs. ATL
	Median	Median	Median			
	(Range)	(Range)	(Range)			
Age (years)	38.5 (18–69)	41.0 (16–68)	24.0 (18–53)	0.085	0.96	0.062
Duration of infection (months)	2.0 (1–12)	1.37 (0.25–4.5)	0.75 (0.25–1.75)	0.026	0.016	0.0001
Number of lesions	1.0 (1–6)	7.0 (1–28)	1.0 (1–4)	0.001	0.0001	0.50

^aAmerican tegumentary leishmaniasis

^blymphocutaneous sporotrichosis

^cfixed sporotrichosis

^dMann-Whitney U test. Boldfaced p-values are statistically significant ($p < 0.05$).

Table 2. Intensity of the inflammatory infiltrate in the lesions of patients.

Intensity of the inflammatory infiltrate in lesions				
Group	Cells·mm ⁻²	Discrete	Moderate	Intense
	Median (Range)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
ATL ^a	1293.21 (277.78–2197.80)	2 (11%)	3 (16.7%)	13 (72.2%)
LC ^b	1344.00 (365.00–2844.00)	1 (5.3%)	7 (36.8%)	11 (57.9%)
F ^c	898.00 (287.00–1.972.00)	2 (18.2%)	6 (54.5%)	3 (27.3%)

p = 0.959 (ATL vs. LC); p = 0.243 (ATL vs. F). Mann-Whitney U test; p < 0.05 was considered statistically significant. ^aATL- American tegumentary leishmaniasis; ^bLC- lymphocutaneous; ^cF- fixed sporotrichosis

Table 3. Percentage composition of cell types and inflammatory markers in American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis lesions.

Cell types or inflammatory markers	ATL ^a	LC ^b	F ^c
	Median (Range)	Median (Range)	Median (Range)
Neutrophils (%)	10.6 (0.9–37.7)	24.7 (4.3–49.6)	6.7 (1.9–17.5)
Macrophages (%)	47.55 (33.5–53.8)	38.4 (18.4–64.7)	37.7 (24.2–62.2)
CD3 (%)	56.65 (31.7–70)	47.6 (27.5–62.1)	41.9 (27.5–65.8)
CD4 (%)	39.6 (16.3–61)	39.9 (25.7–54.4)	30 (17.8–44.6)
CD8 (%)	34.9 (15.3–48.5)	22 (12–42.9)	21.7 (15.6–31.2)
Follicular dendritic cells (%)	2.65 (0–13.9)	0.9 (0–3.3)	1.9 (0–4.2)
CLA (%)	28.75 (9.4–55.1)	25.9 (3.2–47.1)	28.2 (10.6–41.5)
Ki-67 (%)	8.95 (5.1–24)	7.3 (1.7–16.9)	5.7 (1.8–15.5)
Bcl-2 (%)	40.9 (6.7–68.4)	37.4 (22.6–48)	28.6 (12–48)
FasL (%)	24.5 (9.9–36.2)	13.6 (4.2–29)	10.7 (3.4–25.5)
Fas (%)	52.37 (11.8–78.4)	40.35 (9.5–75)	39 (17.2–50.4)
CD22·mm ⁻²	5.3 (0–46)	142.67 (23.7-689)	40 (5.7–98.4)
Langerhans cells·mm ⁻²	5.5 (0.5–13)	2 (0–11)	4 (0–8)
NOS2 expression	3 (1–4)	2 (0–3)	1 (0–2)
E-selectin expression	3 (1–4)	2 (1–4)	2 (1–4)

^aATL- American tegumentary leishmaniasis; ^bLC- lymphocutaneous; ^cF- fixed sporotrichosis

Figure Legends

Figure 1. Comparison of the clinical presentations of patients with the fixed (A) or lymphocutaneous (C) form of sporotrichosis (SP) and localized (B) or sporotrichoid (D) American tegumentary leishmaniasis (ATL). Note the similarities between the forms of SP and ATL.

Figure 2. Distribution of (A) CD3⁺ cells, (B) CD8⁺ cells, (C) CD68⁺ cells, (D) nitric oxide synthase 2 (NOS2) expression, (E) neutrophilic elastase-positive cells, (F) Fas⁺ cells, (G) FasL⁺ cells, and (H) Ki-67⁺ cells. The line indicates the median of the group. $p < 0.05$ was considered statistically significant. LC, lymphocutaneous form of sporotrichosis; F, fixed cutaneous form of sporotrichosis; ATL, American tegumentary leishmaniasis.

Figure 3. NOS2 expression (A,C,E) and neutrophils (B,D,F) in active lesions of ATL (A,B), LC (C,D), and F (E,F) patients. Magnification 200 \times (scale bar = 50 μ m). ATL, American tegumentary leishmaniasis; LC, Lymphocutaneous form of sporotrichosis; F, fixed form of sporotrichosis.

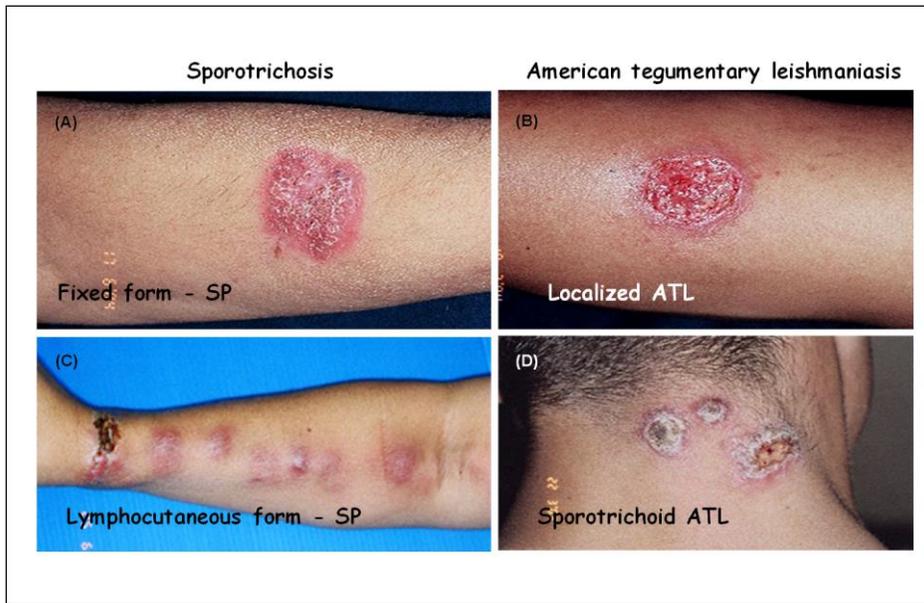


Figure 1

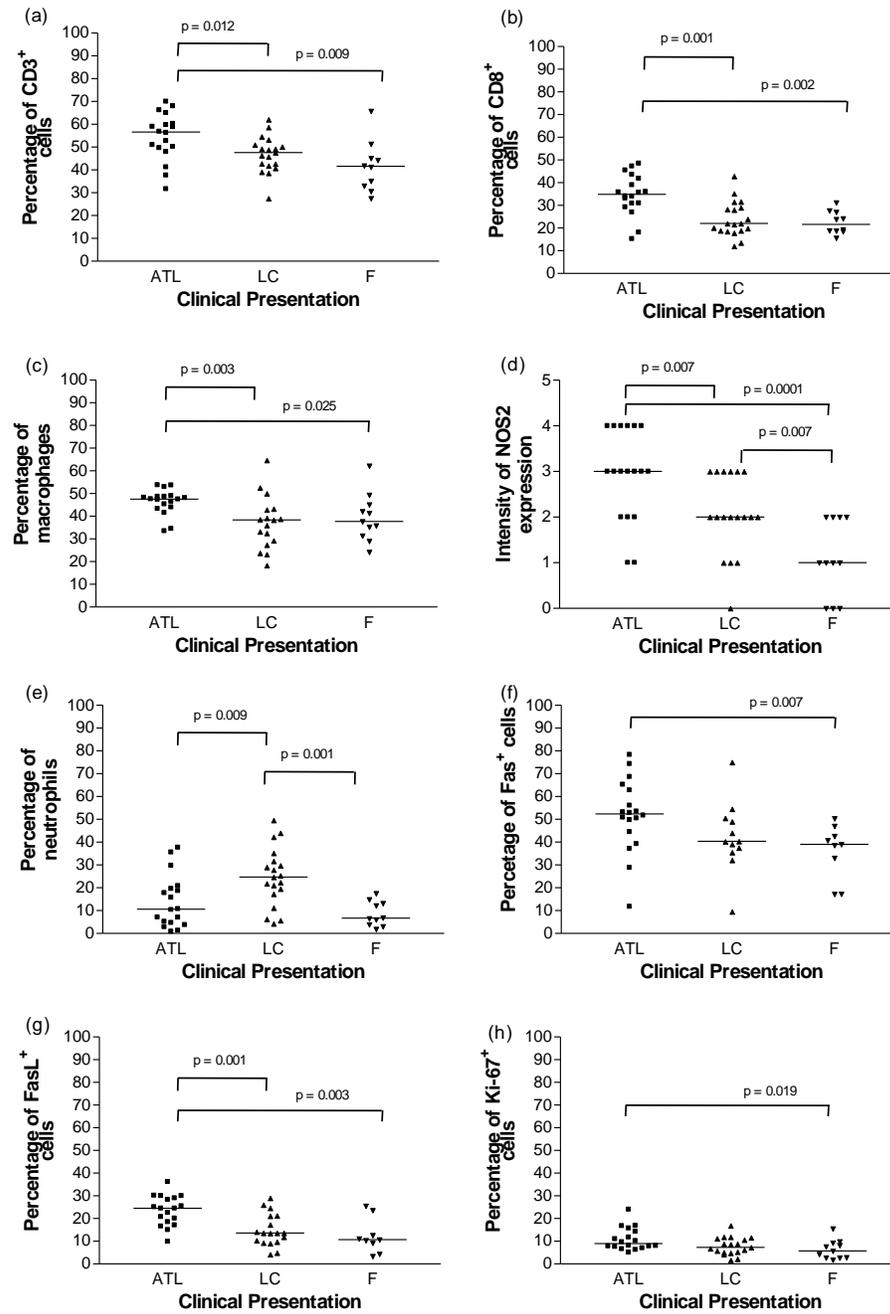


Figure 2

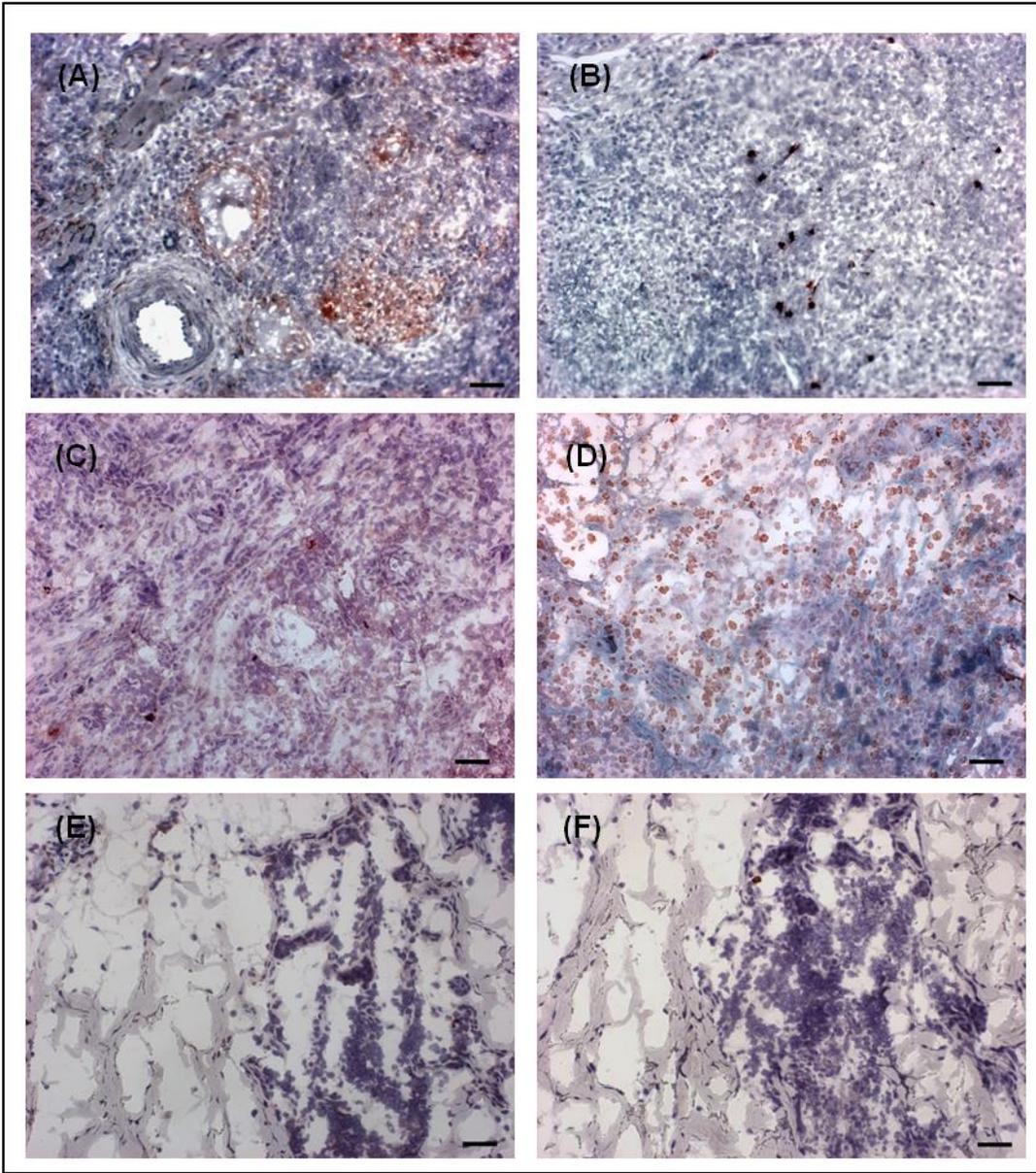


Figure 3

4.2.3 Conclusões referentes ao artigo submetido à revista *Microbes and Infection*

1 - A resposta inflamatória *in situ* se correlaciona com a forma clínica e o agente etiológico responsável pelo quadro infeccioso.

