

INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Centro de Pesquisa René Rachou

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**ASSOCIAÇÕES ENTRE ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E  
PARÂMETROS FENOTÍPICOS CELULARES  
DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

**PATRICIA MONTEIRO DE FREITAS TEIXEIRA**

Belo Horizonte  
Maio de 2005

Ministério da Saúde

**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“ASSOCIAÇÕES ENTRE ASPECTOS CLÍNICO-  
LABORATORIAIS E PARÂMETROS FENOTÍPICOS  
CELULARES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA”**

por

***Patrícia Monteiro de Freitas Teixeira***

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Maio, 2005

Ministério da Saúde

**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Esta Dissertação intitulada:

**“ASSOCIAÇÕES ENTRE ASPECTOS CLÍNICO-  
LABORATORIAIS E PARÂMETROS FENOTÍPICOS  
CELULARES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA”**

apresentada por

***Patrícia Monteiro de Freitas Teixeira***

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Profa. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Profa. Dra. Débora d'Avila Reis

Dissertação defendida e aprovada em 19 de maio de 2005

Dedico este trabalho a Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais, por colaborarem pelo meu crescimento pessoal e profissional e por lutarem pela realização dos meus sonhos.

Ao Olindo, por seus ensinamentos e por toda sua dedicação.

## **Agradecimentos**

Ao meu Pai do Céu, “não tenho palavras para agradecer Tua bondade, dia após dia, me cercas com fidelidade, nunca me deixes esquecer que tudo que tenho, tudo que sou, o que vier a ser, vem de Ti Senhor. Tudo, entrego a Ti.”

À minha querida mãe, a força transmitida e o enorme amor que me manteve perseverante e confiante. E por ser minha amiga do coração, compartilhou comigo todos esses momentos. E ao meu pai, que mesmo ausente, lutou para a realização dos meus sonhos. Muito obrigada!

Ao Luiz, pelo carinho, apoio e ajuda nessa caminhada. E pela forte presença em todos os momentos.

Aos meus queridos irmãos, a Bel, pelos conselhos, a Sissi, por sua luz, pela paciência em me ouvir, ao Arnaldo, pelo carinho e a Cláudia pelo incentivo. Obrigada a vocês pela amizade e por nossa cumplicidade.

Ao meu tio Arnaldo, exemplo de pai.

À minha querida e eterna amiga Denise. Obrigada por ter me ajudado a chegar aqui, sem você nada disso seria possível. Obrigada pela sua amizade. Obrigada por me ouvir. Obrigada por me compreender. Obrigada por toda ajuda. Obrigada pela pessoa que é. Obrigada por fazer parte da minha vida e da minha família. Muito obrigada.

À Thalita, pelas palavras tão sábias, tão esclarecedoras, sempre me ajudando na busca da consciência.

Ao ejC, minha família do coração. Obrigada pelo carinho e preocupação.

Ao Dr. Olindo, pelo exemplo de competência. Obrigada por todos ensinamentos, pelo crescimento profissional e pessoal. Pelo carinho, pela atenção e dedicação. Obrigada por ter permitido realizar esse trabalho com você.

À Dra. Silvana, pela doce presença, pelas sugestões e por todo apoio.

À Ariane, por toda ajuda, por todos os ensinamentos. Por ter cooperado para o meu crescimento, pela sua enorme e preciosa colaboração para a realização desse trabalho.

À Vanessa Pascoal, Roberta Dias e Jordana por todo o apoio. Pela amizade, pela preocupação com o meu trabalho. Obrigada por serem tão especiais.

À Dani e ao Renato, obrigada por terem feito parte de um momento tão importante da minha vida. Obrigada por todo carinho, por todo cuidado com o meu trabalho e por todos os ensinamentos. Obrigada por cada momento que estive com vocês. Foi um imenso prazer. Adoro vocês!

À Eliandra, pela amizade, pelo carinho com que me recebeu. Pelas conversas, por tornar a vida mais alegre, por ter me proporcionado dias tão agradáveis. Obrigada por toda ajuda.

À Roberta Félix, pelos conselhos e atenção. Por estar sempre disposta a nos atender.

À Bia, por todo o apoio técnico.

Ao Márcio, pela atenção e pela disposição em solucionar as minhas dúvidas.

A Léia, por sua cumplicidade e por ter compartilhado comigo momentos de descobertas. Obrigada pela sua Presença significativa.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos do laboratório, obrigada por ter pessoas como vocês ao meu lado: Xênia, Simone, Renata, Ana Marciano, Ana Wendling, Izabelle, Paula, Júlia, Rodrigo, Natália, Luíza, Marina e Jaqueline.

Aos amigos do laboratório de Imunologia, pelo carinho com que sempre me receberam.

Aos meus amigos da Pós – graduação, pela amizade. Em especial à Marcela, Fabrícia, Fernanda e Marília pelas conversas, e pelos momentos de partilha.

Ao Paulo, pela atenção e por ajudar a solucionar os meus problemas.

A Comissão de Pós-Graduação – CPG, por nos receber com atenção, estando sempre disponíveis para nos ajudar.

À Carol, por todo auxílio na estatística.

Ao Segemar, pelas constantes e imprescindíveis buscas para a concretude deste.

Ao Edmar pela assistência na informática.

À Carla por tornar o ambiente adequado e propício para a realização do trabalho.

À Cíntia por facilitar o trabalho na lavagem dos materiais.

Aos funcionários, pelo carinho e pela inesquecível acolhida.

Aos pacientes, pela oportunidade de aprendizado.

“O conhecimento pode pôr o homem em contato com pequenas porções de felicidade que a vida lhe oferece; e, uma vez conseguidas, já não as poderá perder, pois se haverão integrado a sua vida.”

(da Logosofia)

## INDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>I – PACIENTES.....</b>	<b>17</b>
<b>II – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
1 - Material biológico.....	20
2 - Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	20
3 - Análises estatísticas.....	33
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>PARTE 1 - Aspectos fenotípicos de células envolvidas na imunidade inata: ênfase em monócitos e neutrófilos.....</b>	<b>35</b>
1 - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes.....	36

2 - Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes.....	39
<b>PARTE 2 - Aspectos fenotípicos de células envolvidas na imunidade adaptativa: ênfase em subpopulações linfocitárias.....</b>	<b>43</b>
1 - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes.....	44
2 - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes.....	49
<b>PARTE 3 - Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa: ênfase no número e tempo das lesões e na positividade da intradermoreação de Montenegro.....</b>	<b>55</b>
1 - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes.....	56
2 - Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes.....	62
3 - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes.....	70
4 - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes.....	84
<b>SINTESE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>100</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>118</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA I: População estudada.....**19**

TABELA II: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.....**22**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico.....	23
<b>Figura 2:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos pro-inflamatórios (CD4low+HLA-DR++) no sangue periférico.....	24
<b>Figura 3:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão da molécula CD23 em monócitos no sangue periférico.....	25
<b>Figura 4:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos CD28+, HLA-DR+ e CD23+ no sangue periférico.....	26
<b>Figura 5:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão da molécula CD16 em neutrófilos no sangue periférico.....	27
<b>Figura 6:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de subpopulação de linfócitos T e subpopulação de linfócitos B no sangue periférico.....	29
<b>Figura 7:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de subpopulação de linfócitos T ativados no sangue periférico.....	30
<b>Figura 8:</b> Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B no sangue periférico.....	32
<b>Figura 9:</b> Percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	36
<b>Figura 10:</b> Percentual médio de monócitos pró inflamatórios (HLA-DR++) no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	37

<b>Figura 11:</b> Análise da expressão da molécula CD23 em monócitos do sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	38
<b>Figura 12:</b> Percentual de neutrófilos CD28+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	39
<b>Figura 13:</b> Percentual de neutrófilos HLA-DR+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	40
<b>Figura 14:</b> Análise da expressão de CD16 em neutrófilos no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	41
<b>Figura 15:</b> Percentual de neutrófilos CD23+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	42
<b>Figura 16:</b> Percentual médio de linfócitos T (A), linfócitos T CD4+ (B) e linfócitos T CD8+ (C) circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	45
<b>Figura 17:</b> Percentual de linfócitos T totais HLA-DR+ (A), linfócitos T CD4+HLA-DR+ (B) e linfócitos T CD8+HLA-DR+ (C) circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	47
<b>Figura 18:</b> Razão de linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	48
<b>Figura 19:</b> Percentual médio de linfócitos B totais CD19+ (A), B convencionais CD19+CD5- (B) e linfócitos B1 CD19+CD5+ (C) no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....	50

**Figura 20:** Análise da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B circulantes do sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....51

**Figura 21:** Percentual de linfócitos CD19+CD23+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....52

**Figura 22:** Percentual da razão de Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD8+CD23+ (A), Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD8+HLA-DR+ (B) e Linfócitos T HLA-DR+/ Linfócito B total (C) circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲).....54

**Figura 23:** Percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....57

**Figura 24:** Percentual de monócitos pró-inflamatórios HLA-DR++ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....59

**Figura 25:** Análise da expressão da molécula CD23 em monócitos no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....61

**Figura 26:** Percentual de neutrófilos CD28+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....63

**Figura 27:** Percentual de neutrófilos HLA-DR+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....65

**Figura 28:** Análise da expressão de CD16 em neutrófilos no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....67

**Figura 29:** Percentual de neutrófilos CD23+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....69

**Figura 30:** Percentual médio de linfócitos T circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....71

**Figura 31:** Percentual médio de linfócitos T CD4+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....73

**Figura 32:** Percentual médio de linfócitos T CD8+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....75

**Figura 33:** Percentual médio de linfócitos T totais HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....77

**Figura 34:** Percentual médio de linfócitos T CD4+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....79

**Figura 35:** Percentual médio de linfócitos T CD8+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....81

**Figura 36:** Razão de linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....83

**Figura 37:** Percentual médio de linfócitos B totais CD19+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....85

**Figura 38:** Percentual médio de linfócitos B convencionais CD19+CD5- circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....87

**Figura 39:** Percentual médio de linfócitos B1, CD19+CD5+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....89

**Figura 40:** Análise da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).....91

**Figura 41:** Percentual médio de linfócitos CD19+CD23+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-

laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◇); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△).....93

**Figura 42:** Razão em valores absolutos de Monócitos HLA-DR+/CD19+CD23+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◇); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△).....95

**Figura 43:** Razão em valores absolutos de Monócitos HLA-DR+/CD8+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◇); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△).....97

**Figura 44:** Razão entre Linfócitos T HLA-DR+/CD19+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◇); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△).....99

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

APCs - Células apresentadoras de antígenos

BSA - Albumina bovina sérica

C5 - C9 - Proteínas do complemento

CD - "Cluster of differentiation"

CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares

CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos

CD14 - Marcador de superfície celular da população de monócitos

CD16 - Marcador de superfície celular da população de células NK

CD19 - Marcador de superfície celular da população de linfócitos B

DTH - Reação de Hipersensibilidade do tipo tardia

EDTA - Àcido Etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzyme linked immu

FACScan - Fluorecence Activated Cell Sorter

Fc - Fração cristalizável de imunoglobulinas

FcεRII - Receptor Fc de baixa afinidade para imunoglobulina E, também denominado

CD23

FcγRIII - Receptor Fc de baixa afinidade para imunoglobulina G, também denominado

CD16

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL - Fluorescência

FSC - Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)

FNS - Fundação Nacional de Saúde

GM - CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

HLA-DR - Antígeno Leucocitário Humano

Ig - Imunoglobulina

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

IMF - Intensidade Média de Fluorescência

INF- $\gamma$  - Interferon gama

LC - Leishmaniose Cutânea

LCF – Fator quimiotático de *Leishmania*

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LD - Leishmaniose Disseminada

LPG - Lipofosfoglicano

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

MFF - Solução fixadora

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIP-1 $\alpha$  - proteína inflamatória de macrófago 1 alfa

MIP-1 $\beta$  - proteína inflamatória de macrófago 1 beta

NI - Grupo não infectado

NK – Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS-P - Tampão Fosfato Salínico Permeabilizante

PBS-W - Tampão Fosfato Salínico de Lavagem

PE – Ficoeritrina

pH - Potencial hidrogeniônico

PMA - Acetato mirístico de forbol

RPMI - Meio de cultivo celular

rpm - rotação por minuto

SSC - Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento tumoral beta

Th1 - Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

WHO - Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

Os estudos que avaliam a participação de eventos imunológicos associados à progressão e resistência nas Leishmanioses chamam a atenção para a necessidade de maiores investigações a fim de identificar a influência de variáveis chaves no processo de categorização dos pacientes. Nesse trabalho analisamos características imunofenotípicas de leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, incluindo: o número de lesões (LCL-1 e LCL-2-4), o tempo de lesão (LCL $\leq$ 60 e LCL $>$ 60) e a positividade no teste de Montenegro (LCL-TM- e LCL-TM+), com ênfase em células envolvidas na imunidade inata e adaptativa. Nossos resultados mostraram que os mecanismos imunológicos que acompanham a infecção humana por *Leishmania* são constituídos de eventos complexos, multifatoriais que envolvem o estabelecimento concomitante de ativação e imunorregulação do compartimento da imunidade inata bem como aspectos fenotípicos sugestivos da ativação paralela da imunidade celular e humoral. Esse perfil complexo foi parcialmente esclarecido, quando consideramos a associação de aspectos clínico-laboratoriais com os parâmetros fenotípicos avaliados. Observamos um predomínio de alterações associados à imunidade celular no grupo LCL-1, enquanto uma maior frequência de aspectos da imunidade humoral foi detectada no grupo LCL-2-4. Observamos uma dinâmica típica nos eventos da imunidade inata, mais frequente no grupo LCL $\leq$ 60 e adaptativa, preferencialmente detectadas no grupo LCL $>$ 60. Associados ao grupo LCL-TM+, foram os aspectos imunofenotípicos da imunidade inata e adaptativa associados à atividade protetora leishmanicida. Em conjunto, nossos resultados demonstram a importância de se considerar esses parâmetros clínico-laboratoriais para a categorização de pacientes portadores de LCL nos estudos de aspectos imunológicos associados à leishmaniose tegumentar americana.

## ABSTRACT

Several studies focusing attention on the immunological events associated with resistance and susceptibility in Leishmaniasis aware for the need of additional investigation to identify the influence of key parameters to be used in order to better classify the patients. Herein we have analyzed immunophenotypic features of peripheral blood leukocytes from *Leishmania* patients, categorized based on their clinic-laboratorial status, including: number of lesions (LCL-1 e LCL-2-4), time of lesion evolution (LCL $\leq$ 60 e LCL $>$ 60) and the positivity on Montenegro skin test (LCL-TM- e LCL-TM+), focusing attention on cells involved in the innate and adaptive immunity. Our results demonstrated that the immunological mechanisms triggered by *Leishmania* infection in humans are constituted by multifactorial and complex events that involve the concomitant establishment of activation and immunoregulation within the innate immunity compartment as well as phenotypic features suggestive of parallel activation of cellular and humoral adaptive immune response. This complex profile was partially clarified when we considered the association between clinical-laboratorial findings and the phenotypic features evaluated. We observed a predominance of phenotypic alterations linked to cellular immunity in the LCL-1 group, whereas a higher frequency of aspects related to humoral immune response was typical of LCL-2-4 group. We have noticed a classic dynamic of innate immunity events, more frequently observed within the LCL $\leq$ 60 group and those of adaptive immune response, preferentially detected for the LCL $>$ 60 group. Associated with the LCL-TM+ group we found immunophenotypic features related with the innate and adaptive leishmanicide protective activity. Taken together, our findings demonstrated the importance of considering these clinic-laboratorial parameters to better categorize the *Leishmania* patients in studies of immunological aspects associated with the American Cutaneous Leishmaniasis

## **INTRODUÇÃO**

As leishmanioses são um complexo grupo de doenças causadas por parasitos da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A taxonomia do gênero *Leishmania* é bastante complexa. Após extensa revisão, LAINSON & SHAW (1987) sugeriram a organização das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, levando-se em consideração o local em que os parasitos multiplicam-se no tubo digestivo do flebotomíneo. O subgênero *Viannia* engloba os parasitos do complexo “*braziliensis*” e o subgênero *Leishmania* compreende os parasitos do complexo “*mexicana*”. No Brasil, as principais espécies que causam leishmanioses humanas são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) chagasi*, sendo as seis primeiras dermatrópicas e a última apresentando um caráter viscerotrópico (GRIMALDI et al., 1989).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de formas clínicas que dependem das espécies de *Leishmania* envolvidas e da relação parasito-hospedeiro (SARAIVA et al., 1989). Em função do caráter espectral das manifestações clínicas das leishmanioses, diversos autores têm proposto diferentes classificações clínicas. MARZOCHI (1992) propõe a classificação das Leishmanioses sob quatro formas clínicas: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), objeto de estudo nessa investigação, engloba as três primeiras formas clínicas. A LCL caracteriza-se por apresentar lesões únicas ou múltiplas confinadas na pele, observando-se poucos parasitos nas lesões, tendendo à cura espontânea. As lesões se caracterizam por úlceras com bordas elevadas com o fundo granuloso, com ou sem exsudação (MARZOCHI, 1992). A LMC acomete, principalmente a mucosa nasal e oral, sendo na maioria das vezes secundária à lesão cutânea em atividade ou anos após ter sido cicatrizada. Essa forma clínica é causada, na maioria das vezes, pela *L. braziliensis*, apresentando os níveis de anticorpos mais elevados que a LCL e uma resposta celular bastante aumentada. A LCD apresenta menor incidência, sendo caracterizada por nódulos não ulcerados disseminados por todo o corpo do paciente. Essa manifestação clínica apresenta aspectos bem diferentes das outras formas de LTA. Os casos de LCD no Brasil devem-se, principalmente, à infecção por *L. amazonensis* (MARSDEN, 1986).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004), a LTA ocorre em 88 países sendo sua notificação compulsória em apenas 30 deles. Do total de casos de LTA no mundo, cerca de 90% ocorreram em apenas seis países: o Irã, a Arábia Saudita, a Síria e o Afeganistão no Velho Mundo, e o Brasil e o Peru na América do Sul. No continente americano, há uma grande diversidade na casuística dos diferentes países. No Brasil, o número de casos da LTA vem aumentando consideravelmente, havendo uma média anual de 35 mil novos casos. A incidência da doença no Brasil aumentou de 21.800 casos em 1998 para 60.000 casos em 2003. Segundo a Secretaria de Estado da Saúde (SES/MG) em Minas Gerais, pelo menos 401 dos 856 municípios já registraram a ocorrência de transmissão de LTA. Foram notificados 1074 casos de leishmaniose até o final de 1998 (FNS, 1999).

A LTA é mais comum em trabalhadores que entram em contato com a mata onde ocorre transmissão. Entretanto, ao lado desse aspecto associado à floresta, a doença, foi descrita em áreas de colonizações antigas há muito tempo desmatadas e destinadas à agropecuária, como por exemplo, o Vale do Rio Doce, no Estado de Minas Gerais (MAYRINK et al., 1979). Dessa forma, acredita-se que a alta frequência da doença em todos os estados brasileiros, principalmente nas regiões norte e nordeste, devem-se principalmente a dois fatores epidemiológicos: 1) a ação antrópica invasiva, resultando na maior exposição à doença, e 2) o processo migratório, na ocupação das periferias dos centros urbanos, fazendo com que vários mamíferos passem a ser novos reservatórios do parasito (FNS, 1999). Nesse contexto, os principais reservatórios da LTA são pequenos roedores silvestres, e em menor proporção animais domésticos.

Os vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose são dípteros pertencentes à família Phlebotominae, ao gênero *Lutzomyia* (SHAW, 1999). A transmissão do parasito ocorre através da picada da fêmea infectada para exercer o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, sendo inoculadas as formas promastigotas infectantes (metacíclicas) juntamente com a saliva do flebotomíneo. Ao serem introduzidas no corpo do hospedeiro vertebrado os parasitos inoculados, são inicialmente opsonizados por moléculas do sistema do complemento, e penetram nos macrófagos via receptores CR1 e CR3, onde se transformam em amastigotas. Neste microambiente intracelular, as moléculas de superfície das formas amastigotas, principalmente o Lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína gp63, protegem o parasito da lise no interior do fagolissosoma, inibindo mecanismos oxidativos e enzimas

lisossomais, promovendo assim condições favoráveis para a multiplicação do parasito. Eventualmente, os macrófagos infectados se rompem e liberam as formas amastigotas, que infectam macrófagos adjacentes, contribuindo assim para a instalação do quadro infeccioso. Ao exercer novo repasto, o inseto ingere juntamente com o sangue, macrófagos parasitados por formas amastigotas. No interior do trato digestivo do vetor, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas que se transformam em formas promastigotas, que se multiplicam ainda no sangue ingerido, envolto por uma matriz peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto, a qual se rompe após alguns dias do repasto. Após a desintegração da matriz peritrófica, as formas promastigotas migram para o intestino do vetor, onde ocorre nova multiplicação e diferenciação. As *Leishmanias* na forma promastigota metacíclica migram para a região anterior do tubo digestivo prontas para infectarem um novo hospedeiro (SHORTT et al., 1931; SACKS, 1989).

A prevenção da LTA é difícil, já que seus vetores e reservatórios são predominantemente silvestres, dificultando, dessa forma, a eliminação de animais infectados, bem como o uso de inseticidas. Apesar da LTA se caracterizar por um padrão epidemiológico silvestre, existem áreas periurbanas onde houve adaptação do vetor no ambiente peridomiciliar, aumentando assim, a frequência de cães com LTA no nordeste e sudeste do Brasil (MARZOCHI & MARZOCHI, 1997). Além disso, o controle da LTA apresenta restrições, devido aos aspectos múltiplos inerentes ao parasito, aos vetores, reservatórios e hospedeiros. Várias são as tentativas de desenvolvimento de métodos capazes de controlar a doença. Atualmente, medidas profiláticas anti-LTA estão baseadas no controle vetorial (MARZOCHI & MARZOCHI, 1997), associado ao tratamento de casos humanos (TOLEDO et al., 2001).

Atualmente, o tratamento da LTA está baseado principalmente na quimioterapia com antimoniais pentavalentes. A utilização de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) recombinante associado ao antimonial no tratamento da LCD tem apresentado resultados promissores (BADARO et al., 1993). Numa outra abordagem terapêutica, recentemente, a vacina contra LTA desenvolvida por MAYRINK et al. (1979) tem sido empregada em associação com antimoniais, com bons resultados em casos onde o antimônio apresenta-se ineficaz ou induz efeitos colaterais graves (MAYRINK et al., 1979; MAYRINK et al., 1985). Essa associação da imunoterapia ao antimônio, denominada

imunoterapia vem demonstrando-se eficaz no tratamento de pacientes co-infectados com HIV-*Leishmania*, resistentes à terapia com as drogas convencionais (Da CRUZ et al., 1999). Este novo enfoque da terapêutica da LTA chama a atenção para a necessidade de estudos no campo da imunologia, que possam dar suporte na interpretação dos resultados, bem como auxiliar na elaboração de novos esquemas terapêuticos aplicáveis em situações especiais.

Os mecanismos imunológicos que protagonizam a leishmaniose vêm sendo investigados, a fim de elucidar os aspectos associados aos eventos de proteção e imunopatologia durante a progressão da doença. Grande parte dos conhecimentos sobre os aspectos imunológicos na LTA foi consolidada a partir de estudos realizados através de infecções experimentais em modelo murino (HOWARD et al., 1980; LOCKSLEY et al., 1987). Esses estudos permitiram a elaboração de uma proposta geral de que a recuperação e resistência à leishmaniose devem-se principalmente ao componente celular da resposta imunológica, relegando a participação humoral a um segundo plano (LOCKSLEY et al., 1987).