2 - As lesões de LTA apresentavam maior quantidade de células T CD3⁺, T CD8⁺, células FasL⁺, macrófagos e NOS2 do que as lesões de esporotricose, caracterizando o padrão de resposta da pele aos microrganismos intracelulares.

3 – As lesões da forma cutânea-linfática de esporotricose apresentavam maior quantidade de neutrófilos, células B e células dendríticas foliculares, caracterizando o padrão de resposta da pele aos microrganismos extracelulares.

4 – Os dados sugerem que o controle da carga fúngica nas lesões de esporotricose seja provavelmente realizado através de mecanismos efetores secretórios pela cooperação entre neutrófilos e macrófagos. Por outro lado, os mecanismos efetores responsáveis pelo controle parasitário nas lesões de leishmaniose dependeria da ação citotóxica através da ativação de células CD8⁺ e macrófagos assim como pelo aumento da expressão de FasL e NOS2.

5 – O infiltrado inflamatório das lesões da forma fixa da esporotricose apresentava características intermediárias aos padrões intracelular e extracelular, fato que pode estar relacionado tanto às características de resposta imune do hospedeiro, quanto a particularidades do patógeno. Neste contexto, é importante destacar que nossos resultados demonstraram que esta forma de esporotricose apresenta menor carga fúngica, menor infiltrado de polimorfonucleares e que o tecido é permeado por fibrose, sugerindo uma contenção de atividade inflamatória quando comparado à forma linfocutânea.

6 – O sistema imune da pele é um sistema complexo capaz de responder a diferentes patógenos e de montar padrões de resposta mais adaptados ao controle de cada microrganismo.

7 – A apresentação clínica poderia ser o resultado da associação entre características do sistema imune do hospedeiro e de particularidades do agente etiológico.

4.3 DIFFERENCES IN INTERFERON GAMMA AND IL-10 EXPRESSION BETWEEN SPOROTRICHOSIS AND AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS PATIENTS DETECTED BY ELISPOT ASSAY

Artigo em fase de finalização do manuscrito

O terceiro artigo, ainda em fase de finalização, consistiu no estudo da resposta imune sistêmica e comparação dos achados entre as diferentes formas clínicas da esporotricose (formas fixa e cutânea-linfática) e Leishmaniose tegumentar americana. Foi feita a detecção e quantificação de células produtoras de citocinas (IFN- γ e IL-10) espontâneas, assim como após resposta ao mitógeno e antígenos específicos (Ss-Ag e Lb-Ag). Os dados obtidos neste estudo evidenciaram uma maior produção sistêmica de IFN- γ em resposta ao antígeno específico pelos pacientes LTA. Além disso, foi observada a produção de IL-10 sistêmica em indivíduos saudáveis, assim como a capacidade de estimulação da produção desta citocina por antígenos de *S. schenckii*. Foram ainda evidenciadas diferenças com relação a quantidade de células produtoras de IFN- γ espontâneas entre os pacientes e os indivíduos saudáveis, sugerindo que apesar da compartimentalização de resposta imune da pele, os pacientes apresentam um estado de ativação sistêmica.

Além disso, os dados obtidos neste estudo sugerem a possível utilização da técnica de detecção de células de sangue periférico produtoras de IFN- γ antígeno-específicas através de Elispot para o diagnóstico diferencial entre pacientes acometidos por Leishmaniose tegumentar americana e esporotricose.

O estudo da produção de citocinas pelas células de lesão evidenciou diferenças quando comparado ao sangue periférico. Não foi possível observar diferenças entre os grupos, pois as lesões apresentaram grande quantidade de células ativadas, antígeno-relacionadas e não-relacionadas que migram para o sítio de lesão em resposta aos processos de ativação endotelial e tecidual, e provavelmente influenciam a progressão ou não da doença. Assim, células de lesão não são adequadas para a diferenciação destas doenças pela técnica de Elispot.

Os resultados obtidos respondem os objetivos de nº 3, 4 e 5 da tese de doutorado.

4.3.1 Differences in interferon gamma and IL-10 expression between sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis patients detected by elispot assay

Key words: ATL, *Sporothrix schenckii*, lymphocutaneous sporotrichosis, fixed cutaneous sporotrichosis, immunohistochemistry, *Leishmania*

Authors: F. N. Morgado^{1,2}; A. O. Schubach²; M. I. Pimentel²; M. R. Lyra²; E. C. Vasconcellos²; C. M. V. Rosalino²; F. Conceição-Silva^{1*}.

¹Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

²VigiLeish and Serviço de Infectologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

*Correspondence: F. Conceição-Silva, Lab Imunoparasitologia, IOC/FIOCRUZ, Pavilhão 26 – 4º andar, sala 406-C, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900/Rio de Janeiro – RJ, Brasil. Phone number: 55-21-38658222. Fax number: 55-21-22900479 (email: fconcei@ioc.fiocruz.br).

Supported by: IOC and IPEC-FIOCRUZ, PAPES 4 and 5, FUNASA/MS, CNPq and FAPERJ, Brazil.

Disclosures: The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

ABSTRACT

Clinical presentation of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and sporotrichosis (SP) can be very similar. Although systemic immune response and cytokine profile in leishmaniasis have been fully studied, little is known about these in different clinical forms of human sporotrichosis (SP). In order to understand some aspects of immune response in SP, we quantified the systemic and *in situ* IFN- γ and IL-10 responder cells to *S. schenckii* antigen (Ss-Ag) and *L. braziliensis* antigen (Lb-Ag) through Elispot assay and compared the results with those obtained from ATL patients, other etiologies patients (OE) and healthy individuals. Five groups were formed: 1- lymphocutaneous form of SP (LC, n=9); 2- Fixed form of SP (F, n=10); 3- cutaneous form of ATL (n=15); 4- OE (n=5); 5- healthy (n=14). Spontaneous secretion of IFN- γ by SP and ATL was higher than healthy subjects ($p < 0.05$). ATL presented higher numbers of IFN- γ secreting cells than F ($p = 0.015$) and lesser numbers of IL-10 secreting cells than F ($p = 0.0001$) and LC ($p = 0.004$) patients when only specific-antigen stimulation was considered. Ss-Ag was able to stimulate IL-10 production in all groups studied including healthy subjects. The data suggest that 1- despite the inflammatory activity be concentrate at the lesion site, the immune response can be reflected at the peripheral system, 2- higher IFN- γ and NOS2 expression in ATL than in sporotrichosis patients could be probably related to control mechanisms of intracellular pathogen, 3- a possible role of the equilibrium between IFN- γ production and humoral response in pathogenesis and control of fungal burden in sporotrichosis, 4- *S. schenckii* could be able to modulate the immune response also by inducing IL-10 production by human cells probably using this as a mechanism of immune escape.

INTRODUCTION

In Rio de Janeiro (Brazil) the American tegumentary leishmaniasis (ATL) caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* shares the same endemic area (Barros et al. 2005). The clinical appearance of lesions and the epidemiological characteristics of both diseases can be very similar and the identification of the etiologic agent is crucial. Although clinical presentations could be very similar, as between fixed form (F) of sporotrichosis and localized cutaneous form of ATL, differences in the *in situ* inflammatory reaction have been already observed (Morgado et al. submitted). Active lesions of ATL presented higher number of CD3⁺, CD8⁺ and FasL⁺ cells, macrophages and NOS2 than lymphocutaneous (LC) or F forms. On the other hand, active lesions from LC patients presented higher number of neutrophils and B cells. As *Sporothrix schenckii* is an extracellular pathogen which can be observed inside macrophages, the data suggested that the *in situ* fungal control in sporotrichosis lesions could be done through secretory effectors mechanisms by cooperation between neutrophils, macrophages and B cells (Morgado et al. submitted, Morgado et al. 2011). On the other hand, *Leishmania* is an intracellular parasite that survives inside cells from mononuclear phagocytic system. Consequently, the *in situ* effectors mechanisms responsible for parasite control in leishmaniasis could depend on CD8⁺ cells activation as well as macrophages through the expression of FasL and NOS2 expression, respectively (Conceição-Silva et al. 1998, Da-Cruz et al. 2002, Morgado et al. 2008). These data not only suggest different effectors mechanisms responsible for control of infection, but also that the skin immune system could be a complex and adaptable system that is capable of different responses to intracellular or extracellular pathogens (Morgado et al. submitted). As consequence, clinical presentation could be influenced by the different profile of the *in situ* immune response. Although systemic immune response and cytokine profile in leishmaniasis have been fully studied, little is known about the immune response and cytokine profile in different clinical forms of human sporotrichosis.

In order to understand some aspects of immune response in sporotrichosis, we quantified the systemic and *in situ* IFN- γ and IL-10 responder cells to *S. schenckii* antigen (Ss-Ag) and *L. braziliensis* antigen (Lb-Ag) through Elispot assay. We also compared the results with those obtained from ATL patients, patients with other etiologies and healthy individuals. In addition to the differences observed between groups, we also observed that the Elispot assay for quantification of IFN- γ responder cells could be a useful method for the differential diagnosis between ATL and sporotrichosis patients when the ethiological agent cannot be identified.

METHODS

Patients

Patients attending at the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ were enrolled in the study after formal consent approved by the Institutional Ethics Committee on Human Research (CEP-IPEC protocol 014/2002). Peripheral venous blood and lesions fragments were collected from 39 patients with ATL, sporotrichosis or other etiologies. Group 1 and 2 consisted patients with lymphocutaneous form (LC, n = 9) and Fixed form (F, n = 10) of the sporotrichosis respectively. Group 3 consisted of patients with cutaneous form of the American tegumentary leishmaniasis (ATL, n = 15) and Group 4 patients with others etiologies (OE, n = 5, including 2 bacterial lesions, 1 dermatophytosis, 1 hypertensive ulcer and 1 stasis ulcer). All ATL and sporotrichosis patients had been confirmed by parasitological or fungal isolation. A fifth group of healthy subjects (n = 14) was included as control.

***S. schenckii* antigen preparation (Ss-Ag)**

The yeast-like phase of the *Sporothrix schenckii* strain 17629, kindly provided by Dr Zancopé-Oliveira (IPEC-FIOCRUZ) was culture in BHI under the same conditions described by Brito et al. (2007). The fungal cells were washed three times in sterile PBS buffer, adjusted to 10⁸ cells/mL in PBS

and disrupted by 10 repeated cycles of freezing and thawing, followed by ultra-sonication (Ultra-Lip Labsonic Systems, lab-line, USA). Samples were stored at -20°C until used in experimental studies.

***L. braziliensis* antigen preparation (Lb-Ag)**

Leishmania antigen was prepared as previously described (Conceição-Silva et al. 1990). Briefly, promastigotes of *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1999/RVSB) were cultivated at 28°C in Schneider's Drosophila Medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS-Hyclone) and L-glutamine (Sigma, USA). The promastigotes were washed three times, adjusted to 108 parasites/mL in PBS buffer and disrupted by repeated cycles of freezing and thawing followed by ultrasonication (Ultra-Lip Labsonic Systems, lab-line, USA). The samples were stored at -20°C until use.

Separation of peripheral blood mononuclear cells and cells from skin lesions

PBMC was obtained as previously described (Conceição-Silva et al. 1990). Briefly, cells were separated from peripheral blood by centrifugation over a gradient of Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma). Mononuclear cell were resuspended in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 10% FCS (Hyclone), 10mM HEPES, 1.5mM L-glutamine and antibiotics (200 U/ml penicillin and 200 µg/mL streptomycin).

Cells from skin lesions fragments were obtained by disruption of the tissue fragment by passage under pressure in a stainless steel screen mesh (Sigma) and subjected to sedimentation for 5 minutes. The cells-enriched supernatant was washed twice in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) for 10 minutes at 2000 rpm.

Viable PBMC were adjusted to 2x10⁶ cells / mL and 1x10⁶ cells / mL. Viable cells from lesions were adjusted to 1x10⁵ to 1x10⁶ cells / mL depending on the amount of cells recovered.