O estudo da leishmaniose em modelo murino permitiu uma melhor compreensão acerca dos mecanismos imunorreguladores e imunopatológicos na LTA. A resistência à infecção observada em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, está relacionada à ativação e diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> do Tipo 1, secretoras de IFN- $\gamma$  (LOCKSLEY et al., 1987), que é a principal citocina associada à resistência, que em sinergia com o TNF- $\alpha$ , promove a ativação de macrófagos e, conseqüentemente, favorece a eliminação das *Leishmanias* (GREEN et al., 1990). Dentre os mecanismos da resposta imune celular efetora já descritos, acredita-se que a destruição da *Leishmania* seja mediada por macrófagos ativados principalmente através da produção de óxido nítrico (NO) (WEI et al., 1995). Por outro lado, outras linhagens de camundongos (BALB/c) desenvolvem uma resposta imune predominantemente do Tipo 2 após a infecção com *L. major* (LOCKSLEY et al., 1987). Nestes animais, células T CD4<sup>+</sup> produzem IL-4 em resposta a antígenos de *Leishmania*. A IL-4 regula negativamente a produção de IFN- $\gamma$  e NO, impedindo a destruição dos parasitos pelos macrófagos. Além disso, a IL-4 promove a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> do Tipo 2 com secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, entre outras citocinas, bem como a produção de anticorpos específicos (HEINZEL et al., 1989). Os mecanismos que levam

preferencialmente à ativação e expansão de diferentes tipos de células T CD4<sup>+</sup> ainda não estão completamente esclarecidos. Evidências sugerem que vários fatores possam afetar este processo durante a infecção por *Leishmania*: 1) a interação do parasito com células apresentadoras de antígenos com habilidades distintas de apresentar diferentes classes de moléculas antigênicas, 2) a influência de sinais co-estimuladores, 3) os mecanismos de transdução de sinais utilizados pelas subclasses das células T CD4<sup>+</sup> e 4) o perfil de citocinas presente durante os eventos iniciais da diferenciação celular (GRIMALDI & TESH, 1993).

Recentemente grande importância tem sido dada aos eventos iniciais da resposta imune na LTA experimental, com ênfase no papel da imunidade inata no direcionamento da imunidade adaptativa. Existem evidências de que o desenvolvimento da LTA murina é criticamente dependente dos eventos iniciais que ocorrem logo após o encontro dos parasitos com neutrófilos que parecem ser as primeiras células hospedeiras do parasito, enquanto aguardam a chegada de macrófagos ao foco de infecção (WOODMAN et al., 1998; PEARSON & STEIGBIGEL, 1981). Neste contexto, células da imunidade inata, como os granulócitos, macrófagos e células dendríticas secretam citocinas e quimiocinas, resultando em um microambiente favorável ao direcionamento da diferenciação das células T presentes nos linfonodos proximais, para células do Tipo 1, com papel protetor, ou Tipo 2 associados ao fenótipo de susceptibilidade (STENGER & RÖLLINGHOFF, 2001). Em suma, os dados obtidos em modelo experimental murino para LTA, sugerem que uma resposta imune celular efetora contra a *Leishmania* promove a síntese de IL-12 e a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> do Tipo 1, com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , culminando na ativação de macrófagos, produção de NO, eliminação dos parasitos e resolução da infecção.

Entretanto, os mecanismos protetores e imunopatológicos demonstrados no modelo murino de infecção com *L. major*, devem ser analisados com cautela, considerando a necessidade de validação para o contexto da infecção humana. Acredita-se que outros fatores contribuem no desenvolvimento e na resolução da Leishmaniose humana, onde a resposta imune humana não tem sido tão bem caracterizada como em modelos experimentais (MELBY et al., 1994).

Como observado em modelo experimental, vários autores mostram o envolvimento da resposta imune celular na resolução da infecção humana (CARVALHO et al., 1985; Da CRUZ et al., 1994). Entretanto, a contribuição das diferentes

populações celulares e citocinas ainda não estão bem esclarecidas. Dados relacionados ao perfil fenotípico celular do infiltrado inflamatório no foco das lesões cutâneas, bem como os estudos da expressão de citocinas e quimiocinas realizados através da análise de biópsias da lesão têm demonstrado resultados bastante controversos, principalmente quando consideramos a espécie de *Leishmania* infectante e o tempo de lesão.

Estudos realizados em camundongos infectados com *L. major*, avaliaram a participação das células da imunidade inata no curso da infecção. Foi observado que os granulócitos são as primeiras populações leucocitárias a serem recrutadas ao local de infecção, em seguida os macrófagos passam a ser predominante na lesão na fase inicial (MULLER et al., 2001). GUTIERREZ et al. (1991) mostraram haver uma correlação inversa entre a presença de amastigotas e a presença de eosinófilos nas biópsias de lesões de pacientes portadores da LTA. Com relação às células NK, essas têm sido implicadas como mediadoras da interface da resposta imune inata e adquirida (BACKSTROM et al., 2003). MAASHO et al. (1998) sugeriram que as células NK estariam envolvidas no processo de proteção e cura de pacientes com LCL. Além das células da imunidade inata contribuírem para a contenção do parasito na fase inicial da infecção, há evidências da participação dessas células na síntese de citocinas com propriedades imunorregulatórias, podendo influenciar na diferenciação das células T (TACCHINE-COTTIER et al., 2000).

Alguns estudos que avaliam a freqüência de subpopulações de linfócitos T no infiltrado inflamatório das lesões cutâneas de pacientes portadores de LCL relatam um predomínio de linfócitos T CD4+ (BARRAL et al., 1987; PIRMEZ et al., 1990; ESTERRE et al., 1992), enquanto outros demonstram um envolvimento maior de linfócitos T CD8+ nas lesões (MODLIN et al., 1985; MARTÍNEZ-ARENDIS et al., 1991; VIEIRA et al., 2002; SILVEIRA et al., 2004). Nesse contexto, foi observado que as lesões de pacientes portadores de LCL com menos de 1 ano de evolução, apresentam freqüências semelhantes de células T CD4+ e T CD8+, bem como a presença de células T CD25+, expressando o marcador de ativação HLA-DR (MARTÍNEZ-ARENDIS et al., 1991). Num estudo que avaliou a relação entre tempo de evolução da doença e o fenótipo celular presente na lesão, LIMA et al. (1994) não observaram variações no percentual de macrófagos, células B e linfócitos T CD4+ e T CD8+. Entretanto, foi observado que lesões recentes apresentavam um aumento no percentual de células

T $\gamma\delta$ +, quando comparadas com lesões mais antigas. A análise das lesões de pacientes infectados com *L. major*, no momento do diagnóstico e durante o processo de cura, mostrou a presença de grande número de células expressando o marcador de ativação celular HLA-DR no momento do diagnóstico, e uma diminuição no percentual de células T CD8+ na lesão durante a cura (GAAFAR et al., 1999). Estudos que avaliam a expressão de citocinas na lesão de indivíduos portadores de LCL demonstram um predomínio de IFN- $\gamma$  sobre IL-4 e baixa expressão de IL-5 e IL-10 (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993). MELBY et al. (1994) avaliando a expressão de citocinas na lesão de pacientes infectados com *L. mexicana*, observaram um aumento significativo na expressão de IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  nas lesões antigas ( $\geq$  4 meses de evolução), quando comparado a lesões mais recentes ( $<$  2 meses de evolução). Estudos realizados por VIEIRA et al. (2002) demonstram que na lesão há um predomínio paralelo de células T CD8+, com presença de células IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  positivas.

Em conjunto, os estudos imunofenotípicos mais recentes têm confirmado o papel de células T CD8+ na resposta imune com um perfil mais balanceado na LCL, sugerindo a importância dessas células no processo de cura da infecção (SILVEIRA et al., 2004). Cabe ressaltar que o estudo do perfil imunofenotípico em células das lesões da LTA humana apresenta restrições, já que freqüentemente, as lesões são múltiplas, dessa forma, como instrumento alternativo de investigação, vários autores têm proposto a avaliação dos elementos e eventos da resposta imune, através da análise de leucócitos do sangue periférico, como perspectiva de retratar o perfil imunológico de todas as lesões, sumariando a resposta imune (GAAFAR et al., 1999).

Os estudos dos aspectos imunofenotípicos de leucócitos do sangue periférico humano têm sido realizados tanto no contexto *ex vivo*, quanto após intervenções antígeno-específicas *in vitro* em estudos realizados com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em culturas convencionais *in vitro* ou amostras de sangue total empregadas em técnicas de cultura rápida *in vitro*. A maioria desses estudos aborda aspectos gerais de associação entre o perfil fenotípico celular e aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes, visando associar um determinado perfil fenotípico com os eventos de resistência e susceptibilidade na LTA. Nesse contexto, os parâmetros de resistência e susceptibilidade têm sido estudados considerando-se como

“susceptível” o grupo de indivíduos infectados, portadores de lesão recente e doença ativa. Já a “resistência” tem sido considerada como uma característica observada em indivíduos portadores de lesão crônica, em processo de resolução, em indivíduos curados após quimioterapia ou imunoterapia, em indivíduos vacinados e aqueles naturalmente resistentes residentes em áreas endêmicas para a LTA. Do ponto de vista laboratorial, a resistência à infecção na LTA tem sido associada à positividade na intradermoreação de Montenegro (TM) (BOURREAU et al., 2003; MAYRINK et al., 1979).

Considerando o exposto, estudos realizados por ADJARY et al. (2000) demonstraram que PBMC de pacientes com lesões ativas e indivíduos curados produzem altos níveis de IFN- $\gamma$ , paralelos à ausência ou baixos níveis de IL-4 em culturas estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. major*. Por outro lado, a ausência ou baixos níveis de IFN- $\gamma$ , paralelo à uma alta produção de IL-4 foram encontrados em pacientes portadores de lesões crônicas. Na maioria dos indivíduos avaliados as células que expressavam citocinas intracelulares após a incubação com antígeno, eram linfócitos T CD4+. Não foram encontradas diferenças significativas no percentual de linfócitos T CD8+ produtores de citocinas, quando avaliados em culturas-controle ou estimulados com antígenos do parasito. Entretanto, vários trabalhos reforçam a hipótese de que os linfócitos T CD8+ estejam envolvidos nos mecanismos imunoprotetores na LTA e que o estabelecimento de um padrão de resposta do Tipo 1, com produção de IFN- $\gamma$  seja importante para o processo de resistência na LTA. A análise da resposta celular *in vitro*, empregando-se PBMC estimuladas com *L. major* mostrou um menor percentual de linfócitos T CD8+ nos pacientes ao diagnóstico, quando comparado aos valores observados no processo de cura pós-terapêutica (GAAFAR et al., 1999). Estudos desenvolvidos por DA CRUZ et al. (1994) e COUTINHO et al. (1998) também utilizando culturas de PBMC estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. braziliensis*, mostraram um maior percentual de linfócitos T CD8+ nas culturas de células de indivíduos curados, em relação aos indivíduos avaliados antes do tratamento, os quais apresentam um predomínio de linfócitos T CD4+. Esses autores acreditam que no processo de cura pós-terapêutica específica na LTA mais importante que apenas o predomínio de linfócitos T CD8+ seria o balanço entre as células T CD4+

e T CD8+, em que as primeiras teriam sua proporção diminuída durante o processo de cura.

Ainda no contexto da resistência na LTA, MENDONÇA et al. (1995) observaram uma expansão de linfócitos T CD8+ em culturas de PBMC de indivíduos vacinados, após estimulação *in vitro* com antígenos de *L. braziliensis*, contrastando com um predomínio de linfócitos T CD4+ em culturas de PBMC obtidas de pacientes infectados.

Estudos mais recentes, empregando uma nova abordagem de culturas *in vitro*, utilizando culturas de sangue total de curta duração, têm demonstrado maior correlação com os achados imunofenotípicos que apontam o papel importante de linfócitos T CD8+ nos eventos de resistência na LTA (MASINI, A.B. 2005, comunicação pessoal). Esse estudo demonstra um maior envolvimento de citocinas do Tipo 1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) em indivíduos portadores de lesão crônica, em processo de resolução e em indivíduos curados, e maior envolvimento de citocinas do Tipo 2 em portadores de lesões recentes e indivíduos não infectados de área endêmica para LTA.

Entretanto, também foi demonstrado que os linfócitos T CD4+ apresentam um aumento na síntese de IFN- $\gamma$  tanto no grupo com lesões recentes quanto no grupo com lesões tardias, e um aumento da síntese de TNF- $\alpha$  pelos linfócitos T CD4+, nos eventos mais tardios (MASINI, A.B. 2005, comunicação pessoal).

Tomados em conjunto, estes resultados, embora ainda um pouco controversos, sugerem que em humanos, as células T CD8+, a síntese de IFN- $\gamma$  com ausência ou produção reduzida de IL-4 estejam envolvidas nos mecanismos de imunidade protetora na LTA. Por outro lado, um predomínio de linfócitos T CD4+ sobre CD8+ e maior produção de IL-4 estão associados aos eventos de susceptibilidade na LTA. Assim, podemos postular que a resolução da infecção humana está associada ao componente celular da resposta imunológica e que as células T CD8+ e a citocina IFN- $\gamma$  parecem participar dos mecanismos de resistência e recuperação na leishmaniose tegumentar.

Cabe ressaltar, entretanto, que a resposta imune do hospedeiro portador de LTA a antígenos derivados de *Leishmania*, não deve ser avaliada de forma dirigida, restrita a aspectos fenotípicos associados aos eventos de imunidade celular. Nesse contexto, a resposta imune deve ser considerada como um somatório de interações entre moléculas sinalizadoras sob a forma de fatores solúveis, receptores de superfície celular e imunoglobulinas. Existem evidências obtidas em modelo experimental murino

que demonstram a participação de padrões distintos de resposta imune humoral nos eventos protetores e imunopatológicos na LTA experimental, onde se observa uma associação entre os eventos protetores da resposta do Tipo 1 e o predomínio de IgG2a enquanto, maior produção de IgG1 e IgE, tem sido associado à resposta do Tipo 2 e maior susceptibilidade dos animais (STEVENS et al., 1988). Em humanos, LABRADA et al. (1989) demonstraram o predomínio de níveis de IgM anti-*Leishmania* nos soros de pacientes com lesões recentes e o aumento dos níveis de IgG anti-*Leishmania* nos soros de pacientes com lesões tardias. Alguns estudos tentam associar os níveis séricos de anticorpos com aspectos clínico-laboratoriais da LTA. O'NEIL et al. (1993) demonstraram que pacientes com maior tempo de lesão e com acometimento das mucosas apresentam maiores níveis de IgE e IgA específicas para *Leishmania*, respectivamente. Alguns estudos tentam associar o aumento dos níveis séricos de IgG com a gravidade da infecção (SCHURR et al., 1986). Entretanto, os estudos da resposta imune humoral na LTA ainda apresentam lacunas importantes e resultados controversos. Por exemplo, num estudo realizado por SOUZA-ATTA et al. (2002) foi demonstrada a existência de uma correlação positiva entre os níveis séricos de IgE e o tamanho da intradermorreação de Montenegro, que está geralmente associada à capacidade do paciente em montar uma resposta celular. Por outro lado, os autores mostram uma correlação negativa entre o nível de IgE e o número de lesões, esse geralmente associado a um padrão de resposta do Tipo 2. Além disso, outro estudo demonstra uma correlação positiva significativa entre CD23s e IgE anti-*Leishmania*, em pacientes portadores da LCL, que poderiam estar contribuindo para a morte do parasito (CABRERA et al., 2003).

O papel de subpopulações de linfócitos B na LTA ainda encontra-se obscuro e requer maiores esclarecimentos. Estudos em modelo experimental mostraram que camundongos BALB/c depletados de células B1 (CD5+) são capazes de montar uma resposta imune do Tipo 1 associada a uma menor gravidade da doença, conferindo assim uma maior resistência à infecção por *L. major* (HOERAUF et al., 1994). Entretanto, BABAI et al. (1999) observaram que a infecção progride de forma mais grave nos camundongos BALB/c com depleção sistêmica das células B1, sugerindo que essas células não contribuem para a suscetibilidade dos camundongos BALB/c infectados com *L. major*. VIEIRA et al. (2002), avaliando o perfil imunofenotípico de linfócitos presentes nas lesões de pacientes portadores de LTA, observaram uma maior

freqüência de células B associada à alta produção de IFN- $\gamma$  nas lesões de pacientes portadores de LCL, quando comparado aos pacientes portadores de leishmaniose disseminada, sugerindo que tal associação poderia estar relacionada à contenção dos parasitos e os eventos de proteção na LTA. Os autores propõem que nas lesões, a elevada expressão de IFN- $\gamma$  estaria estimulando células B a secretarem anticorpos da subclasse IgG1 que poderiam estar envolvidos no processo de opsonização, promovendo uma fagocitose mais eficiente, levando ao controle do parasitismo. Por outro lado, os parasitos poderiam usar dessa via para ganharem acesso aos fagócitos, promovendo a sua multiplicação no interior dessas células.

A participação de eventos imunológicos associados à progressão e resistência à doença tem sido investigada em diversos trabalhos. Em modelo experimental, a polarização da resposta imune do Tipo 1 e Tipo 2 está bem caracterizada, entretanto os mecanismos imunológicos na infecção humana necessitam de maiores investigações. COUTINHO et al. (1996) demonstraram que a infecção humana não apresenta uma resposta polarizada do Tipo 1 ou do Tipo 2, como demonstrado nos trabalhos experimentais com camundongos. Nesse contexto, observa-se ainda a necessidade de maiores investigações da resposta imune na LTA, para a identificação de variáveis chaves no processo de categorização dos pacientes avaliados, considerando que além dos aspectos inerentes ao parasito infectante e a sincronidade do processo infeccioso, variáveis outras, como os aspectos clínico-laboratoriais do paciente podem ter um impacto diferencial no perfil de resposta imune observado. A fim de contribuir para o entendimento dos mecanismos imunológicos associados à LTA humana, propusemos para esse estudo, uma investigação detalhada de características imunofenotípicas de leucócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de LCL, com ênfase em células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa. O estudo dessas populações celulares será focalizado considerando-se uma proposta de categorização dos pacientes em função de aspectos clínico-laboratoriais relevantes no contexto da LTA.

**Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa na Leishmaniose Tegumentar Americana**

---

**OBJETIVOS**

## **Objetivo Geral**

***Estudar aspectos fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa no sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana***

## **Objetivos específicos**

- 1) Caracterizar aspectos fenotípicos de células envolvidas na imunidade inata: ênfase em monócitos e neutrófilos;
  
- 2) Analisar aspectos fenotípicos de células envolvidas na imunidade adaptativa: ênfase em subpopulações linfocitárias;
  
- 3) Investigar possíveis associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa: ênfase no número e tempo das lesões e na positividade da intradermorreação de Montenegro.

Para alcançar os objetivos específicos propostos nesse estudo, foram abordados os seguintes tópicos de investigação:

*Aspectos da Imunidade Inata:*

*I - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes:*

- A - Frequência de “macrófagos - like” (CD16+)*
- B - Frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++)*
- C - Expressão do receptor CD23 por monócitos*

*II – Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes:*

- A - Frequência de neutrófilos CD28+*
- B - Frequência de neutrófilos HLA-DR+*
- C - Densidade de expressão do receptor CD16 por neutrófilos*
- D - Frequência de neutrófilos CD23+*

*Aspectos da Imunidade Adaptativa:*

*I - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes:*

- A - Frequência de subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+)*
- B - Frequência de subpopulações de linfócitos T ativados (HLA-DR+)*

*II - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes:*

- A - Frequência de subpopulações de linfócitos B (CD5- e CD5+)*
- B - Densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B*
- C - Frequência de linfócitos B CD23+*

*Balanco da resposta imune:*

- A - Razão entre Monócitos HLA-DR+/Linfócitos CD19+CD23+*
- B - Razão entre Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD8+HLA-DR+*
- C - Razão entre Linfócitos T HLA-DR+/Linfócitos CD19+*

**Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa na Leishmaniose Tegumentar Americana**

---

**PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS**

## I – PACIENTES

Neste estudo foram incluídos 27 indivíduos portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) e 24 indivíduos não infectados (NI). Todos os indivíduos analisados foram voluntários residentes em uma área endêmica para a leishmaniose, na cidade de Caratinga, Vale do Rio Doce – Estado de Minas Gerais. A equipe do Departamento de Parasitologia da UFMG, sob a coordenação do Dr. Wilson Mayrink, vem atuando nesta área endêmica desde 1965, fornecendo assistência médica ambulatorial para mais de 10.000 pacientes. Os pacientes foram avaliados clinicamente por um médico dermatologista e o diagnóstico da LCL realizado através do teste parasitológico por pesquisa direta do parasito (PAR) em material de biópsia das bordas das úlceras e através de teste imunológico de hipersensibilidade tardia pela intradermoreação de Montenegro (TM). A seleção e o recrutamento dos voluntários, bem como a coleta do material biológico foram realizadas no Centro de Tratamento de Leishmaniose (CTL) em Caratinga - MG. Todo procedimento diagnóstico foi realizado por um técnico em patologia clínica, funcionário da Fundação Nacional de Saúde (FNS).

Após a avaliação clínica, os indivíduos selecionados foram inicialmente agrupados como portadores da LCL, por apresentarem resultado positivo em pelo menos um dos testes diagnósticos empregados (PAR-/TM+, PAR+/TM-, PAR+/TM+). Posteriormente, os pacientes portadores de LCL foram categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais em diferentes subgrupos, como descrito a seguir:

LCL-1 – Pacientes portadores de LCL caracterizada pela presença de uma lesão;

LCL-2-4 – Pacientes portadores de LCL caracterizada pela presença de duas a quatro lesões;

LCL $\leq$ 60 – Pacientes portadores de LCL caracterizada por lesão recente, com tempo de evolução inferior ou igual a 60 dias;

LCL $>$ 60 – Pacientes portadores de LCL caracterizada por lesão tardia, com tempo de evolução superior a 60 dias;

LCL-TM- – Pacientes portadores de LCL com intradermorreação de Montenegro negativa;

LCL-TM+ – Pacientes portadores de LCL com intradermorreação de Montenegro positiva.

O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis, residentes na mesma área endêmica, consistindo de indivíduos TM-.

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob o número de protocolo 0070/99 – CEP/FIOCRUZ.

A TABELA I apresenta os dados demográficos dos grupos de indivíduos estudados.

TABELA I - População estudada

<b>Grupos</b>	<b>Sigla</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo M/F</b>	<b>Total</b>
Não Infectados	NI	08-64	12/12	24
Leishmaniose Cutânea Localizada	LCL	05-83	17/10	27
	LCL-1	14-83	14/6	20
	LCL-2-4	05-37	4/3	7
	LCL≤60	05-58	11/7	18
	LCL>60	11-83	7/2	9
	LCL-TM-	07-47	4/1	5
	LCL-TM+	05-83	14/8	22

## II – MATERIAL E MÉTODOS

### 1 – Material biológico

No presente estudo, foram avaliadas amostras de sangue periférico de indivíduos residentes em área endêmica de LCL, que apresentavam lesão cutânea e com resultado positivo em pelo menos um dos testes diagnósticos empregados. Também foram avaliadas amostras de indivíduos que não apresentavam lesão ativa e/ou cicatriz compatível com LCL. O sangue periférico foi coletado a vácuo em tubos de 5 mL, contendo anticoagulante EDTA e foi utilizado para a realização do hemograma e para os ensaios de imunofenotipagem de leucócitos no contexto *ex vivo*.

### 2 – Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

#### Procedimento experimental

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram feitos segundo o protocolo proposto pelo fabricante Becton Dickinson, modificado conforme descrito a seguir.

Alíquotas de 100 µl de sangue periférico total, coletados em EDTA foram transferidas para tubos de poliestireno 12 x 75 cm (Falcon), contendo coquetel de anticorpos monoclonais específicos para marcadores de superfície celular de interesse, marcados com fluorocromos distintos (TAB. II). As combinações de anticorpos monoclonais foram estabelecidas em função dos imunofenótipos de interesse e incluíram: IgG1/IgG1; CD4/CD3; CD8/CD3; CD19/CD3; CD16/CD3; CD4/HLA-DR; CD8/HLA-DR; CD4/CD28; CD19/CD5; CD19/CD23. As misturas de anticorpos foram diluídas previamente em PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 2% de BSA (reagentes SIGMA, E.U.A.), empregando diluições previamente estabelecidas através de ensaios de titulação de cada anticorpo empregado. Após homogeneização em vórtex, a mistura reacional foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2 mL de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution – Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a

400G por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras lavadas com 2ml de PBS (0,015M pH 7,4), sendo novamente submetidas às mesmas condições de centrifugação. Posteriormente, as amostras foram fixadas com 300 µl de solução fixadora - MFF (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período adicional de 15 minutos a 4°C, a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados. Para cada imunofenotipagem, foram coletadas informações relativas aos aspectos morfométricos de tamanho e granulosidade, bem como aspectos imunofenotípicos de 10.000 eventos. As informações foram armazenadas em arquivos com extensão FCS, empregando a modalidade de arquivamento de resolução de 1024 canais e na modalidade “List Mode” para posterior geração dos dados, empregando diferentes estratégias de análise.