IFN- γ and IL-10 Elispot

The Elispot assay was performed as previously described (Lima-Junior et al. 2008). Briefly, a 96 well microplates (Multiscreen Millipore, France) were coated with 5 μ g/mL of a primary purified antibodies anti-IFN- γ (Mabtech, OH, USA) for 12-16 hours at 4 ° C. The plates were blocked with RPMI medium containing 10% fetal calf serum for at least 2 h. A total of 2 x 10⁵ and 1 x 10⁵ PBMC or 1 x 10⁴ to 1 x 10⁵ skin cells were added to the ELISPOT plates in the presence of medium alone, Ss-Ag or Lb-Ag (10⁶ disrupted parasites or fungal cells per well) Concanavalin A (ConA 4 μ g/mL – Sigma). Cells were stimulated for 40 hours at 37°C, 5% CO₂ under sterile conditions. After stimulation, the plates were washed three times with sterile PBS followed by three washes with PBS containing 0.05% tween 20 (PBS-T) (Sigma) and incubated with either 1 μ g/mL biotinylated antibody anti-IFN- γ (Mabtech, OH, USA) or IL-10 diluted in PBS-T containing 1% fetal bovine serum (PBS-TF) for 3 hr at 37°C.. The plates were washed four times with PBS-T and incubated with streptavidin-alkaline phosphatase (MabTech) in PBS 1 % FCS for 1 hr at 37°C. The plates were washed four times with PBS-T before development with 1-step BCIP/NBT (Sigma) (1 hour incubation at 37°C) was performed. Development were stopped with destiled water and the spots were counted with an Immunospot reader (Cellular Technology Ltd, Cleveland, OH) using the Immunospot Software Version 3.

The results were expressed as number of spots/2 X 10⁵ cells in the antigen stimulated wells subtracted by the mean number of spots in control wells with medium alone from the same donor. The assay was subsequently categorized as positive or negative depending on whether the mean number of Spots in the antigen stimulated wells was greater than the mean number of spots plus twice the standard deviation in antigen stimulated wells of healthy control subjects. Therefore individuals presenting more than 47 IFN- γ spots for Ss-Ag and 12 for Lb-Ag were considered positive. In addition, individuals presenting more than 909 IL-10 spots for Ss-Ag and 0 for Lb-Ag were considered positive.

Statistical analysis

The SPSS16 for windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA), was used for statistical analysis, using the nonparametric Mann-Whitney test for comparison between the LC, F and ATL groups. The data are reported as median and interquartile values.

RESULTS

IFN- γ responder PBMC to Ss-Ag and Lb-Ag

Spontaneous secretion of IFN- γ in the absence of stimulus (control wells) by patients groups was higher than healthy subjects ($p < 0.05$) and was clearly observed in one LC, three F and three ATL patients (figure 1a).

LC (Median 282, interquartile 189 - 408) and F (Median 176, interquartile 104.5 - 319.5) patients presented more IFN- γ -responder cells under Ss-Ag stimulus than ATL (Median 22, interquartile 0 – 56, $p = 0.002$ and 0.004 , respectively), healthy (Median 13, interquartile 1.5 – 29.75, $p = 0.0001$ and 0.0001 , respectively) or OE (Median 22, interquartile 12 – 83, $p = 0.003$ and 0.014 , respectively) patients (Figure 1b).

ATL patients presented more IFN- γ -responder cells under Lb-Ag stimulus (Median 458, interquartile 260 – 752) than LC (Median 12.5, interquartile 0 – 130, $p = 0.0001$), F (Median 3, interquartile 0 – 18.5, $p = 0.0001$), Healthy (Median 2, interquartile 0 – 8, $p = 0.0001$) or OE (Median 0, interquartile 0 – 5, $p = 0.001$) patients (Figure 1c).

When only antigen-specific response was considered and compared between groups, ATL patients presented higher numbers of IFN- γ secreting cells than F patients ($p = 0.015$) (Figure 1d). No differences were observed when comparing LC patients with ATL or F patients. Finally, all subjects presented positive response to ConA stimulation.

Healthy and OE patients produced insignificant amount of IFN-spots under Ss-Ag and Lb-Ag stimulation (Figures 1b-c) suggesting that these antigens can't stimulate cells from individuals that had no contact with both etiological agents.

IFN- γ responder cells in skin lesions

Spontaneous secretion of IFN- γ in the absence of stimulus (control wells) was observed in 100%, 87.5% and 80% of ATL (Median 100; interquartile 45-450), LC (Median 60; interquartile 17.5-86) and F patients (Median 28; interquartile 10-48), respectively (figure 2a). In addition, IFN- γ spontaneous cells were higher in ATL patients than F patients ($p = 0.038$).

No differences were observed when Ss-Ag response was evaluated (ATL: Median 206, interquartile 3 – 548; LC: Median 60, interquartile 27 – 534, F: 257, 144.5 – 544.5) (Figure 2b). On the other hand, ATL patients presented more responder cells under Lb-Ag stimulus (Median 160, interquartile 3 – 448) than LC (Median 0, interquartile 0 – 24, $p = 0.05$) or F patients (Median 0, interquartile 0 – 68, $p = 0.04$) (Figure 2c).

No differences were observed between groups when only antigen-specific response was considered and all subjects presented positive response to ConA stimulation.

IL-10 responses to Ss-Ag and Lb-Ag

Healthy subjects presented significant amount of spontaneous IL-10 producing cells (Median 640, interquartile 261 – 946), as well as ATL (Median 640, interquartile 430 – 696), LC (Median 186, interquartile 110.5 – 711), F (Median 729, interquartile 467.5 – 1010) and OE (Median 416, interquartile 210 – 515) patients (Figure 3a). In addition, ATL and F patients presented more IL-10 producing cells than OE patients ($p = 0.045$ and 0.027 , respectively).

Ss-Ag was able to stimulate IL-10 expression by PBMC from Healthy or patient groups. In addition, no differences were observed between groups (ATL: Median 69, interquartile 0 – 148; LC: Median 108, interquartile 6 – 297; F: Median 287, interquartile 31 – 537; OE: Median 252, interquartile 108 – 535; Healthy: Median 194, interquartile 103 – 644) (Figure 3b). On the other hand, Lb-Ag inhibited IL-10 expression in the majority of Healthy (Median 0, interquartile 0 – 0), ATL (Median 0, interquartile 0 – 0), LC (Median

0, interquartile 0 – 0), F (Median 0, interquartile 0 – 1.5) and OE group (Median 0, interquartile 0 – 33) (Figure 3c). No differences were observed between groups.

When only antigen-specific response was considered and compared between groups, ATL patients presented lesser numbers of IL-10 secreting cells than LC ($p = 0.004$) or F patients ($p = 0.0001$) (Figure 3d).

Elispot assay as a method for differential diagnosis between Sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis

The Elispot assay showed that the sensitivity of IFN- assays among American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis patients was 100%. However, the specificity of IFN response was 83% for ATL patients, 82% for F and 82% for LC patients (Table 1). Although five (33.3%) ATL patients also presented positive responses to Ss-Ag (Figure 1b), no evidence of direct fungal contact was detected. In addition, four (44.4%) LC patients and two (20%) F patients presented low positive response to Lb-Ag (Figure 1c). However, from this group, only one LC patient was from non-endemic area of ATL. Nevertheless, in all groups, the numbers of IFN- γ responder cells to specific antigens were always higher than to non-related antigen (figures 1b and 1c). In addition, only one OE patient (stasis ulcer) presented positive response to Ss-Ag and none of them presented positive response to Lb-Ag (figures 1b and 1c).

The frequency of IFN secreting cells from lesions was 77.8%, 80% and 100% for ATL, LC and F lesions, respectively, when the specific antigen was analyzed by Elispot method (Figure 2). Despite these results, the frequency of positive responses to non-related antigens was very high: 77.8%, 37.5% and 20% for ATL, LC and F lesions respectively.

Healthy subjects presented high amounts of IL-10 responder cells under Ss-Ag stimulus that generated a high *cut off* (*cut off* = 909). As consequence, all ATL, LC, F and OE patients presented negative IL-10 responses to Ss-Ag, as well as twelve ATL patients, nine F patients and four OE patients to Lb-Ag (Table 2).

DISCUSSION

In the present study, we quantified spontaneous and antigen stimulated peripheral blood or skin lesion IFN- γ and IL-10 responder cells by Elispot method in healthy subjects and sporotrichosis, ATL and others etiologies (bacterial lesions, dermatophytosis, hypertensive and stasis ulcer) patients. PBMC spontaneous IFN- γ -producing cells from patients were higher than that obtained by healthy subjects. The data suggest that despite the inflammatory activity be concentrate at the lesion site, the immune response can be reflected at the peripheral system as observed in the peripheral blood compartment, and it can be specifically measured. The dissemination of *Leishmania braziliensis* in human host presenting localized lesions has been already verified (Oliveira-Camera et al. 2006, Coutinho et al. 2002, Martinez et al. 1992). Systemic reactions like erythema nodosum has been already verified in sporotrichosis patients presenting only cutaneous lesions, along with fever, arthralgia and malaise (Galhardo et al, 2002). As fungal cells were not verified in tissues from erythema nodosum, Galhardo et al (2002) suggested that these systemic reactions could play a protective role, leading to a more benign evolution of the disease. Although the role of IFN- γ has been verified in leishmaniasis (Castellano et al. 2009, Reis et al. 2009, Tuon et al. 2008, Bittar et al. 2007), little is known about its role in human sporotrichosis. Despite of clinical similarities, we observed that ATL patients presented higher numbers of IFN- γ secreting cells than F patients when only antigen-specific response was considered and compared between groups. This result is related to our previous data concerning the *in situ* inflammatory reaction which showed that ATL lesions presented higher percentage of macrophages and NOS2 expression than sporotrichosis lesions (Morgado et al, submetido). Altogether, the data suggested increased macrophage activation with higher IFN- γ and NOS2 expression in ATL than in sporotrichosis patients probably related to control mechanisms of intracellular pathogen like amastigotes of *Leishmania*.

Although the lesser number of IFN- γ secretion cells in fixed patients than ATL, the detection of systemic and *in situ* IFN- γ production cells in LC and F patients suggests the role of IFN- γ in pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. In an *in vitro* study

(Uenotsuchi et al, 2006), the induction of Th1 response along with abundant IFN- γ production in mice were related to fungal isolates from patients presenting cutaneous manifestations. Isolates from patients presenting visceral manifestation induced minimal Th1 response and IFN- γ production. Although, we verified that LC lesions presented higher NOS2 expression than F lesions, along with higher fungal burden and extensive involvement of skin (Morgado et al, 2011), we could not observe differences in systemic or *in situ* IFN- γ responder cells between the both groups. Fernandes et al (2008) observed that the resistance of NOS2 knockout mice was related to a higher IFN- γ production and a reduced spontaneous and antigen stimulated IL-10 production along with reduced fungal burden than wild type mice. Altogether, these data suggest that the role of IFN- γ in fungal burden control and development of benign clinical presentations could not be related to macrophage activation via NOS2. Gozalbo & Gil (2009) suggested that IFN- γ is required not only for optimal activation of phagocytes and development of a Th1 protective response in *Candida albicans* infections, but also collaborates in the generation of protective antibody response. Almeida-Paes et al. 2007 measured IgG, IgM and IgA in sera from sporotrichosis patients presenting lymphocutaneous, fixed cutaneous, disseminated cutaneous and extracutaneous forms before and during itraconazole treatment. The authors observed an increase in the percentage of patients with detectable levels of IgG during treatment. However they observed a reduction in IgM and IgA levels in fixed and lymphocutaneous patients during and after treatment, the disseminated cutaneous and extracutaneous sporotrichosis presented maintenance of IgM and IgA levels. They suggested it could be due to a higher fungal burden in these patients, leading to continuous antigen presentation and antibody production, especially for IgM antibodies. In a recent work (Morgado et al. 2011), our group observed higher percentage of B cells in LC lesions that presented higher fungal burden. The induction of interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass (IgG2b and IgG2c) has been described (Gracie & Bradley 1996). On the other hand, Nascimento et al. (2008) observed that passive immunization with IgG1 of mice infected with *S. schenckii* lead to a significant reduction in the number of CFU in organs of mice associated with increase of IFN- γ production. Altogether, the data suggest the possible role of the equilibrium between IFN- γ

production and humoral response in pathogenesis and control of fungal burden in sporotrichosis. The study of IgG subclass in human sporotrichosis could clarify this hypothesis.

We observed a marked spontaneous IL-10 expression by PBMC from healthy subjects, as well as observed from SP or ATL patients. We could speculate that this fact would be related to homeostasis maintenance, but we cannot affirm the real meaning of this finding. When only antigen-specific stimulation was considered, we observed that LC and F patients presented higher IL-10 responder cells than ATL patients. In sporotrichosis, the resistance of mice was related to a higher IFN- γ expression and a reduced spontaneous or antigen stimulated IL-10 production (Fernandes et al. 2008). In the present work, we could not observe differences in spontaneous or stimulated IL-10 responder cells between sporotrichosis patient groups. Perhaps, the study of disseminated cutaneous form or the evaluation of total IL-10 production in culture supernatants could evidence differences and elucidate this question. However, we observed that Ss-Ag was able to stimulate IL-10 expression by PBMC from Healthy and patient groups. This modulation could be influenced by some components of *Sporothrix schenckii*. In this connection, Uenotsuchi et al. (2006) observed an induction of Th2 profile with IL-10 and IL-4 production by *S. schenckii* isolated from visceral origins and suggested that visceral isolates may escape from the host immune response by induce little Th1-prone responses. Some authors have demonstrated the influence of wall compounds of fungal cells in immune response (Carlos et al. 1998, Carlos et al. 2003, Nascimento & Almeida 2005). A specific humoral response with predominance of IgG1 and IgG3 in infected mice could be induced by *S. schenckii* antigens (Nascimento & Almeida 2005). In addition, the role of lipid compounds of the cell wall in the pathogenesis of sporotrichosis has already been demonstrated (Carlos et al. 2003). The lipid compound was found to inhibit the phagocytic process and to induce high liberation of nitric oxide and TNF- α in macrophage cultures. The data suggest that *S. schenckii* could be able to modulate the immune response also by inducing IL-10 production by human cells probably using this as a mechanism of immune escape.