TABELA II - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

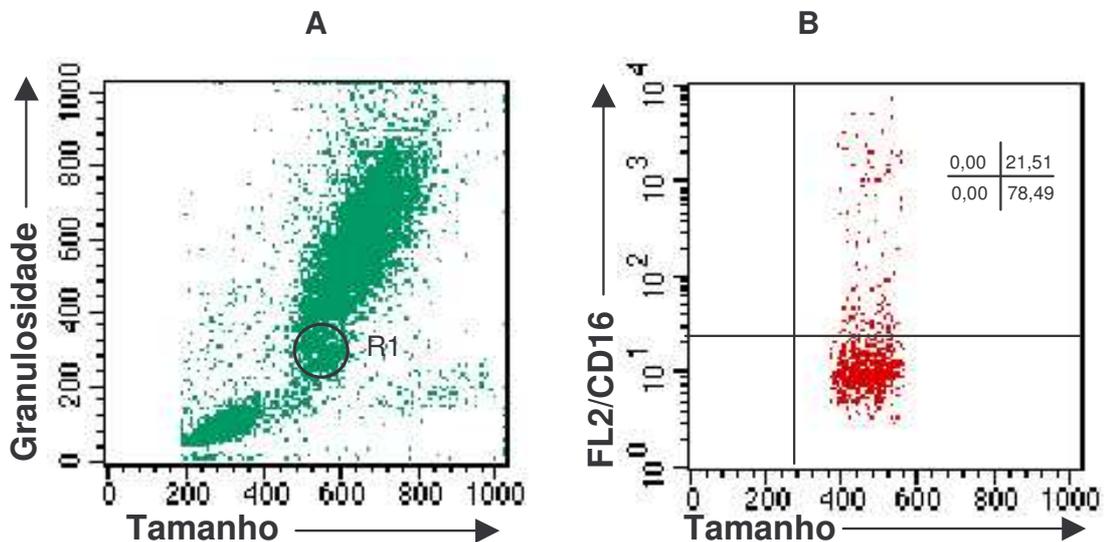
<b>Anticorpos</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Células-Alvo</b>
Anti-IgG1	FITC, PE	-
Anti-CD3	FITC	Linfócitos T
Anti-CD4	FITC, PE	Linfócitos T auxiliar
Anti-CD5	FITC	Linfócitos B1
Anti-CD8	FITC, PE	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD16	PE	Neutrófilos, Monócitos
Anti-CD19	FITC, PE	Linfócitos B
Anti-CD23	PE	Linfócitos B, Neutrófilos, Monócitos
Anti-CD28	PE	Linfócitos T, Neutrófilos
Anti-HLA-DR	PE	Linfócitos T, B e Neutrófilos

## 2 - Estratégias de análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes portadores de LCL e dos indivíduos não infectados foram analisados utilizando-se de estratégias específicas dependendo do fenótipo celular de interesse. Assim, empregando os recursos múltiplos de análise de dados disponíveis no programa CellQuest™, foram adotadas diferentes estratégias para análise fenotípica de células envolvidas na imunidade inata e adaptativa, baseada em oito modalidades disponíveis, denominadas aqui em função do fenótipo celular de interesse como descrito a seguir:

A – Análise da freqüência de “macrófagos - like” (CD16+)

A análise de monócitos CD16+ (macrófagos-like”) foi feita segundo protocolo proposto por ZIEGLER-HEITBROCK (1996), modificado conforme descrito a seguir: após a seleção da região de interesse (R1), baseado em aspectos morfométricos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), foram construídos gráficos de tamanho versus FL2/CD16 para quantificar o percentual de células CD16+ dentro da população de monócitos previamente selecionada em R1 (FIG. 1).

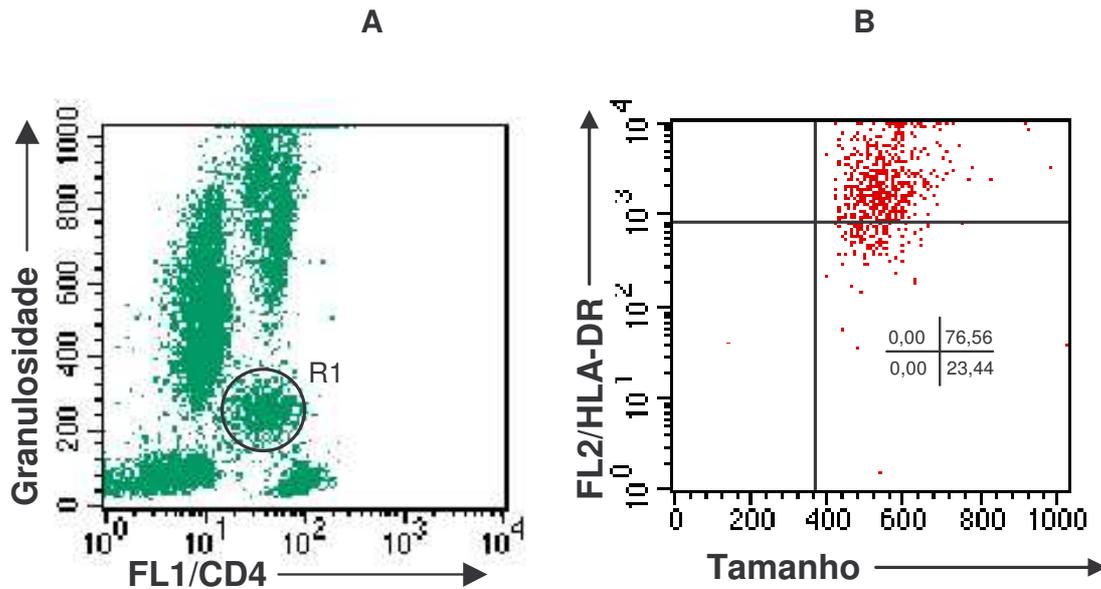


**Figura 1:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FSC versus FL2/CD16, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de monócitos CD16+.

B – Análise da freqüência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++)

A análise de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) foi feita segundo protocolo proposto por BELGE et al. (2002), modificado conforme descrito a seguir: após a seleção da região de interesse (R1), baseado em aspectos morfométricos e imunofenotípicos em gráficos de distribuição puntual de FL1/CD4 versus granulosidade (SSC) para a identificação da população de monócitos como células CD4low+ e de

granulosidade intermediária entre linfócitos e neutrófilos, foram construídos gráficos de tamanho versus FL2/HLA-DR para quantificar o percentual de células HLA-DR++ dentro da população de monócitos previamente selecionada em R1 (FIG. 2). O limiar de expressão de HLA-DR++ foi determinado através da análise paralela da expressão de HLA-DR por linfócitos B, considerando o perfil da expressão de HLA-DR por linfócitos.

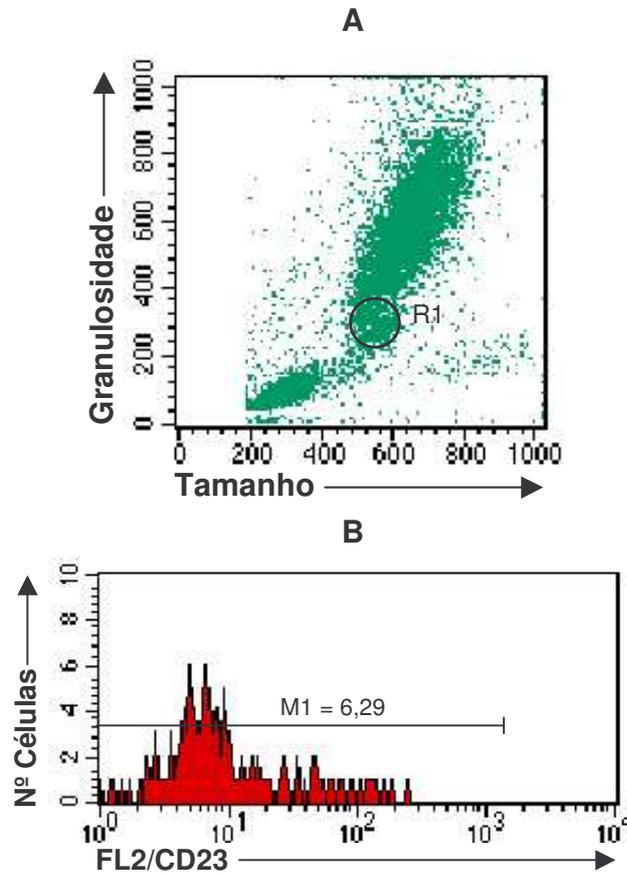


**Figura 2:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos pró-inflamatórios (CD4<sup>low</sup>+HLA-DR<sup>++</sup>) no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FL2/CD4 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FSC versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de monócitos pró-inflamatórios.

### C – Análise da expressão do receptor CD23 por monócitos

A expressão da molécula CD23 na população de monócitos foi determinada através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (IMF) conforme descrito a seguir: após a seleção da região de interesse (R1), baseado em aspectos morfométricos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), foram construídos histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência FL2/CD23 versus número de células para determinar a intensidade

média de fluorescência da expressão do CD23 pela população de monócitos previamente selecionada em R1 (FIG.3).

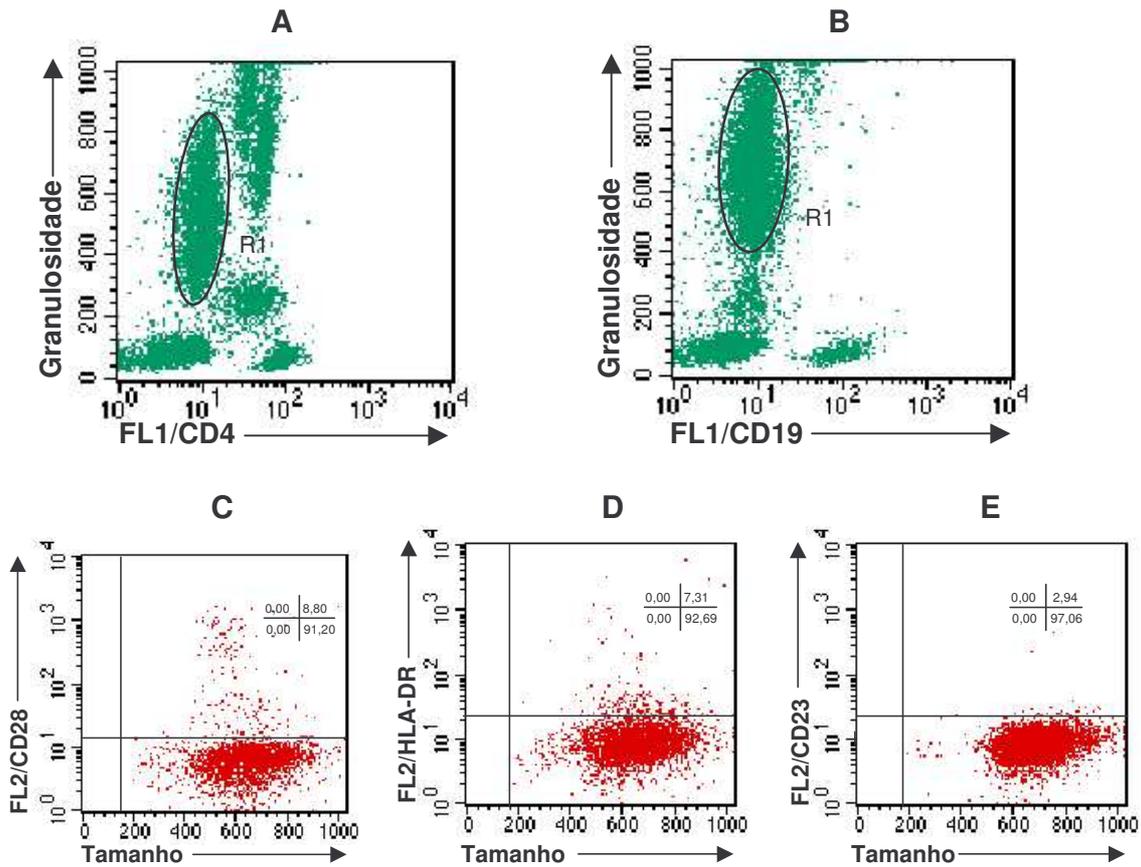


**Figura 3:** Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão da molécula CD23 em monócitos no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Histograma unidimensional de fluorescência FL2/CD23, contendo as células selecionadas na região R1, utilizado para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de CD23 por monócitos.

#### D - Análise da freqüência de neutrófilos CD28+, HLA-DR+ e CD23+

As análises de neutrófilos CD28+, HLA-DR+ e CD23+ foram feitas conforme descrito a seguir: a seleção da região de interesse (R1) foi baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos em gráficos de distribuição puntual de FL1/CD4 versus granulidade (SSC), para a identificação da população de neutrófilos como células CD4- e de granulidade elevada, minimizando assim a contaminação da região

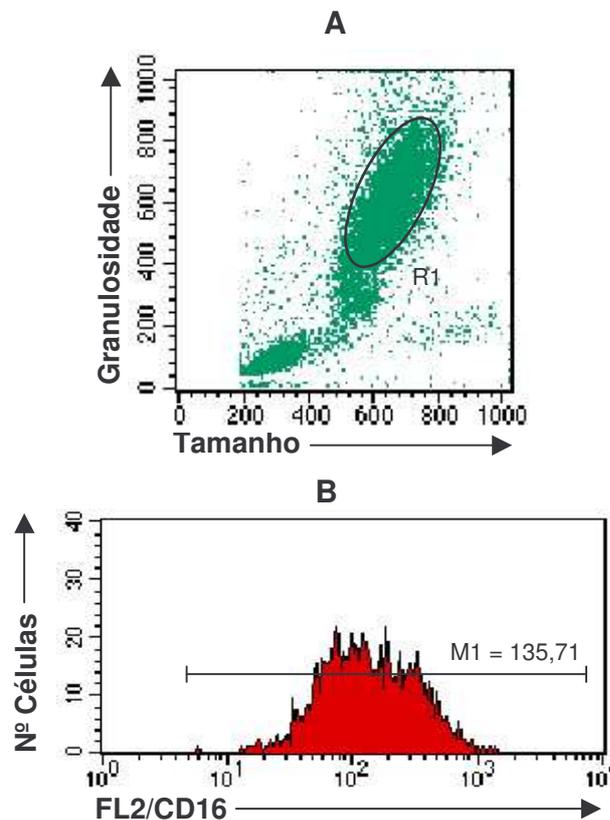
selecionada por monócitos e linfócitos. Em seguida foram construídos gráficos de tamanho versus FL2/CD28, FL2/HLA-DR ou FL2/CD23 para quantificar o percentual de células CD28+, HLA-DR+ e CD23+ dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (FIG. 4). A contaminação da região de neutrófilos por eosinófilos foi minimizada através da exclusão de células autofluorescentes em gráficos de distribuição puntual de FL1/CD4 versus fluorescência não relacionada (FL3).



**Figura 4:** Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos CD28+ no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD19 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. Gráfico de distribuição puntual FSC versus FL2/CD28 (C), FSC versus FL2/HLA-DR (D) e FSC versus FL2/CD23 (E), contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de neutrófilos CD28+, HLA-DR+ e CD23+.

E - Análise da densidade de expressão do receptor CD16 por neutrófilos

A expressão da molécula CD16 na população de neutrófilos foi determinada através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (IMF) conforme descrito a seguir: após a seleção da região de interesse (R1), baseado em aspectos morfométricos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), foram construídos histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência FL2/CD16 versus número de células para determinar a intensidade média de fluorescência da expressão do CD16 pela população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (FIG.5).



**Figura 5:** Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão da molécula CD16 em neutrófilos no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Histograma unidimensional de fluorescência FL2/CD16, contendo as células selecionadas na região R1, utilizado para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de CD16 por neutrófilos.

F – Análise da frequência das populações de linfócitos T (CD3+), B (CD19+) e das subpopulações de células T (CD4+ e CD8+) e B (CD5-, CD5+ e CD23+)

As análises das frequências de populações de linfócitos T (CD3+), B (CD19+) e das subpopulações de células T (CD4+ e CD8+) e B (CD5-, CD5+ e CD23+) foram realizadas utilizando-se da estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição puntual da fluorescência (FIG. 6).

O percentual de linfócitos T totais (CD3+) foi calculado como a média dos valores de células CD3+ obtidos em análises paralelas, empregando as combinações de anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD4, anti-CD3/anti-CD8, anti-CD3/anti-CD19 e anti-CD3/anti-CD16.

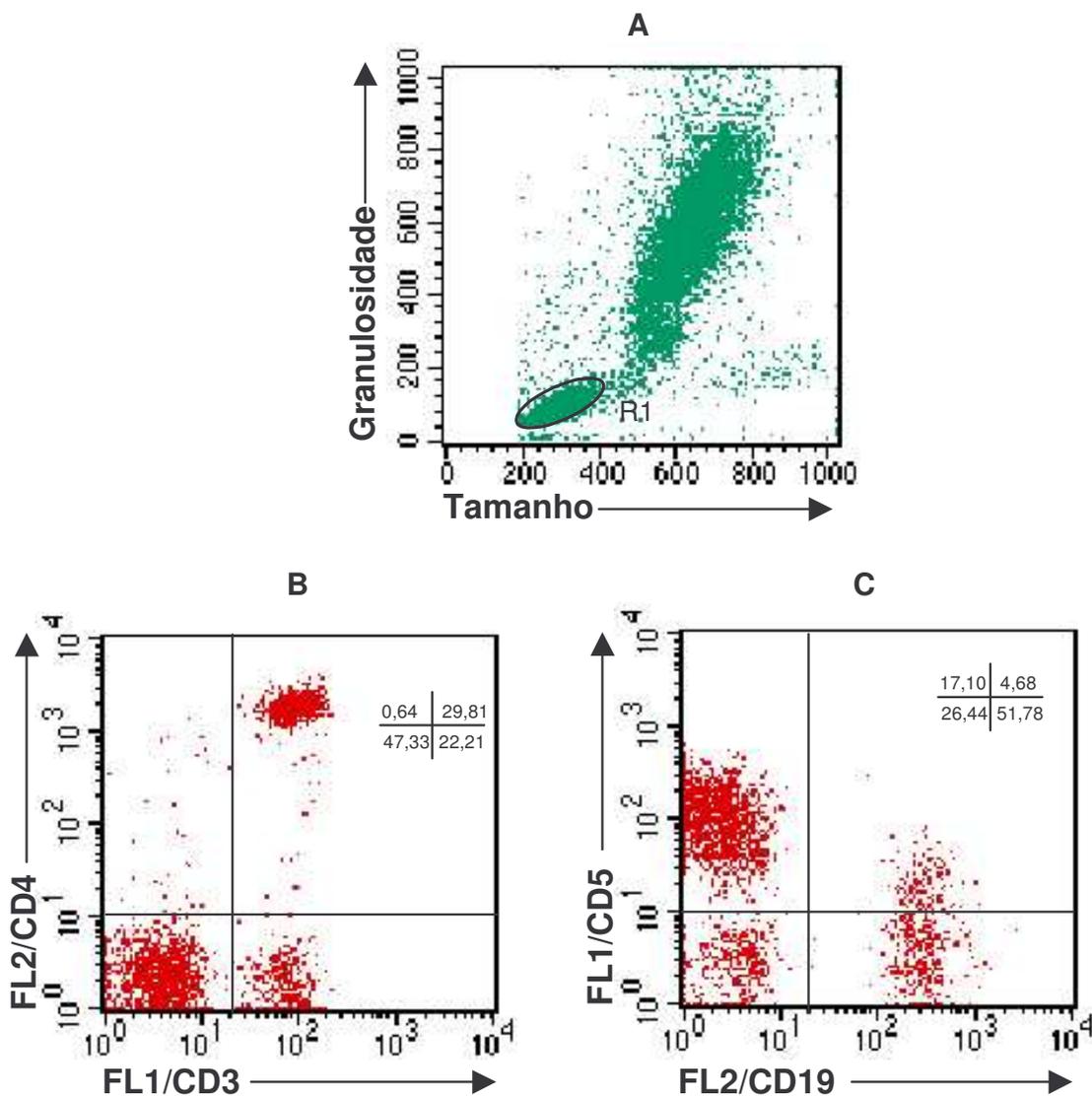


Figura 6: Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de subpopulação de linfócitos T e subpopulação de linfócitos B no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 versus FL2/CD4, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de subpopulações de linfócitos T. (C) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD5 versus FL2/CD19, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de subpopulações de linfócitos B.

G– Análise da freqüência de subpopulações de linfócitos T ativados (HLA-DR+)

A análise da freqüência de subpopulações de linfócitos T ativados (HLA-DR+) foi realizada utilizando-se da estratégia de análise convencional, seguida por cálculos adicionais para determinar a fração de células T ativadas dentro de uma subpopulação específica. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição puntual da fluorescência FL1/CD4 ou FL1/CD8 e FL2/HLA-DR (FIG. 7). As frações de células T ativadas dentro das subpopulações CD4+ e CD8+ foram calculadas através das fórmulas: [% de células CD4+HLA-DR+/(%CD4+HLA-DR- + %CD4+HLA-DR+) X 100] e [% de células CD8+HLA-DR+/(%CD8+HLA-DR- + %CD8+HLA-DR+) X 100].

O percentual de linfócitos T totais ativados foi calculado como o somatório das freqüências das subpopulações de células T ativadas ( $\Sigma$  % de células CD4+HLA-DR+ + CD8+HLA-DR+).

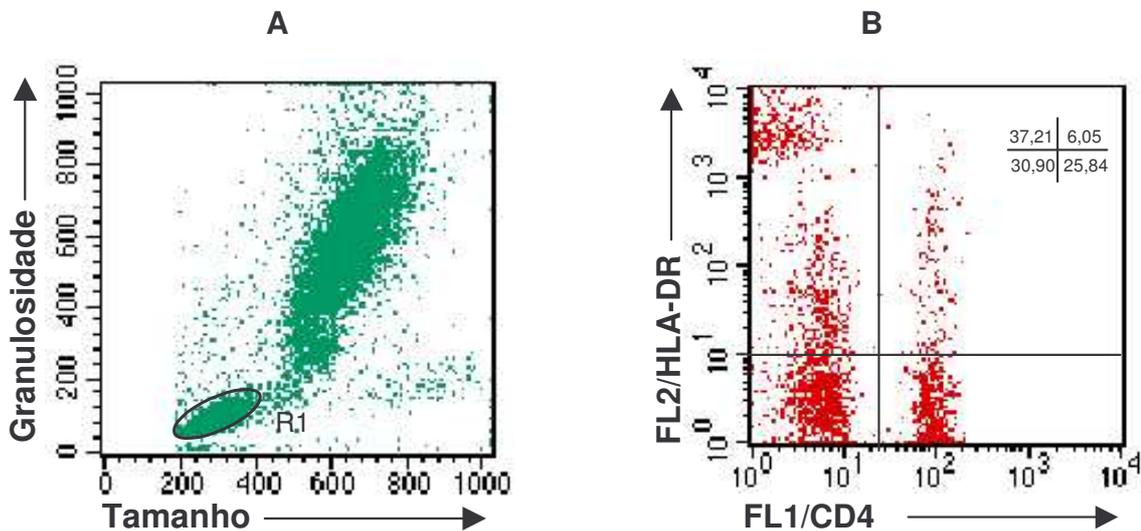
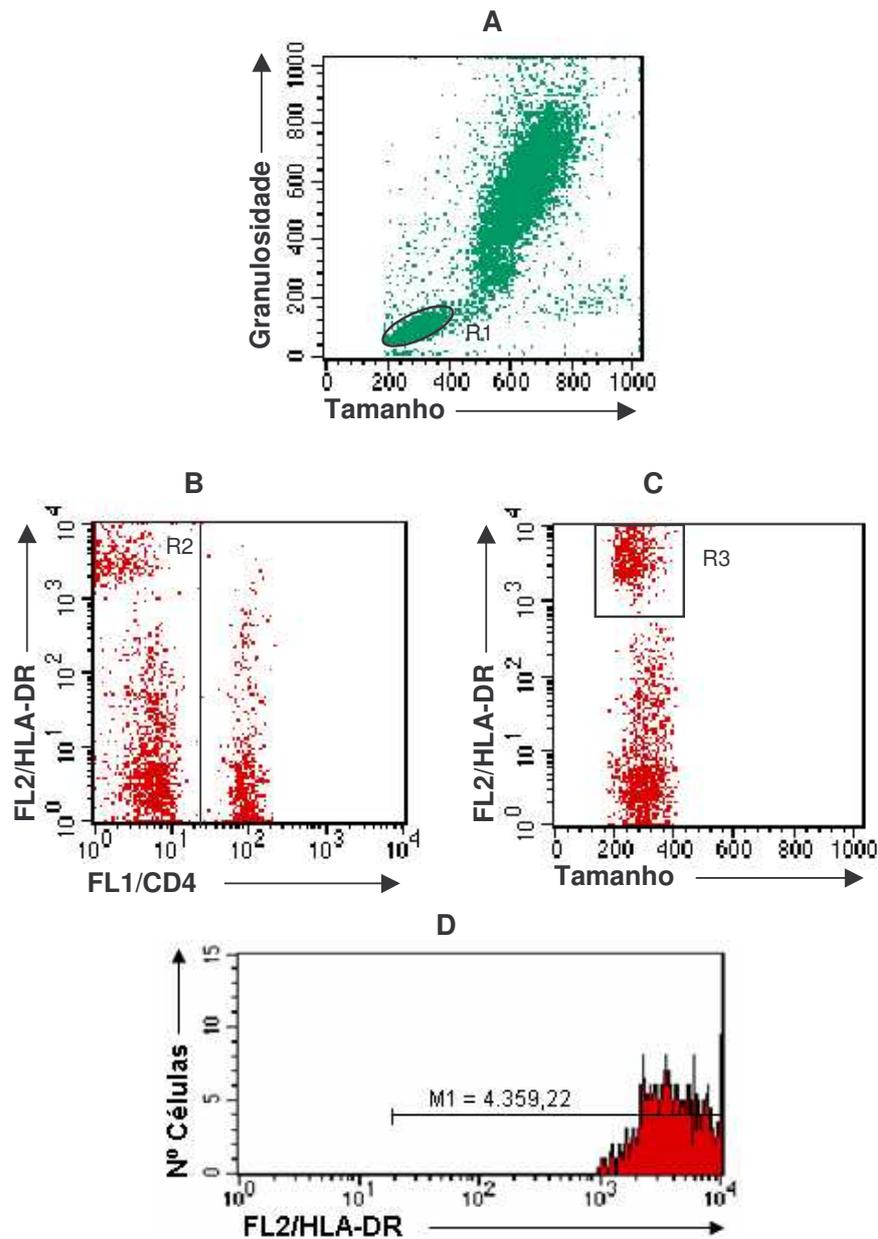


Figura 7: Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de subpopulação de linfócitos T ativados no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de subpopulações de linfócitos T CD4+ ativados.