In our study, we observed that the Elispot assay for quantification of IFN- γ -producing PBMC may be useful as a second choice for the determination of definitive

diagnosis, because it showed an antigen-specific response. Even the patients who presented positive response to the both antigens, the response was always higher for the specific stimulus. In these cases, the positive responses for both antigens can be explained by the presence of sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis in the same endemic area. Furthermore, 6% of sporotrichosis patients presented positive Montenegro Skin Test and are from non-endemic area of ATL (Schubach et al. 2005). The authors suggested that the both pathogens have common molecules that generate cross-reaction. In addition to Montenegro Skin Test, ELISA tests is also not indicated as differential diagnosis due to possible cross-reactions and obtaining false positive results as demonstrated by Barros et al. (2005). Moreover, because sporotrichosis has not been compulsorily notified, it's difficult to properly assess its occurrence and distribution in the state of Rio de Janeiro, and the real incidence may have been underestimated (Barros et al. 2004, Barros et al. 2008). This aim is important since each disease needs a specific treatment which has very important adverse effects and, as prolonged therapy is needed, differential diagnosis is of great importance. Despite the positive result obtained by the Elispot assay for quantification of IFN- γ -producing PBMC, no impressive results could be detected using cells recovered from the lesion site, as well as using the assay for quantification of IL-10-producing PBMC.

The PBMC Elispot has the advantage of using peripheral blood from venipuncture which consists of a less invasive method than collecting a second fragment of skin lesion to disclosure of the pathogen. In addition, the Elispot has the advantage of generating results in two days, while the culture needs at least one month for replication of *Leishmania* and around ten days for *Sporothrix schenckii*. On the downside, it can be stressed the high cost and need for specialized personnel; which would hamper its use in reference centers and tertiary care hospitals. However, the use of Elispot in the diagnosis of other infectious diseases, as tuberculosis and mumps, has been previously reported (Veerasami et al. 2011, Lai et al. 2010a, Lai et al. 2010b, Zhang et al. 2010, Girlanda et al. 2010, Tan et al. 2010, Latner et al. 2011). As a marked spontaneous IL-10 expression by PBMC from healthy subjects was observed, the measure of IL-10 responder cells was not applied to differential diagnosis between ATL and sporotrichosis.

The analysis of active lesions showed that either IFN- γ spontaneous and Lb-Ag-responder cells are higher in ATL, than in sporotrichosis patients. However, the Ss-Ag did not produce differences between groups. The migration of non-related specific T cells into human leishmaniasis skin lesions, as well as the encounter of multiple specificities at the site of an immune response have been already described (Da-Cruz et al. 2010). Lesion cells seem not to be useful for differential diagnosis because they present exuberant specific T cells and T cells reactive to non-related antigens as previously observed (Conceição-Silva et al. 1990). The involvement of these non-related activated cells in modulation or progression of lesions has been suggested (Da-Cruz et al. 2010).

In conclusion, we suggest that: 1- despite the inflammatory activity be concentrate at the lesion site, the immune response can be reflected at the peripheral system as observed in the peripheral blood compartment, and it can be specifically measured, 2- increased macrophage activation with higher IFN- γ and NOS2 expression in ATL than in sporotrichosis patients could be probably related to control mechanisms of intracellular pathogen like amastigotes of *Leishmania*, 3- the possible role of the equilibrium between IFN- γ production and humoral response in pathogenesis and control of fungal burden in sporotrichosis, 4- *S. schenckii* could be able to modulate the immune response also by inducing IL-10 production by human cells probably using this as a mechanism of immune escape, 5- the Elispot assay for quantification of IFN- γ responder cells can be an useful method for differential diagnosis between ATL and sporotrichosis patients when the etiological agent cannot be identified.

REFERENCES

- Almeida-Paes R, Pimenta MA, Monteiro PC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Immunoglobulins G, M and A against *Sporotrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(9): 1149-57.
- Barros MBDL, Schubach ADO, do Valle ACF, Gutierrez Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TMP, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. Clin. Infect. Dis. 2004 Feb 15;38(4):529-535.

- Barros MBL, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. *Acta Trop.* 2005 Jan;93(1):41-47.
- Barros MBL, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol. Infect.* 2008 Set;136(9):1192-1196.
- Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP et al. T-cell response associated with resistance to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(5): 625-30.
- Brito MMS, Conceição-Silva F, Morgado FN, Raibolt PS, Schubach A, Schubach TP, et al. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Med. Mycol.* 2007 Dez;45(8):721-729.
- Carlos IZ, Sgarbi DB, Placeres MC. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 1998;144(1):9-14.
- Carlos IZ, Sgarbi DBG, Santos GC, Placeres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand. J. Immunol.* 2003 Mar;57(3):214-220.
- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Desein H, Prata A, Desein A, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum. Immunol.* 2009; 70(6): 383-90.
- Conceição-Silva F, Dórea RC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 1990 Fev;79(2):221-226.
- Conceição-Silva F, Hahne M, Schröter M, Louis J, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1998; 28: 237-45.
- Coutinho SG, Pirmez C, Da-Cruz AM. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96(1): 173-8.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 251-6.

- Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* 2010 Maio;130(5):1329-1336.
- Fernandes KSS, Neto EH, Brito MMS, Silva JS, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology.* 2008 Abr;123(4):469-479.
- Galhardo MCG, de Oliveira Schubach A, de Lima Barros MB, Moita Blanco TC, Cuzzi Maya T, Pacheco Schubach TM, et al. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.* 2002; 41(2): 114-6.
- Girlanda S, Mantegani P, Baldissera E, Aiello P, Ratti M, Sabbadini MG, et al. ELISPOT-IFN-gamma assay instead of tuberculin skin test for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in rheumatic patients candidate to anti-TNF-alpha treatment. *Clin. Rheumatol.* 2010 Out;29(10):1135-1141.
- Gonzalbo D, Gil ML. IFN-gamma in *Candida albicans* infections. *Front. Biosci.* 2009; 14: 1970-8.
- Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26(6): 1217-21.
- Lai C, Tan C, Lin S, Liao C, Huang Y, Wang C, et al. Diagnostic value of an enzyme-linked immunospot assay for interferon- γ in genitourinary tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010 Nov;68(3):247-250.
- Lai C, Tan C, Lin S, Liu W, Liao C, Wang C, et al. Diagnostic usefulness of enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma for tuberculosis in cancer patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 2010 Dez;42(11-12):851-856.
- Latner DR, McGrew M, Williams N, Lowe L, Werman R, Warnock E, et al. Enzyme-linked immunospot assay detection of mumps-specific antibody-secreting B cells as an alternative method of laboratory diagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011 Jan;18(1):35-42.
- Lima-Junior JC, Tran TM, Meyer EVS, Singh B, De-Simone SG, Santos F, et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine.* 2008 Dez 2;26(51):6645-6654.
- Martinez JE, Alba, Arias L, Escobar MA, Saravia, NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86(4): 392-4.
- Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Conceição-Silva F. The in situ inflammatory

profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis, *Med Mycol* [Internet]. (2011); Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254963>

- Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Vasconcellos ECF, Conceição-Silva F. Differences in the *in situ* inflammatory reaction of the American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis as an example of the skin immune system response patterns. Submitted
- Morgado FN, Schubach AO, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, et al. Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol* 2008; 158: 50-8.
- Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 241-7.
- Nascimento RC, Espindola MN, Castro RA, Teixeira PA, Loureiro y Penha CV, et al. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38(11): 3080-9.
- Oliveira-Camara P, Junger J, do Espirito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, et al. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006; 100(12): 1112-7.
- Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz MDM, Tavares PMES, Monteiro PCF, Schubach TMP, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009 Ago;104(5):769-774.
- Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N. Engl. J. Med.* 2005 Set 15;353(11):1185-1186.
- Tan C, Hung C, Lai C, Liao C, Chou C, Huang Y, et al. Diagnosis of active tuberculosis by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2010 Abr 1;53(4):546-547.
- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MI, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin. Immunol.* 2008; 128(3): 442-6.
- Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int. Immunol.* 2006 Dez;18(12):1637-1646.

- Veerasami M, Moorthy L, Das D, Parthasarathy S, Chandran D, Lingala R, et al. Assessment of critical parameters in blood processing for the bovine interferon-gamma ELISPOT assay to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in India. *Vet. Ital.* 2011 Mar;47(1):25-34.
- Zhang M, Wang H, Liao M, Chen X, Graner M, Zhu X, et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guérin vaccinated subjects in China by interferon-gamma ELISpot assay. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2010 Dez;14(12):1556-1563.

Table 1 – Frequency of positive and negative IFN-g responses to Ss-Ag and Lb-Ag by PBMC between LC, F, ATL and OE patients.

Patients	IFN-g PBMC Elispot			
	Ss-Ag		Lb-Ag	
	Positive N (%)	Negative N (%)	Positive N (%)	Negative N (%)
LC	9 (100%)	0 (0%)	4 (44.4%)	5 (56.6%)
F	10 (100%)	0 (0%)	2 (20%)	8 (80%)
ATL	5 (33.3%)	10 (66.7%)	15 (100%)	0 (0%)
OE	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	5 (100%)

Ss-Ag – *Sporothrix schenckii* antigen; Lb-Ag – *Leishmania braziliensis* antigen; ATL – American tegumentary leishmaniasis; OE – others etiologies.

Table 2 – Frequency of positive and negative IL-10 responses to Ss-Ag and Lb-Ag by PBMC between LC, F, ATL and OE patients.

IL-10 PBMC Elispot				
Patients	Ss-Ag		Lb-Ag	
	Positive N (%)	Negative N (%)	Positive N (%)	Negative N (%)
LC	0 (0%)	9 (100%)	0 (0%)	9 (100%)
F	0 (0%)	11 (100%)	2 (18.2%)	9 (81.8%)
ATL	0 (0%)	15 (100%)	3 (20%)	12 (80%)
OE	0 (0%)	5 (100%)	1 (20%)	4 (80%)

Ss-Ag – *Sporothrix schenckii* antigen; Lb-Ag – *Leishmania braziliensis* antigen; ATL – American tegumentary leishmaniasis; OE – others etiologies.

Figure legends

Figure 1 – Number of IFN- γ responder cells/ 2×10^5 cells from peripheral blood (a) no stimulation, (b) Ss-Ag stimulation, (c) Lb-Ag stimulation, (d) specific-antigen stimulation. OE – others etiologies; LC – lymphocutaneous sporotrichosis; F- fixe sporotrichosis; ATL – American tegumentary leishmaniasis.

Figure 2 - Number of IFN- γ responder cells/ 2×10^5 cells from active lesion (a) no stimulation, (b) Ss-Ag stimulation, (c) Lb-Ag stimulation. LC – lymphocutaneous sporotrichosis; F- fixe sporotrichosis; ATL – American tegumentary leishmaniasis.

Figure 3 - Number of IL-10 responder cells/ 2×10^5 cells from peripheral blood (a) no stimulation, (b) Ss-Ag stimulation, (c) Lb-Ag stimulation, (d) specific-antigen stimulation. OE – others etiologies; LC – lymphocutaneous sporotrichosis; F- fixe sporotrichosis; ATL – American tegumentary leishmaniasis.