## H - Análise da densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B

A expressão da molécula HLA-DR na população de linfócitos B foi determinada através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (IMF) conforme descrito a seguir: após a seleção da região de interesse (R1), baseado em aspectos morfométricos em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), foram construídos gráficos de distribuição puntual de fluorescência FL1/CD4 e FL1/CD8 versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas em R1, onde foram selecionadas as células CD4<sup>-</sup> ou CD8<sup>-</sup> (R2) para excluir a contaminação com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados em cada análise, respectivamente. Em seguida foram construídos gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus FL2/HLA-DR, contendo apenas as células presentes simultaneamente em “R1 *and* R2”, para a seleção da população HLA-DR<sup>++</sup> correspondente aos linfócitos B. Numa análise final, após a combinação das regiões “R1 *and* R2 *and* R3”, foram criados histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência FL2/HLA-DR versus número de células para determinar a intensidade média de fluorescência da expressão do HLA-DR pela população de linfócitos B previamente selecionada (FIG. 8).



**Figura 8:** Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B no sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para selecionar as células CD4- e eliminar a contaminação com subpopulações de linfócitos T ativados (R2). (C) Gráfico de distribuição puntual tamanho (FSC) versus FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas simultaneamente nas regiões “R1 and R2” para a seleção da população HLA-DR++, correspondente aos linfócitos B. (D) Histograma unidimensional de fluorescência FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas simultaneamente nas regiões “R1 and R2 and R3”, utilizado para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR por linfócitos B.

### 3 - Análises Estatísticas

O Teste *t* de Student foi utilizado para a comparação das médias de dois grupos de indivíduos, quando as variáveis estudadas apresentavam distribuições gaussianas ou normais, denominados dados paramétricos com desvios-padrões semelhantes. Em situações em que as variáveis de interesse apresentavam um comportamento não gaussiano, ou distribuição não-normal, denominados de dados não paramétricos, o teste de Mann-Whitney foi empregado para a comparação das medianas. A determinação da normalidade da distribuição dos valores individuais para cada variável bem como as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPadPrism (GraphPad Software Inc.), versão 3.0.

Para a análise comparativa entre três grupos, empregou-se a análise de variância (ANOVA), seguida da comparação múltipla pelo teste de Tukey para dados que apresentavam distribuições gaussianas ou normais, denominados dados paramétricos com desvios-padrões semelhantes. O teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's foi utilizado para análises de dados que apresentavam um comportamento não gaussiano, ou distribuição não-normal, denominados de dados não paramétricos.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

**Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa na Leishmaniose Tegumentar Americana**

---

**RESULTADOS**

**1- Aspectos fenotípicos de células envolvidas na imunidade inata: ênfase em monócitos e neutrófilos**

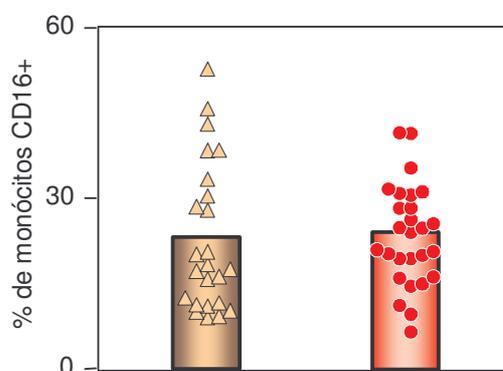
## I - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes:

### A - Frequência de “macrófagos - like” (CD16+)

A avaliação do percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos como ilustrado em Material e Métodos.

Os resultados do percentual de monócitos CD16+ na população de monócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados estão representados na FIG. 9.

A análise dos dados não mostrou diferença estatística significativa entre o grupo LCL e o grupo NI (NI=23,70%; LCL=24,06%).



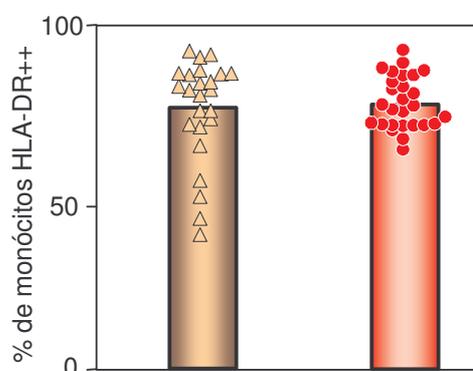
**Figura 9:** Percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de monócitos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD16 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) de monócitos CD16+ na população de monócitos.

*B - Freqüência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++)*

A avaliação do percentual de monócitos HLA-DR++ na população de monócitos do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos como ilustrado em Material e Métodos.

O percentual de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) na população de monócitos do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados está representado na FIG. 10.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença estatística significativa entre o grupo LCL e o grupo NI (NI=81,43%; LCL=83,62%).



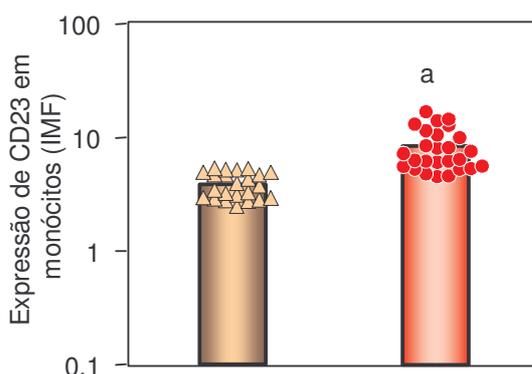
**Figura 10:** Percentual médio de monócitos pró inflamatórios (HLA-DR++) no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de monócitos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão representados como dispersão (símbolos) e a média (barras) de monócitos HLA-DR++ na população de monócitos.

### C - Expressão do receptor CD23 por monócitos

A expressão da molécula CD23 em monócitos do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica semi-quantitativa como ilustrado em Material e Métodos. Os monócitos foram inicialmente identificados através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica semi-quantitativa.

A FIG. 11 mostra os resultados da intensidade média de fluorescência da expressão da molécula CD23 em monócitos do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados. A análise dos dados revelou que o grupo LCL apresentou uma expressão maior ( $p < 0,05$ ) da molécula CD23, quando comparado ao grupo NI (NI=4,19; LCL=10,23).

Esses dados enfatizam a implicação da expressão do receptor CD23 por monócitos, e suscitam a importância de avaliar esse aspecto fenotípico no contexto de diferentes aspectos clínico-laboratoriais na LCL.



**Figura 11:** Análise da expressão da molécula CD23 em monócitos do sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de monócitos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os dados estão expressos sob forma de dispersão (símbolos) e a média (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão da molécula CD23 em monócitos. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

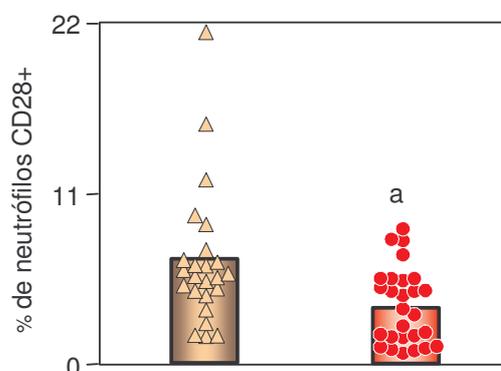
## II – Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes:

### A - Frequência de neutrófilos CD28+

A população de neutrófilos do sangue periférico foi avaliada através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG.12 apresenta o percentual de neutrófilos CD28+ na população de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos dados permitiu observar um percentual menor ( $p < 0,05$ ) de neutrófilos CD28+ no grupo LCL, quando comparado ao grupo NI (NI=6,74%; LCL=3,84%).



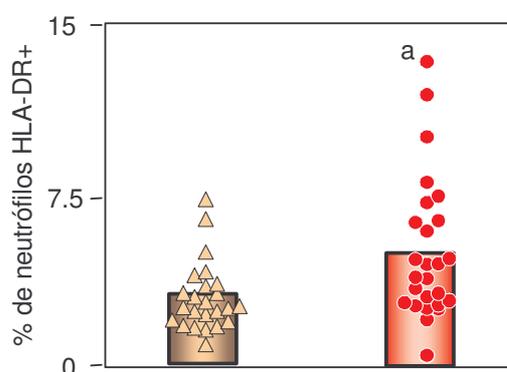
**Figura 12:** Percentual de neutrófilos CD28+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD28 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) de neutrófilos CD28+ na população de neutrófilos. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

### B - Freqüência de neutrófilos HLA-DR+

A população de neutrófilos do sangue periférico foi avaliada através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 13 apresenta o percentual de neutrófilos HLA-DR+ na população de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos dados mostrou que o grupo LCL apresentou um valor percentual de neutrófilos HLA-DR+ significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o grupo NI (NI=3,16%; LCL=4,98%).



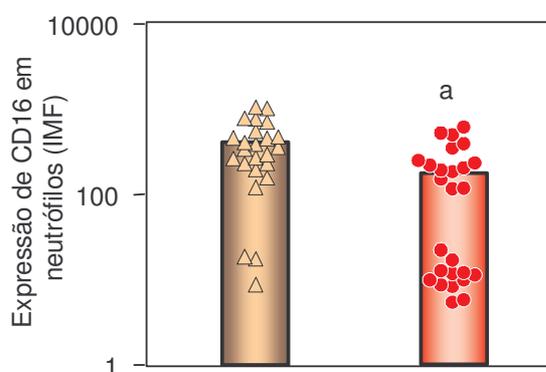
**Figura 13:** Percentual de neutrófilos HLA-DR+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) de neutrófilos HLA-DR+ na população de neutrófilos. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

*C - Densidade de expressão do receptor CD16 por neutrófilos*

A avaliação da expressão da molécula CD16 em neutrófilos do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica semi-quantitativa como ilustrado em Material e Métodos. Os neutrófilos foram inicialmente identificados através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica semi-quantitativa.

A FIG. 14 mostra os resultados da expressão da molécula CD16 por neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos resultados mostrou que os pacientes com LCL apresentaram uma expressão menor ( $p < 0,05$ ) dessa população, quando comparado ao grupo NI (NI=441,26; LCL=185,37).