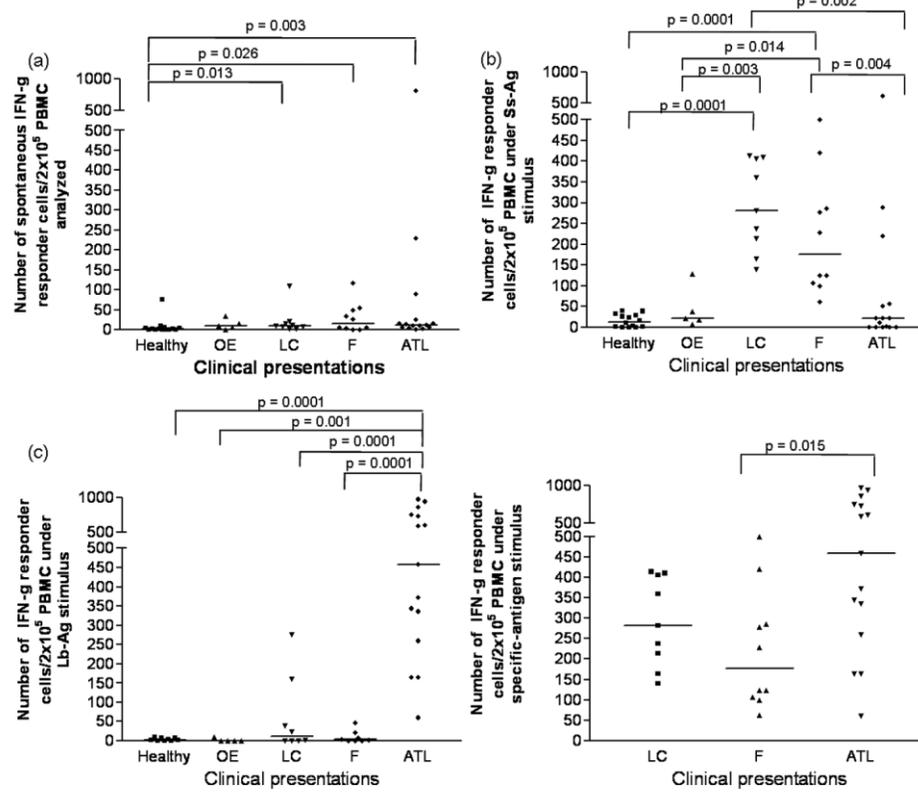


Figure 1

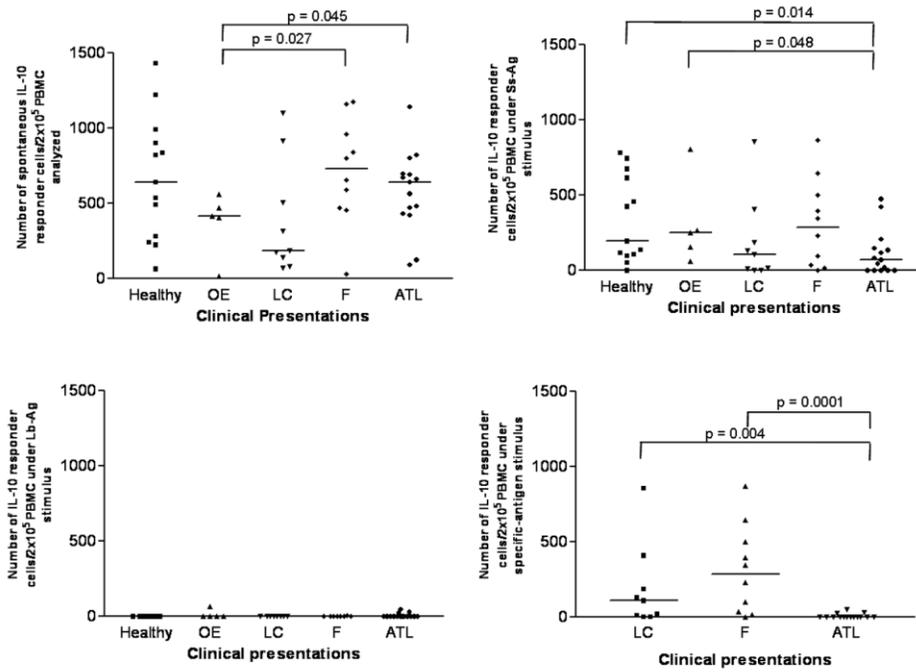


Figure 3

4.3.2 Conclusões referentes ao terceiro artigo

1- Apesar da atividade inflamatória se concentrar no sítio de lesão, a resposta imune pode se manifestar na periferia, como observado no sangue periférico, podendo inclusive ser medida.

2- A maior ativação de macrófagos acompanhado de maior expressão de IFN- γ e NOS2 nos pacientes ATL quando comparados aos pacientes com esporotricose, provavelmente se relacionam aos mecanismos de controle de patógenos intracelulares como as amastigotas de *Leishmania* sp.

3- É possível que o equilíbrio entre a expressão de IFN- γ e resposta humoral esteja relacionado à patogênese e ao controle da carga fúngica na esporotricose.

4- *S. schenckii* poderia modular a resposta imune também pela indução de expressão de IL-10 por células humanas, provavelmente utilizando esta indução como um mecanismo de escape.

5- A técnica de Elispot para a quantificação de células de sangue periférico Ag-específicas produtoras de IFN- γ se mostrou uma boa ferramenta para a realização do diagnóstico diferencial entre pacientes apresentando lesões de esporotricose e LTA quando a visualização ou isolamento do agente etiológico não é possível.

6- As células isoladas de lesão não foram úteis para a realização do diagnóstico diferencial pela técnica de Elispot, pois apresentaram secreção espontânea de citocinas inviabilizando os testes de especificidade.

7- Todos os indivíduos estudados, inclusive sadios, apresentaram grande quantidade de células de sangue periférico produtoras espontâneas de IL-10 o que pode estar relacionado aos mecanismos de regulação da atividade inflamatória e inviabilizou o uso desta citocina em testes de diagnóstico.

5 DISCUSSÃO GERAL

5.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE

A esporotricose é doença fúngica cujas formas clínicas mais comuns são a cutânea-linfática (CL) e fixa (F) (Schubach et al. 2008), como observado na atual epidemia do Rio de Janeiro. Muito tem sido descrito com relação às formas clínicas, diagnóstico e tratamento, porém dados relacionados à resposta imune do hospedeiro humano são escassos na literatura atual, o que dificulta o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e prevenção da esporotricose. Neste sentido, correlacionar os dados imunológicos com a apresentação clínica da esporotricose pode auxiliar o manejo dos pacientes.

A comparação entre as duas formas clínicas revelou que as lesões CL apresentavam maior acometimento da pele, com maior tempo de evolução, maior número de lesões (associadas à linfangite), infiltrado mais difuso com envolvimento da derme nas porções reticular e papilar. O tempo de tratamento necessário para a cura clínica era significativamente maior nestas lesões do que naquelas da forma fixa. Foi observada correlação positiva entre o tempo de tratamento e a quantidade de fungos por área de tecido. Além disso, as lesões CL apresentaram maior carga fúngica do que as lesões fixas. Diferenças entre as formas de apresentação da esporotricose com relação às manifestações clínicas (Schubach et al. 2008, Carlos et al. 2009) e resposta imune *in vitro* (Uenotsuchi et al. 2006) foram relatadas por alguns autores. Foi também demonstrado que isolados de pacientes com diferentes formas clínicas inoculados em animais poderia gerar lesões de gravidade variada (Brito et al. 2007), mas este é ainda um dado controverso. Kong et al. (2006) observaram que animais BALB/C infectados

com isolados de pacientes com forma CL apresentavam maior carga fúngica do que aqueles inoculados com isolados da forma F, e associaram o resultado à maior virulência da cepa. Por outro lado, Galhardo et al. (2008), em estudo molecular e de susceptibilidade aos antifúngicos, compararam isolados de pacientes apresentando forma CL com isolados de pacientes apresentando forma F, oriundos do Rio de Janeiro. A análise genotípica mostrou que as cepas do Rio de Janeiro estavam geneticamente relacionadas e não foram associadas às formas clínicas específicas. Não foram também observadas diferenças de valores de concentração inibitória mínima de diversos antifúngicos entre os isolados de acordo com as formas clínicas. Assim, à luz do conhecimento atual não é possível afirmar se diferentes isolados podem interferir na apresentação clínica da doença humana.

Nossos dados sugerem a importância da carga fúngica na evolução das lesões humanas e no controle terapêutico da esporotricose. No entanto, vale indicar que o processo inflamatório na pele é dependente das células residentes assim como daquelas que migram para o local após o início do estímulo inflamatório. Neste sentido, a composição e a organização da reação inflamatória local podem ser determinantes, tanto para o controle da infecção quanto para a destruição tecidual com consequente agravamento das lesões. Neste sentido, células capazes de produzir e liberar radicais de oxigênio e/ou hidrogênio, assim como enzimas líticas tem grande importância neste processo. Através de estudos *in vitro*, Cunningham et al. (1979) sugeriram a importância dos intermediários reativos do oxigênio e da elastase neutrofílica na ação de neutrófilos durante a infecção esporotricótica humana. Nosso estudo revelou um infiltrado inflamatório de moderado a intenso principalmente nas lesões CL com presença de macrófagos e NOS2, o que indiretamente sugere o grau de ativação destas células. Além dos macrófagos, era possível verificar importante concentração de neutrófilos expressando elastase neutrofílica, um marcador de ativação. Além disto, também foi identificada a formação de NETs. Já foi descrito que estas últimas surgem por um mecanismo específico de morte celular com formação de rede de material nuclear e enzimas que aprisionam e destroem microrganismos (Brinkmann et al. 2004, Baker et al. 2008, Guimarães-Costa et al. 2009). Foi ainda visto que a formação de NETs e a degranulação de neutrófilos é diretamente relacionada a função de NADPH e

intermediários reativos do oxigênio (ROIs). Cunningham et al. (1979) indicaram que o papel de neutrófilos humanos na resistência à infecção por *S. schenckii in vitro* era conferida pela fagocitose e ação de intermediários reativos do oxigênio (ROIs) ou através da ação de enzimas degranuladas, como por exemplo, a elastase neutrofílica. Em revisão recente, Nathan (2006) discutiu a função de neutrófilos e sugeriu que estas células seriam componentes-chave da resposta inflamatória e contribuiriam para o recrutamento, ativação e programação de células apresentadoras de antígenos (APC). Através do contato célula-célula e produtos secretados, neutrófilos recrutariam e ativariam monócitos e células dendríticas, através da produção de TNF- α . No nosso trabalho encontramos maior número de neutrófilos nas lesões CL aliado às lesões mais exuberantes e juntos, os dados sugerem a confirmação desta hipótese.

A observação de áreas ricas em elastase neutrofílica (microabscessos) foi freqüente nas lesões ativas de esporotricose, principalmente naquelas com a forma cutânea-linfática. A liquefação do tecido ou “pus” é causada pela ativação e liberação de proteases. A lesão tecidual é, geralmente, vista como prejudicial, porém a destruição tecidual mediada por neutrófilos, em pequena escala, é um processo que traz benefício (Nathan 2006), pois proporciona a desestabilização das fibras de colágeno que impedem o contato de neutrófilos e microrganismos e exerce pressão nos tecidos vizinhos. Isto levaria ao colapso de capilares sanguíneos e linfáticos evitando a disseminação (escape) do agente infeccioso, mantendo-o preso ao ambiente tóxico gerado pelos produtos de secreção dos neutrófilos (Nathan 2006). Assim, os neutrófilos poderiam lisar microrganismos e células que estivessem na região. Enquanto o sítio estivesse infectado, mais neutrófilos seriam atraídos para o local agravando a lesão tecidual. Além disso, segundo Venuprasad et al. (2003), neutrófilos secretariam fatores quimiotáticos para células T e seriam capazes de induzir a ativação das células T através da produção de IFN- γ . Nossos resultados, no entanto, demonstram que a maior concentração de neutrófilos era encontrada nas lesões CL caracterizadas pela formação de gomas e disseminação linfática regional.

Observamos neutrófilos acumulados em áreas de grande destruição celular, próximos ou em contato com elementos fúngicos concomitante ao acúmulo de células Bax⁺. A coincidência de maior concentração de neutrófilos e células TCD3⁺CD4⁺ nas

lesões CL sugere uma maior intensidade inflamatória associada à maior envolvimento do tecido circunjacente. Além disso, o acúmulo de CD4 pode de forma indireta manter o processo inflamatório local pela produção de citocinas pró-inflamatórias e moduladoras da resposta imune.

No presente trabalho, foi observada a correlação positiva entre o percentual de células CD4⁺ e o tempo de evolução. O mesmo dado foi observado nas lesões ativas de LTA, em estudo recentemente publicado por nosso grupo (Morgado et al. 2008). Apesar de serem duas doenças de acometimento tegumentar, os agentes etiológicos em questão possuem características distintas. Os agentes causais da leishmaniose são parasitos intracelulares obrigatórios, enquanto os elementos fúngicos da esporotricose são geralmente extracelulares. Assim, baseados em nossos resultados, podemos sugerir que o aumento de células CD4⁺ com o tempo de evolução possa estar relacionado à forma com que o sistema imunológico da pele responde à presença de um patógeno, e não como uma resposta específica a um determinado agente etiológico. O acúmulo de células CD4⁺ também foi verificado no modelo murino de infecção experimental por *L. major* (Belkaid et al. 2001, Belkaid et al. 2002). Os autores demonstraram que a população destas células era constituída por iguais proporções de células regulatórias e células efetoras. A presença de células regulatórias já foi observada em várias infecções e este evento tem sido apontado tanto como benéfico quanto deletério para o controle das infecções (Zelinsky et al. 2009, Johanns et al. 2010). O estudo destas células em pacientes com esporotricose já está em andamento.

Ao verificarmos que as lesões CL apresentavam maior percentual de células CD4⁺ quando comparadas às lesões F, a princípio levantamos a hipótese de que lesões CL apresentavam maior percentual de células CD4⁺ devido ao maior tempo de evolução nesses casos. Porém, ao compararmos apenas lesões CL e F com menos de 2 meses de evolução, esta diferença continuou sendo observada, ou seja, o percentual de CD4⁺ ainda era significativamente maior nas lesões CL do que F (dado não mostrado). Assim, os dados sugerem a relação entre a quantidade de células CD4⁺ e a intensidade da lesão tecidual mediada pela resposta inflamatória.

Foi verificada a presença de macrófagos, células de Langerhans e células dendríticas, mas não houve diferença na concentração e distribuição destas células nos dois grupos estudados. Como os elementos fúngicos do *S. schenckii* são geralmente extracelulares, a função das células fagocíticas pode ser mais relevante para a apresentação de antígenos do que para a destruição direta do agente infeccioso. No entanto, dois trabalhos sugeriram a importância destas células na resposta imune na esporotricose. Koga et al. (2002) verificaram a presença de macrófagos e concomitância de expressão de IFN- γ na periferia dos granulomas formados nas lesões de esporotricose. Em 2001, o mesmo grupo já tinha demonstrado a presença de células dendríticas maduras em meio ao processo inflamatório (Koga et al. 2001). Contudo, nestes dois artigos somente cinco pacientes foram estudados e não houve condições de correlacionar os achados com a forma clínica ou a gravidade da apresentação clínica. No entanto, a presença de macrófagos, verificada no presente estudo, em conjunto com os dados de Koga et al. (2001, 2002) apontam para a participação destas células no processo inflamatório das lesões de esporotricose não importando a forma clínica apresentada.

Neste mesmo contexto, as lesões CL também apresentavam expressão de NOS2 significativamente maior do que as lesões F. Os intermediários reativos do nitrogênio apresentam função importante nos processos patológicos e fisiológicos. Carlos et al. (2003) mostraram que componentes da parede de *S. schenckii* são capazes de inibir *in vitro* o processo de fagocitose e induzir acentuada liberação de NO e TNF- α em culturas de macrófagos. Balish et al. (2005) estudaram camundongos deficientes em gp91^{phox} e NOS2 infectados com *Candida albicans*. O estudo indicou que ROI e RNI não seriam necessários para a eliminação de *C. albicans* fagocitadas, mas outros fatores seriam suficientes para a morte de fungos fagocitados. A ação destas moléculas estaria relacionada à limitação da disseminação do patógeno para órgãos internos. Fernandes et al. (2000), em estudo *in vitro* com macrófagos murinos, sugerem que NO é importante mediador citotóxico na defesa contra *S. schenckii*, mas que a virulência está associada à menor susceptibilidade do fungo ao NO. Ainda observaram que animais infectados com a forma mais virulenta do fungo tinham maior taxa de mortalidade e maiores níveis de NO sérico. Na maioria das infecções, a

presença de NO tem sido relacionada à diminuição da carga parasitária e conseqüente controle da infecção (Stenger et al. 1996, Morgado et al. 2008). No entanto, recentemente foi publicado artigo em modelo murino de esporotricose disseminada demonstrando a maior concentração de NO nos casos graves em relação ao grupo controle (Fernandes et al. 2008). Os mesmos autores estudaram camundongos NOS2^{-/-} infectados com *S. schenckii* e sugeriram que apesar de NO ser uma molécula com atividade antifúngica *in vitro*, poderia estar relacionada à imunossupressão *in vivo* na doença sistêmica. Foi ainda verificado que o aumento de NO era acompanhado por maior número de elementos fúngicos. Estes resultados aparentemente contraditórios podem estar relacionados ao agente causal, ao modelo experimental utilizado ou à gravidade da infecção produzida. Em nosso trabalho, observamos que as lesões CL, caracterizadas por maior reação inflamatória e evolução clínica mais exuberante, apresentaram maior expressão de NOS2. Estas lesões ainda apresentaram maior quantidade de fungos. Os dados do nosso trabalho sugerem que a maior quantidade de elementos fúngicos nas lesões CL geraria resposta inflamatória mais intensa, com maior expressão da enzima NOS2. Esperava-se a associação inversa entre a expressão da enzima e a carga fúngica, assim como verificado na LTA (Morgado et al. 2008), porém este dado não foi observado. Como a maior parte dos elementos fúngicos é extracelular, é possível que na esporotricose outros fatores participem da eliminação dos elementos fúngicos *in vivo*.

Associado à maior expressão da enzima NOS2 e maior gravidade das lesões CL estão ainda intensa destruição tecidual, maior número de lesões, maior percentual de células CD4⁺ e de neutrófilos (elastase neutrofílica). Em conjunto, estes dados sugerem que diferentes mecanismos possam atuar durante a infecção por *S. schenckii*. Em estudo de revisão, Carlos et al. (2009) sugerem que altas concentrações de NO poderiam agir tanto como inibidores da secreção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e IL-2, quanto como indutores de apoptose das células inflamatórias. Devido a esta aparente contradição, outros estudos deverão ser realizados para clarear estes dados.

As lesões CL também apresentavam percentual de células B significativamente maior do que as lesões F. Os linfócitos B são gerados na medula óssea e são as células responsáveis pela produção e secreção de anticorpos. Além disso, funcionam

também como células apresentadoras de antígenos (APC), reconhecendo patógenos ou partículas extracelulares, processando-os e apresentando-os para as células T (Delves & Roitt 2000a, Delves & Roitt 2000b). As células B não parecem acumular-se nos sítios de infecção por patógenos intracelulares (Von Stebut 2007). Como os elementos fúngicos do *S. schenckii* podem ser facilmente encontrados no meio extracelular, a presença de células B, e conseqüentemente a produção de anticorpos poderia ser importante no controle dinâmico da carga fúngica através da indução dos processos de fagocitose, ativação do complemento ou mesmo ativando a citotoxicidade dependente de anticorpos. Como foi verificada maior carga fúngica nas lesões CL, maior acúmulo de células B, além de outras células de função efetora como os neutrófilos, o maior estímulo à migração destes tipos celulares para a região seria provavelmente devido à presença do fungo no sítio de lesão. Não pode ser esquecido que o acúmulo de leveduras poderia tanto indicar um descontrole inicial do processo inflamatório quanto uma maior virulência de algumas cepas de *S. schenckii* como verificado em modelo animal (Neyra et al. 2005, Uenotsuchi et al. 2006, Brito et al. 2007), mas não comprovado nesta epidemia do Rio de Janeiro (Galhardo et al. 2008).

Quanto aos demais marcadores de atividade inflamatória, não foram observadas diferenças entre as duas formas clínicas, o que mostra que mesmo lesões da forma fixa, apesar de serem menos graves que as da forma cutânea-linfática, apresentam atividade inflamatória importante. Isto inclui células em proliferação (BCI-2⁺ e Ki67⁺), ativação de endotélio (selectina-E⁺) e recrutamento de células inflamatórias (CLA⁺). Também estavam presentes expressão de Fas/FasL⁺, Bax⁺ e Granzima B⁺. A freqüente observação de células BCL2⁺, Bax⁺ e Granzima B⁺ pode sugerir a modulação de mecanismos de morte celular. Para a melhor identificação destas vias de indução de morte, estudos *in vitro* seriam mais indicados. No entanto, o *milieu* inflamatório com secreção de citocinas e outros mediadores poderiam modular o binômio proliferação *versus* morte celular. O balanço destes fatores seria dinâmico e a intensidade da expressão de cada um destes marcadores poderia variar ao longo da infecção.

Nossos resultados indicam que a dinâmica do processo inflamatório é diferente nas duas formas mais comuns de lesão de esporotricose – CL e F. Nas formas F, a resposta imune seria mais equilibrada levando ao controle da infecção sem destruição

dos tecidos adjacentes, inclusive com a limitação da inflamação pelo tecido fibroso, comumente verificado nesta forma da infecção. Este cerceamento do processo dificultaria a disseminação do fungo, facilitando seu controle. Já nas lesões CL, a intensidade do processo inflamatório mais difuso, associada à intensa necrose com formação de pus, seria o reflexo do desequilíbrio da resposta imune. A destruição do tecido poderia facilitar a disseminação do fungo pelos vasos linfáticos. Este poderia ser resultado tanto de uma resposta exacerbada do hospedeiro quanto à uma maior virulência do fungo infectante, apesar desta última hipótese ser ainda controversa (Galhardo et al. 2008). Para esclarecer alguns destes aspectos nós estamos atualmente quantificando outros marcadores para comparar o tipo e a intensidade de resposta imune nos dois grupos de pacientes apresentando forma F ou CL da esporotricose.

Com base nestes resultados podemos concluir que a resposta imunológica montada pelo hospedeiro, mais especificamente pelo tegumento cutâneo, nas formas clínicas estudadas mantém um padrão de celularidade e atividade inflamatória, mas com algumas características diferentes (células CD4⁺, neutrófilos, células B e expressão de NOS2) que podem ser determinantes para a evolução da esporotricose.

Estes dados corroboram os achados do estudo de quantificação de células produtoras de IFN- γ e IL-10 no sangue periférico e nas lesões de esporotricose e LTA.

Associado ao fato de lesões CL apresentarem maior expressão de NOS2 *in situ* do que as lesões F, o estudo das células do sangue periférico mostrou que estes indivíduos apresentavam uma tendência à menor quantidade de células produtoras de IL-10 espontâneas (dado não mostrado). A expressão de IFN- γ era semelhante entre os dois grupos. A IL-10 é uma citocina com ação antiinflamatória e alguns autores têm sugerido que uma de suas funções seja a de inibir a formação de NO pela NOS2, através ativação da enzima arginase 1 (Schreiber et al. 2009) envolvida nos mecanismos de resposta do tipo Th2 (Munder et al. 1999). A arginase tem como função hidrolisar a arginina para formação de ornitina e foi sugerido que NOS2 e arginase apresentam modulação mútua. A enzima NOS2 controla a arginase ao gerar NO mais hidróxi-L-arginina que é inibidor competitivo da atividade de arginase (Bogdan 2001). Por sua vez, a arginase regula a produção de NO, pois retira do meio extracelular a L-

arginina disponível (Modolell et al. 1995, Morris 2004). Como discutido anteriormente, NO é uma molécula efetora importante na defesa do hospedeiro, mas pode atuar como agente citotóxico nos processos patológicos (Aktan 2004). Por exemplo, alta concentração de NO tem efeito proapoptótico direto em células T efectoras (Stefani 1994). As lesões CL apresentariam então um menor controle do processo inflamatório gerando uma resposta mais intensa, com maior produção de NO e destruição tecidual, o que se relacionaria à maior extensão das lesões CL.

Neste estudo, observamos ainda que indivíduos sadios apresentavam uma quantidade significativa de células produtoras de IL-10 em sangue periférico e que o Ss-Ag era capaz de estimular a produção destas células nos indivíduos doentes, assim como nos indivíduos sadios (dados não mostrados). Alguns fatores de virulência já foram descritos para *S. schenckii*, entre eles o peróxido de ergosterol, assim como o pigmento tipo melanina com ação protetora aos radicais oxidantes (Sgarbi et al. 1997). Também já foi descrito que componentes de parede do fungo poderiam estimular a produção de NO e TNF- α (Carlos et al. 2003). É provável que o estímulo à produção de IL-10 seja um fator para a produção de uma resposta mais equilibrada, com menor dano tecidual e permanência do fungo nas lesões, porém outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Como vários fungos podem apresentar componentes antigênicos semelhantes, principalmente na composição da parede (Hearn et al. 1990, Melcher et al. 1991, Machetti & Viscoli 2006), não se pode descartar a resposta cruzada com outros fungos.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A esporotricose no Rio de Janeiro se destaca como uma epidemia de transmissão zoonótica, tendo o atual ciclo se iniciado a partir do ano de 1998, mantendo-se até os dias atuais (Barros et al. 2004). Com a epidemia, além dos problemas relacionados à morbidade da doença, surgiu a complicação do diagnóstico

diferencial. As áreas de aparecimento dos casos se sobrepõem às áreas endêmicas para outras doenças granulomatosas de pele, em especial a LTA. Apesar da semelhança entre as formas clínicas, em geral o agente etiológico pode ser determinado pelo isolamento em cultivo, seja para o fungo ou para o protozoário. Porém em algumas situações a identificação do agente etiológico pode não ser possível seja por contaminação das culturas ou mesmo pela baixa carga parasitária. Os tratamentos são específicos e com medicamentos que apresentam efeitos adversos bastante significativos, além de ser necessária terapia prolongada o que torna o diagnóstico diferencial de suma importância. Quando o agente etiológico não é visualizado, a utilização de outros meios de diagnóstico torna-se necessária. Os testes de ELISA ou intradermoreação como métodos de diagnóstico diferencial não são indicados devido à possibilidade de reações cruzadas e a obtenção de resultados falso-positivos assim como demonstrado por Barros et al. (2004). Em nosso estudo, observamos que a técnica de Elispot para quantificação de células produtoras de IFN- γ poderia ser útil como segunda escolha para a determinação do diagnóstico definitivo, pois se mostrou uma técnica específica. Mesmo os pacientes que apresentaram respostas positivas sob estímulo dos dois antígenos, a resposta era sempre maior para o estímulo específico. Além disso, o método apresenta a vantagem de utilizar sangue periférico a partir de venopunção que consiste em um método menos invasivo do que uma segunda coleta de fragmento de lesão para nova tentativa de evidênciação do patógeno. Por fim, o Elispot tem a vantagem de gerar resultados em 2 dias, enquanto a cultura precisa de pelo menos 1 mês para o cultivo de *Leishmania* sp e em torno de 10 dias para o cultivo de *S. schenckii*. Como desvantagem, podemos citar o alto custo e a necessidade de pessoal especializado, o que restringiria seu emprego a centros de referência e hospitais de atendimento terciário.

No tocante ao estudo *in situ*, a análise do infiltrado inflamatório evidenciou algumas diferenças importantes entre as lesões ativas de esporotricose e de LTA. As lesões de LTA apresentaram maiores percentuais de linfócitos T da subpopulação CD8⁺, células FasL⁺, macrófagos e maior expressão da NOS2, assim como maior expressão e liberação de interferon gamma após estímulo específico, caracterizando o padrão de resposta da pele aos microrganismos intracelulares. A importância de

linfócitos T CD8⁺ e FasL⁺ na leishmaniose já foi demonstrada em diversos trabalhos (Sgarbi et al. 1997, Da-Cruz et al. 2002). A *Leishmania* sp é parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear, diferente do *S. schenckii* que consiste em um fungo extracelular podendo ser encontrado no interior de células fagocíticas. Assim, o controle da carga parasitária na LTA dependeria da ativação dos macrófagos infectados (Meneghin & Hogaboam 2007) ou da eliminação das células parasitadas. A lise de células-alvo ocorreria via ligação Fas/FasL que induz apoptose via ativação de caspases (Barry & Bleackley 2002). Nas lesões de esporotricose a expressão de células FasL⁺ foi menor, porém presente em todas as lesões. É provável que a participação destas células nas lesões de esporotricose seja na redução da celularidade local, como um mecanismo comum a muitas lesões de pele, responsável pelo equilíbrio do processo inflamatório. Greenhalgh (1998) descreve a importância da apoptose nos processos de redução da celularidade local e início da fase de cicatrização de feridas de pele.

A maior expressão de interferon gamma sistêmico e NOS2 nas lesões de LTA também poderiam ser explicadas pelo padrão de resposta aos microrganismos intracelulares. O interferon gamma é uma citocina com amplo espectro de ação, sendo a ativação de macrófagos via expressão de NOS2 uma de suas funções. A expressão de NOS2 nas lesões ativas de LTA já foi verificada (Morgado et al. 2008) assim como a função de NO no controle da carga parasitária (Stenger et al. 1996). Na seção anterior discutimos os possíveis efeitos desta molécula na destruição tecidual e gravidade das lesões de esporotricose, como também o fato de não observarmos qualquer correlação entre a carga fúngica e a expressão de NOS2. Assim, sugerimos que o controle da carga fúngica nas lesões de esporotricose deva ocorrer por outros mecanismos como a ação de anticorpos e a ativação de neutrófilos, células encontradas com grande frequência nas lesões CL e em proximidade de elementos fúngicos. Não podemos deixar de ressaltar a evidência de diferenças de susceptibilidade ao NO entre os isolados de *S. schenckii* (Fernandes et al. 2008).

Já o infiltrado inflamatório das lesões da forma fixa da esporotricose apresentava características intermediárias aos padrões de resposta aos microrganismos intracelulares e extracelulares, fato que pode estar relacionado tanto às características

de resposta imune do hospedeiro, quanto a particularidades do patógeno. Apesar disto, diferenças em relação aos isolados do fungo na atual epidemia utilizando estudos genéticos ou de susceptibilidade aos antifúngicos não foram observadas, assim como não houve qualquer associação entre os diferentes isolados e formas clínicas da esporotricose (Galhardo et al. 2008).

Foram ainda evidenciadas algumas diferenças com relação aos dados clínicos. As lesões de LTA apresentaram tempo de evolução significativamente maior do que as lesões de esporotricose em suas duas formas de apresentação clínica. Em 6 pacientes com esporotricose, as lesões já estavam bem estabelecidas na segunda semana de evolução, e os pacientes procuraram assistência médica (dado não mostrado). Por outro lado, as lesões de LTA apresentaram desenvolvimento crônico, com tempo de evolução maior do que 2 meses, o que explica a diferença encontrada.

Como era de se esperar, os pacientes CL apresentaram, além do comprometimento linfático, número significativamente maior de lesões do que os pacientes LTA. No entanto, já está descrita a possibilidade de ocorrência de lesões de LTA com lesões múltiplas em trajeto de linfático, semelhantes às formas CL da esporotricose, e por isto mesmo denominadas formas esporotricóides da LTA (Iftikhar et al. 2003, Lopes-Bezerra et al. 2006, Bari & Rahman 2008). Na casuística do VigiLeish (IPEC-Fiocruz) este tipo de apresentação clínica perfaz em torno de 4% dos casos confirmados de LTA, o que indica que, mesmo na presença de um caso dito típico de forma CL da esporotricose, é necessária a atenção ao diagnóstico diferencial com LTA.

Não foi evidenciada diferença significativa quando os casos de LTA foram comparados aos pacientes com a forma fixa da esporotricose, o que reitera a necessidade do diagnóstico diferencial, pois são lesões clinicamente semelhantes. Carlos et al. (2009) definem a forma fixa da esporotricose como uma forma de resistência do hospedeiro, encontrada com maior frequência em áreas endêmicas. Atualmente o Rio de Janeiro vive uma epidemia (Barros et al. 2004) em que a forma cutânea-linfática é a forma clínica mais prevalente. As epidemias tendem a se estabelecer em determinadas regiões até que ocorra um equilíbrio entre a quantidade de indivíduos susceptíveis e resistentes. É provável que em futuro próximo, as lesões fixas sejam mais prevalentes e neste momento o diagnóstico diferencial entre a forma

fixa da esporotricose e a forma cutânea localizada da LTA, torne-se ainda mais importante, já que estas apresentações clínicas se mostram muito semelhantes.

6 CONCLUSÕES

6.1 ESPOROTRICOSE

1- A maior extensão e potencial de gravidade das lesões CL poderiam ser explicadas pela maior intensidade de reação inflamatória *in situ* o que levaria à destruição tecidual.

2- Outros fatores, que não a expressão de NO, poderiam ser responsáveis pela eliminação dos elementos fúngicos *in vivo* na Esporotricose.

3- A resposta imune nas lesões de forma fixa da esporotricose foi mais balanceada levando ao controle da infecção sem destruição do tecido adjacente e propagação do fungo.

4- É possível que o equilíbrio entre a expressão de IFN- γ e resposta humoral esteja relacionado à patogênese e ao controle da carga fúngica na esporotricose.

6.2 ESPOROTRICOSE X LTA

5- Os dados sugerem que o controle da carga fúngica nas lesões de esporotricose seja provavelmente realizado através de mecanismos efetores secretórios pela cooperação entre neutrófilos e macrófagos caracterizando o padrão de resposta aos microrganismos extracelulares. Por outro lado, os mecanismos efetores responsáveis pelo controle parasitário nas lesões de leishmaniose dependeria da

ativação de células CD8⁺ e macrófagos através da expressão de FasL e NOS2, caracterizando o padrão de resposta aos microrganismos intracelulares.

6- O infiltrado inflamatório das lesões da forma fixa da esporotricose apresentava características intermediárias aos padrões de resposta aos microrganismos intracelulares e extracelulares, fato que pode estar relacionado tanto às características de resposta imune do hospedeiro, quanto a particularidades do patógeno.

7- A técnica de Elispot para a quantificação de células de sangue periférico Ag-específicas produtoras de IFN- γ se mostrou uma boa ferramenta para a realização do diagnóstico diferencial entre pacientes apresentando lesões de esporotricose e LTA quando a visualização ou isolamento do agente etiológico não é possível.

8- As células isoladas de lesão não foram úteis pra a realização do diagnóstico diferencial pela técnica de Elispot, pois apresentam células antígeno-relacionadas e não-relacionadas que se concentram nos sítios de lesão, provavelmente em resposta à ativação endotelial e tecidual.

9- O antígeno produzido a partir das células fúngicas de *S. schenckii* foi capaz de estimular a produção de IL-10, tanto em pacientes quanto nos controles sadios. Por outro lado, as promastigotas de *Leishmania* sp foram capazes de inibir a expressão de IL-10.

6.3 GERAIS

10- Indivíduos sadios apresentaram grande quantidade de células de sangue periférico produtoras espontâneas de IL-10 o que provavelmente esteja relacionado à manutenção da homeostase do organismo, já que esta citocina tem sido relacionada à regulação da resposta imune.

11- A resposta imune do hospedeiro, em especial da pele, mantém um padrão fenotípico e de atividade inflamatória, porém com algumas peculiaridades (percentuais de células CD4⁺, células B, neutrófilos e expressão de NOS2) que se relacionam com o quadro clínico e a progressão da doença.

12- O sistema imune da pele é um sistema complexo capaz de responder a diferentes patógenos e de montar padrões de resposta mais adaptados ao controle de cada microrganismo.

13- A apresentação clínica poderia ser o resultado da associação entre características do sistema imune do hospedeiro e de particularidades do agente etiológico.

7 PERSPECTIVAS

O estudo de outras funções celulares do processo inflamatório e dos mecanismos regulatórios envolvidos na reação inflamatória em diferentes apresentações clínicas da esporotricose, assim como de outras infecções de pele, pode auxiliar a montar um painel de resposta imune do tegumento cutâneo. Estes resultados poderão auxiliar no desenvolvimento de novas drogas e iminoterápicos, assim como facilitar o manejo dos pacientes acometidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed AA, Nordlind K, Schultzberg M, Lidén S. Interleukin-1 alpha- and beta-, interleukin-6- and tumour necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. *Acta Derm. Venereol.* 1994 Nov;74(6):435-440.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004 Jun 25;75(6):639-653.
- Almeida-Paes R, Frases S, Fialho Monteiro PC, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect.* 2009 Abr;11(5):554-562.
- al-Tawfiq JA, Wools KK. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 1998 Jun;26(6):1403-1406.
- Amato VS, Andrade Jr HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Tropica.* 2003; 85: 39-49
- Badley AD, van Scoy RE. Long-term follow-up of multifocal osteoarticular sporotrichosis treated with itraconazole. *Clin. Infect. Dis.* 1996 Ago;23(2):394-395.
- Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar. J.* 2008;7:41.
- Balish E, Warner TF, Nicholas PJ, Paulling EE, Westwater C, Schofield DA. Susceptibility of germfree phagocyte oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. *Infect. Immun.* 2005 Mar;73(3):1313-1320.
- Bari AU, Rahman SB. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008 Fev;74(1):23-27.
- Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, Ribeiro de Jesus A, Grimaldi GJr, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am. J Trop Med Hyg.* 1992; 47: 587-92

- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 256-9
- Barros MBDL, Schubach ADO, do Valle ACF, Gutierrez Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TMP, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin. Infect. Dis*. 2004 Feb 15;38(4):529-535.
- Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol*. 2002 Jun;2(6):401-409.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med*. 2001 Nov 19;194(10):1497-1506.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002 Dez 5;420(6915):502-507.
- Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2000 Mar;33(3):317-325.
- Bittencourt AL e Barral-Neto M. Leishmaniasis. In: Doer W, Sifert G, Vehlinger E. *Trop. Pathol*. 2. ed. Germany: Springer-Verlag, 1995. v. 8, cap. 14, p. 597-644
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol*. 2001 Out;2(10):907-916.
- Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today*. 1993 Fev;14(2):75-78.
- Brasil. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana / elaborado por Jackson Maurício Lopes Costa et al. 5ª ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2000; 62 p
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-1535.
- Brito MMS, Conceição-Silva F, Morgado FN, Raibolt PS, Schubach A, Schubach TP, et al. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Med. Mycol*. 2007 Dez;45(8):721-729.
- Callens SFJ, Kitetele F, Lukun P, Lelo P, Van Rie A, Behets F, et al. Pulmonary *Sporothrix schenckii* infection in a HIV positive child. *J. Trop. Pediatr*. 2006

Abr;52(2):144-146.

- Carlos IZ, Sassá MF, da Graça Sgarbi DB, Placeres MCP, Maia DCG. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2009 Jul;168(1):1-10.
- Carlos IZ, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*. 1992 Mar;117(3):139-144.
- Carlos IZ, Sgarbi DB, Placeres MC. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1998;144(1):9-14.
- Carlos IZ, Sgarbi DBG, Santos GC, Placeres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha. *Scand. J. Immunol*. 2003 Mar;57(3):214-220.
- Carlos IZ, Zini MM, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*. 1994 Set;127(3):189-194.
- Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 1985; 135: 4144-48
- Castes M, Agnelli A, Rondon AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous Leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984; 57: 279-86
- Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous Leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1983; 27: 176-86
- Chapman SW, Daniel CR. Cutaneous manifestations of fungal infection. *Infect. Dis. Clin. North Am*. 1994 Dez;8(4):879-910.
- Christoph T, Müller-Röver S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br. J. Dermatol*. 2000 Maio;142(5):862-873.
- Conceição-Silva F, Dórea RC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol*. 1990 Fev;79(2):221-226.
- Conceição-Silva F, Hahne M, Schröter M, Louis J, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur. J. Immunol*. 1998 Jan;28(1):237-245.

- Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 1994 Nov;24(11):2813-2817.
- Cunningham KM, Bulmer GS, Rhoades ER. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. *J. Infect. Dis.* 1979 Nov;140(5):815-817.
- da Silva AC, Bezerra LM, Aguiar TS, Tavares D, Araujo LM, Pinto CE, et al. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. *Microbes Infect.* 2001 Mar;3(3):215-222.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002 Mar;9(2):251-256.
- de Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. *Acta Trop.* 2005 Jan;93(1):41-47.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 2000 Jul 6;343(1):37-49.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 2000 Jul 13;343(2):108-117.
- Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp Dermatol.* 2002; 11: 34-41
- Dickerson CL, Taylor RL, Drutz DJ. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. *Infect. Immun.* 1983 Abr;40(1):417-420.
- Esterre P, Dedet JP, Frenay C, Chevallier M, Grimaud JÁ. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, histochemical and ultrastructural study. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 1992; 421: 239-247
- Fernandes KS, Coelho AL, Lopes Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology.* 2000 Dez;101(4):563-569.
- Fernandes KSS, Neto EH, Brito MMS, Silva JS, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology.* 2008 Abr;123(4):469-479.
- Galhardo MCG, De Oliveira RMZ, Valle ACFD, Paes RDA, Silvatavares PME, Monzon A, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix*

- schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med. Mycol.* 2008 Mar;46(2):141-151.
- Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus ARD, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand. J. Immunol.* 2006 Jan;63(1):70-78.
- Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998 Set;30(9):1019-1030
- Grimaldi G, Tesh RB, McM-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41: 687-725
- Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Abr 21;106(16):6748-6753.
- Hearn VM, Wilson EV, Latgé JP, Mackenzie DW. Immunochemical studies of *Aspergillus fumigatus* mycelial antigens by polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting techniques. *J. Gen. Microbiol.* 1990 Ago;136(8):1525-1535.
- Iftikhar N, Bari I, Ejaz A. Rare variants of Cutaneous Leishmaniasis: whitlow, paronychia, and sporotrichoid. *Int. J. Dermatol.* 2003 Out;42(10):807-809.
- Johanns TM, Ertelt JM, Rowe JH, Way SS. Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent Salmonella infection. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Ago [citado 2010 Nov 19];6(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714351>
- Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, Yoshida S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infect. Immun.* 2004 Set;72(9):5073-5079.
- Kanan MW, Ryan TJ. Endonasal localization of blood borne viable and non viable particulate matter. *British J Dermatol.* 1975; 92: 663-73
- Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.* 1999 Ago;29(2):231-236; quiz 237.
- Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, Sal P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *J Cutan Pathol.* 1999; 26: 130-136
- Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 1998 Set;113(3):438-442.

- Koga T, Duan H, Furue M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 2002 Abr;40(2):111-114.
- Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. Immunohistochemical localization of activated and mature CD83+ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. *Eur J Dermatol.* 2001 Dez;11(6):527-529.
- Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen H. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006 Nov;12(11):1077-1081.
- Kumar R, Kaushal V, Chopra H, Gupta R, Chhina DK, Kaushal RK, et al. Pansinusitis due to *Sporothrix schenckii*. *Mycoses.* 2005 Jan;48(1):85-88.
- Lei PC, Yoshiike T, Yaguchi H, Ogawa H. Histopathological studies of *Sporothrix schenckii*-inoculated mice. Possible functions of polymorphonuclear leukocytes in normal and immunocompromised (congenitally athymic nude) mice. *Mycopathologia.* 1993 Maio;122(2):89-93.
- Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* Characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50 (6): 743-747
- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2006 Jun;78(2):293-308.
- Machetti M, Viscoli C. [Interactions and false positive results of galactomannan antigen detection for diagnosis of invasive aspergillosis]. *Infez Med.* 2006 Dez;14(4):197-207.
- Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS, Fernandes CG, Guim TN, Santin R, et al. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes Infect.* 2010 Fev;12(2):162-165.
- Maia DCG, Sassá MF, Placeres MCP, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia.* 2006 Jan;161(1):11-19.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80: 859-76
- Melcher GP, Reed KD, Rinaldi MG, Lee JW, Pizzo PA, Walsh TJ. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991 Jan;29(1):192-196.
- Meneghin A, Hogaboam CM. Infectious disease, the innate immune response, and

- fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2007 Mar;117(3):530-538.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 1995 Abr;25(4):1101-1104.
- Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, et al. Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br. J. Dermatol.* 2008 Jan;158(1):50-58.
- Morris SM. Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.* 2004 Out;134(10 Suppl):2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
- Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 1999 Out 1;163(7):3771-3777.
- Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005 Feb 1;43(2):241-247.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006 Mar;6(3):173-182.
- Neyra E, Fonteyne P, Swinne D, Fauche F, Bustamante B, Nolard N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1348-1352.
- Orteu CH, Poulter LW, Rustin MH, Sabin CA, Salmon M, Akbar AN. The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. *J. Immunol.* 1998 Ago 15;161(4):1619-1629.
- Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J. Immunol.* 1990 Nov 1;145(9):3100-3104.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1390
- Plouffe JF, Silva J, Fekety R, Reinhalter E, Browne R. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* 1979 Feb;139(2):152-157.
- Ramirez J, Byrd RP, Roy TM. Chronic cavitary pulmonary sporotrichosis: efficacy of oral itraconazole. *J Ky Med Assoc.* 1998 Mar;96(3):103-105.

- Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz MDM, Tavares PMES, Monteiro PCF, Schubach TMP, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009 Ago;104(5):769-774.
- Rey L. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Editora Guanabara Koogan SA: 2ª edição. 1991
- Sassá MF, Satri AET, Souza LF, Ribeiro LCDA, Sgarbi DBDG, Carlos IZ. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. Immunology. 2009 Out;128(2):301-309.
- Schreiber T, Ehlers S, Heitmann L, Rausch A, Mages J, Murray PJ, et al. Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. J. Immunol. 2009 Jul 15;183(2):1301-1312.
- Schubach A, Barros MBDL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. Curr. Opin. Infect. Dis. 2008 Abr;21(2):129-133.
- Schubach A, de Lima Barros MB, Schubach TMP, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Sued M, et al. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. Cornea. 2005 Maio;24(4):491-493.
- Schubach A, Haddad F, Neto MPO, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi Jr G, Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. J Infec Dis. 1998b; 178: 911-4
- Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL, Wanke B. Esporotricose. In: Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2005. p. 1161-71.
- Schubach TM, Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Monteiro PC, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). Med. Mycol. 2001 Fev;39(1):147-149.
- Schubach TMP, de Oliveira Schubach A, dos Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DF, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. Mycopathologia. 2002;153(2):83-86.
- Schubach TMP, Schubach A, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). J. Am. Vet. Med. Assoc. 2004 Maio 15;224(10):1623-1629.
- Sgarbi DB, da Silva AJ, Carlos IZ, Silva CL, Angluster J, Alviano CS. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia. 1997;139(1):9-14.

- Shiraishi A, Nakagaki K, Arai T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia*. 1992 Out;120(1):15-21.
- Spellberg B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci*. 2000 Jun 23;67(5):477-502.
- Stefani MM, Müller I, Louis JA. *Leishmania major*-specific CD8+ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. *Eur. J. Immunol*. 1994 Mar;24(3):746-752.
- Stenger S, Donhauser N, Thüring H, Rölinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med*. 1996 Abr 1;183(4):1501-1514.
- Streilein JW. Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin. *J. Invest. Dermatol*. 1978 Set;71(3):167-171.
- Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med. Mycol*. 1999 Dez;37(6):397-404.
- Teixeira PAC, de Castro RA, Nascimento RC, Tronchin G, Torres AP, Lazéra M, et al. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2009 Nov;155(Pt 11):3730-3738.
- Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int. Immunol*. 2006 Dez;18(12):1637-1646.
- Venuprasad K, Chattopadhyay S, Saha B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Hum. Immunol*. 2003 Jan;64(1):38-43.
- Vieira-Dias D, Sena CM, Oréface F, Tanure MA, Hamdan JS. Ocular and concomitant cutaneous sporotrichosis. *Mycoses*. 1997 Out;40(5-6):197-201.
- Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007 Abr;17(2):115-122.
- Ware AJ, Cockerell CJ, Skiest DJ, Kussman HM. Disseminated sporotrichosis with extensive cutaneous involvement in a patient with AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol*. 1999 Fev;40(2 Pt 2):350-355.
- Zelinsky G, Dietze KK, Hüsecken YP, Schimmer S, Nair S, Werner T, et al. The

regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3199-3207.

ANEXOS

a - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – LESÕES ATIVAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
LEISHMANIOSE

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz e Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas /FIOCRUZ

Título do Projeto: “: “Influência da resposta imune *in situ* na evolução de doenças infecto-parasitárias caracterizadas pela presença de reação granulomatosa crônica. Haverá correlação entre a evolução das lesões de esporotricose, leishmaniose, tuberculose, hanseníase e paracoccidioidomicose e o fenômeno inflamatório localizado” (protocolo 014/2002)

coordenador: Fátima da Conceição Silva MD, PhD

Nome do Voluntário:

Eu,, declaro que sou voluntário no estudo sobre LEISHMANIOSE. Fui informado que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre a minha doença que se chama Leishmaniose. A minha participação em nada alterará o atendimento e acompanhamento médico que se faz necessário para diagnosticar e tratar a minha doença. Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas que também tenham a minha doença. Todos os resultados serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos serem divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitido a minha identificação.

Pelo responsável fui informado de que:

- 1- Este documento procura fornecer informações sobre a Leishmaniose e o que será realizado, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. Poderei recusar-me a participar da pesquisa ou, mesmo, dela me afastar em qualquer tempo, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento, e que o acompanhamento clínico, o tratamento e o controle de cura em nada serão modificados pela minha desistência. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos.
- 2- Os investigadores se obrigam a não revelar minha identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como, poderão interromper minha participação, a qualquer tempo, por razões técnico/ médicas quando, então, me serão fornecidos aconselhamentos e orientação.
- 3- Antes de assinar este Termo, devo me informar plenamente sobre o mesmo, não hesitando em fazer perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

A- O problema de saúde objeto da investigação:

A leishmaniose é uma doença da pele de gravidade variável de acordo com a reação do organismo do doente. É causada por um micróbio denominado *Leishmania*. Ainda não existe uma forma de prevenção, como vacinas para esta doença.

B- Objetivo da investigação:

O objetivo principal deste trabalho é estudar a resposta imunológica dos pacientes para que possamos deste modo tentar evidenciar um tipo de resposta protetora (benéfica). O conhecimento desta resposta poderá ser importante para se tentar prever a evolução da doença e com isto tentar evitar ou minimizar as formas graves. Além disto, o melhor conhecimento desta doença pode propiciar no futuro o desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.

C- Exames, procedimentos e tratamento que serão utilizados:

Nesta investigação está previsto o estudo da resposta imunológica dos voluntários provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose. Os voluntários farão um teste na pele (injeção de 0,1 ml), chamado teste de Montenegro, para auxiliar no diagnóstico da doença. Será coletado sangue da veia (20 ml) antes e após o tratamento com antimonial. Este sangue servirá para fazer alguns exames de esclarecimento diagnóstico e também para a

pesquisa. Além disso, será retirado um fragmento de biópsia de lesão que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasita, e para o estudo científico. Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para confirmar que estou com Leishmaniose. Em alguns casos, e mediante meu consentimento formal para este procedimento, poderá ser coletada uma segunda biópsia, guardando os cuidados necessários e mediante aviso e esclarecimento prévio.

D- Benefícios:

O estudo da resposta imune em pacientes com leishmaniose tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores imunológicos na evolução da doença. No entanto, mais estudos são necessários para que possamos tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção da Leishmaniose. Estes conhecimentos poderão fornecer importantes contribuições para se prever a evolução desta enfermidade nos indivíduos doentes e, para que possamos estabelecer uma futura vacina para a leishmaniose.

E- Inconvenientes:

A reação positiva ao teste de Montenegro se acompanha de inflamação restrita à área de aplicação do teste na pele. Este, no entanto, é o teste padrão para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. A coleta de sangue pode produzir em alguns casos hematoma (rouxidão) local que desaparece em 3 a 5 dias. A biópsia é feita sob anestesia no local da lesão (ferida). A lesão é mantida sob tratamento local e curativo para manter a limpeza. Serei informado de cada passo para fazê-la pelo médico responsável.

F- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:

Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante este trabalho são os rotineiramente usados para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo assim como abandonar o estudo caso queira. Declaro dar meu consentimento para participar desta investigação recebendo uma cópia do Termo, estando ciente, ainda, de que uma outra cópia permanecerá registrada nos arquivos do laboratório responsável pela pesquisa.

local e data: _____

Nome do voluntário: _____

Endereço _____

assinatura: _____

Nome da testemunha:

Assinatura: _____

Nome do investigador /

médico responsável: _____

assinatura: _____

b - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA, coordenadora e **FERNANDA NAZARÉ MORGADO**, aluna do projeto de pesquisa intitulado "Esporotricose: uma patologia e um modelo para o estudo da influência da resposta imune sistêmica e *in situ* na evolução de doenças infecto-parasitárias de acometimento tegumentar", comprometo manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, serão mantidos em um banco de dados sob a minha responsabilidade.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, 15/04/2005.

Fátima Conceição Silva

Fernanda Nazaré Morgado