**Figura 14:** Análise da expressão de CD16 em neutrófilos no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD16 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão e a média dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de CD16 por neutrófilos. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

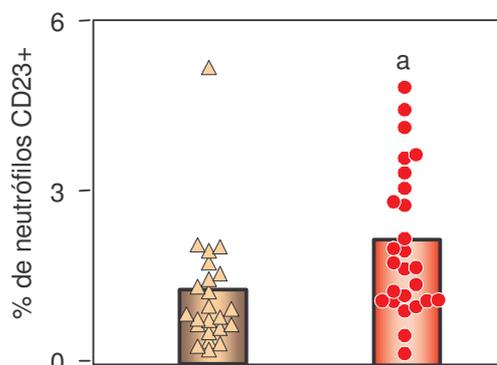
#### D - Freqüência de neutrófilos CD23+

A avaliação do percentual de neutrófilos CD23+ no sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 15 mostra os resultados do percentual de neutrófilos CD23+ na população de neutrófilos do sangue periférico, em pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos dados mostrou um percentual maior ( $p < 0,05$ ) de neutrófilos CD23+ no grupo LCL, em relação ao grupo NI (NI=1,35%; LCL=2,40%).

Em conjunto, nossos resultados mostram pela primeira vez, a importância de se avaliar a expressão de receptores por neutrófilos circulantes no contexto da LCL, incluindo os marcadores HLA-DR, CD28, CD23 e CD16, e sugerem a participação de células envolvidas na imunidade inata no âmbito da resposta imune durante a infecção por parasitos do sub-gênero *Viannia*. Nesse contexto, os resultados chamam a atenção para a importância de avaliar esse aspecto fenotípico no contexto de diferentes aspectos clínico-laboratoriais na LCL.



**Figura 15:** Percentual de neutrófilos CD23+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos através de dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) de neutrófilos CD23+ na população de neutrófilos. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

**2 - Aspectos fenotípicos de células envolvidas na imunidade adaptativa: ênfase em subpopulações linfocitárias**

## I - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes:

### *A - Frequência de subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+)*

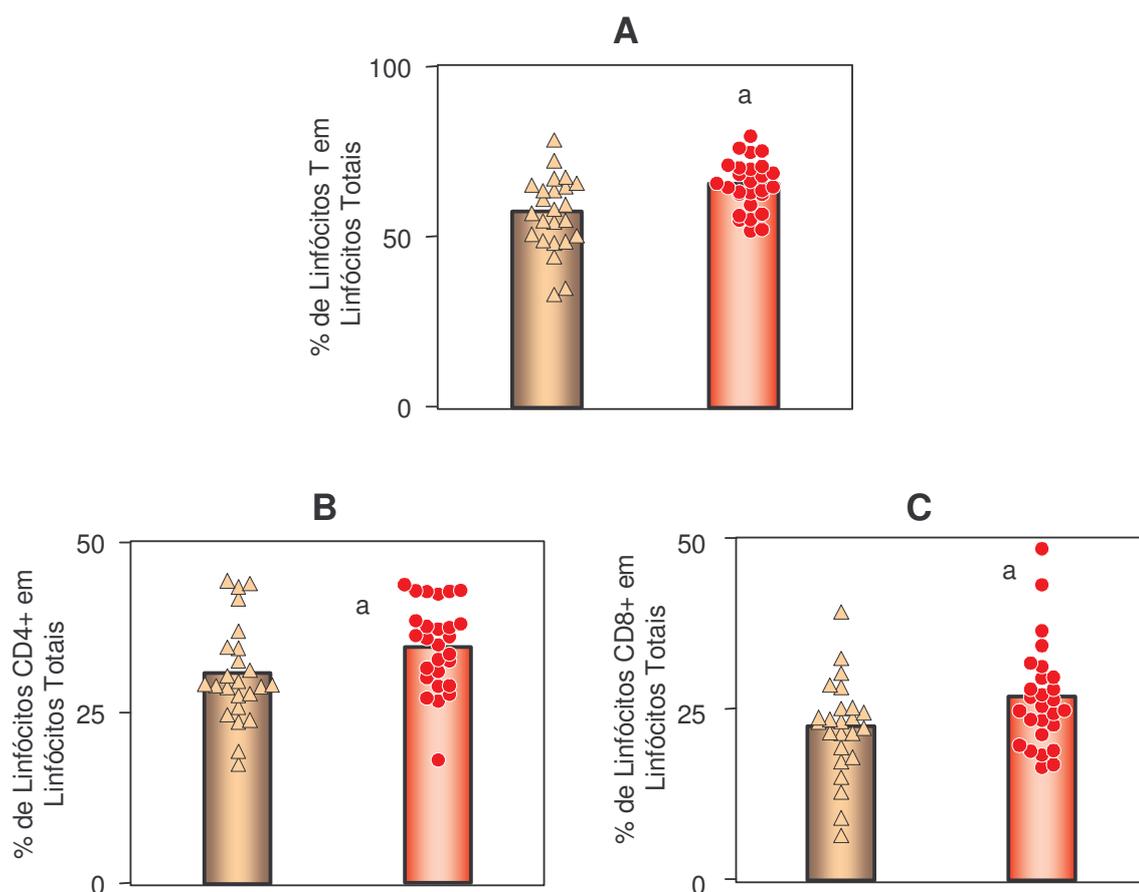
Para avaliar o percentual de linfócitos T totais (CD3+) do sangue periférico foi calculado a média dos valores de células CD3+ obtidos em análises paralelas, como descrito em Material e Métodos. A avaliação do percentual das subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) na população de linfócitos totais do sangue periférico foi realizada através de ensaios de dupla marcação e os resultados obtidos através da análise convencional como ilustrado em Material e Métodos.

Os resultados do percentual de linfócitos T totais (CD3+) do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados estão representados na FIG. 16A.

A análise dos resultados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram um percentual de linfócitos T CD3+ circulantes, significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo NI (NI=57,91%; LCL=65,98%).

As FIGs. 16B e 16C apresentam os resultados dos percentuais de linfócitos T CD4+ e CD8+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos resultados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram um percentual de linfócitos T CD4+ (NI=31,60%; LCL=35,62%) e T CD8+ (NI=23,34%; LCL=27,70%) significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo NI.



**Figura 16:** Percentual médio de linfócitos T (A), linfócitos T CD4+ (B) e linfócitos T CD8+ (C) circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). O percentual de linfócitos T totais foi calculado como a média dos valores de células CD3+ obtidos em análises paralelas. A população de linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi, inicialmente, identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T (A) e T CD4+ (B) e linfócitos T CD8+ (C) na população de linfócitos totais. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

*B - Freqüência de subpopulações de linfócitos T ativados (HLA-DR+)*

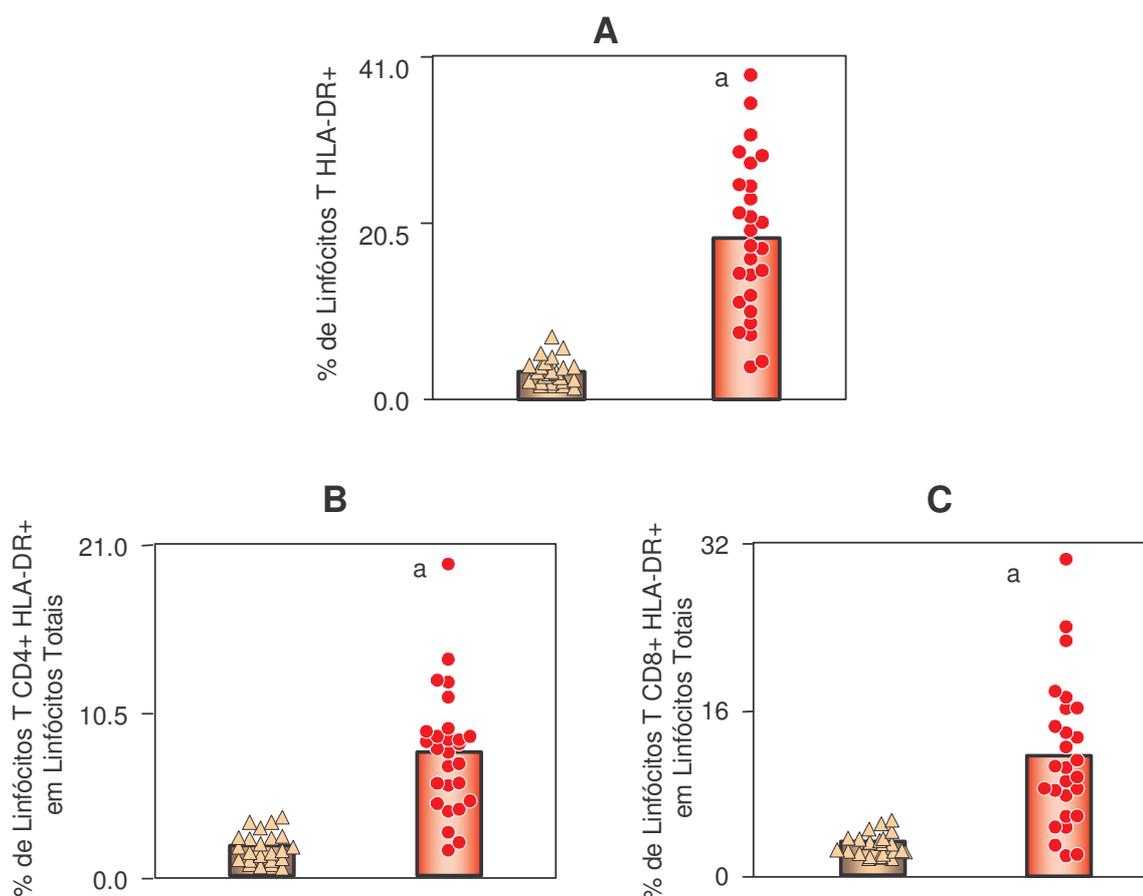
A avaliação do percentual das células T totais ativadas (HLA-DR+) no sangue periférico foi estimada através do somatório de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativados. A avaliação do percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativadas (HLA-DR+) do sangue periférico foi feita através de ensaios de dupla marcação, como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 17A mostra o percentual de linfócitos T totais ativados no sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos dados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram um percentual de linfócitos T HLA-DR+ significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado com os indivíduos não infectados (NI=3,75; LCL=20,34).

Os percentuais de linfócitos T CD4+ HLA-DR+ e T CD8+ HLA-DR+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados estão representados nas FIGs. 17B e 17C.

A análise dos dados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram um percentual de linfócitos T CD4+ HLA-DR+ (NI=1,97%; LCL=8,15%) e linfócitos T CD8+ HLA-DR+ (NI=1,78%; LCL=12,19%) significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado com os indivíduos não infectados.

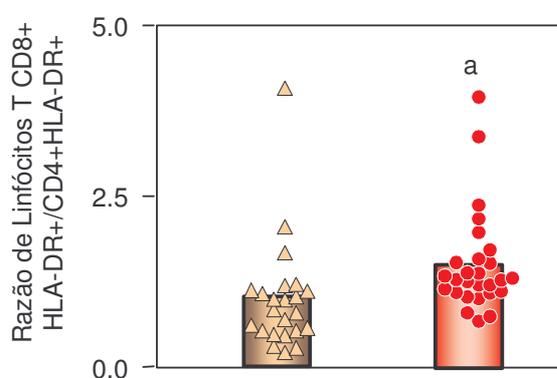


**Figura 17:** Percentual de linfócitos T totais HLA-DR+ (A), linfócitos T CD4+HLA-DR+ (B) e linfócitos T CD8+HLA-DR+ (C) circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (△). O percentual de linfócitos T totais ativados foi estimado através do somatório de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando o marcador HLA-DR. A população de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativados foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC e anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) de linfócitos T totais HLA-DR+ na população de linfócitos totais e das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativados nas populações de linfócitos totais. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

Visando investigar o balanço da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ durante a infecção por *Leishmania*, realizamos uma análise adicional da razão entre os valores percentuais de células CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+.

Os resultados da razão entre os linfócitos T CD8+ HLA-DR+ e T CD4+ HLA-DR+ no sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados estão representados na FIG. 18.

A análise dos dados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram uma razão CD8+HLA-DR+/CD4HLA-DR+ (NI=1,31%; LCL=1,55%) significativamente maior ( $p<0,05$ ) quando comparado com os indivíduos não infectados.



**Figura 18:** Razão entre linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). Os resultados estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e da razão de linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ (barras). A diferença estatística ( $p<0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

## II - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes:

### *A - Freqüência de subpopulações de linfócitos B (CD5- e CD5+)*

Para avaliar o percentual de linfócitos B e subpopulações de linfócitos B convencionais (CD19+CD5-) e linfócitos B1 (CD19+CD5+) na população de linfócitos totais do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e os resultados foram obtidos através da análise convencional, como ilustrado em Material e Métodos.

O percentual de linfócitos B (CD19+) na população de linfócitos totais do sangue periférico está representado na FIG. 19A.

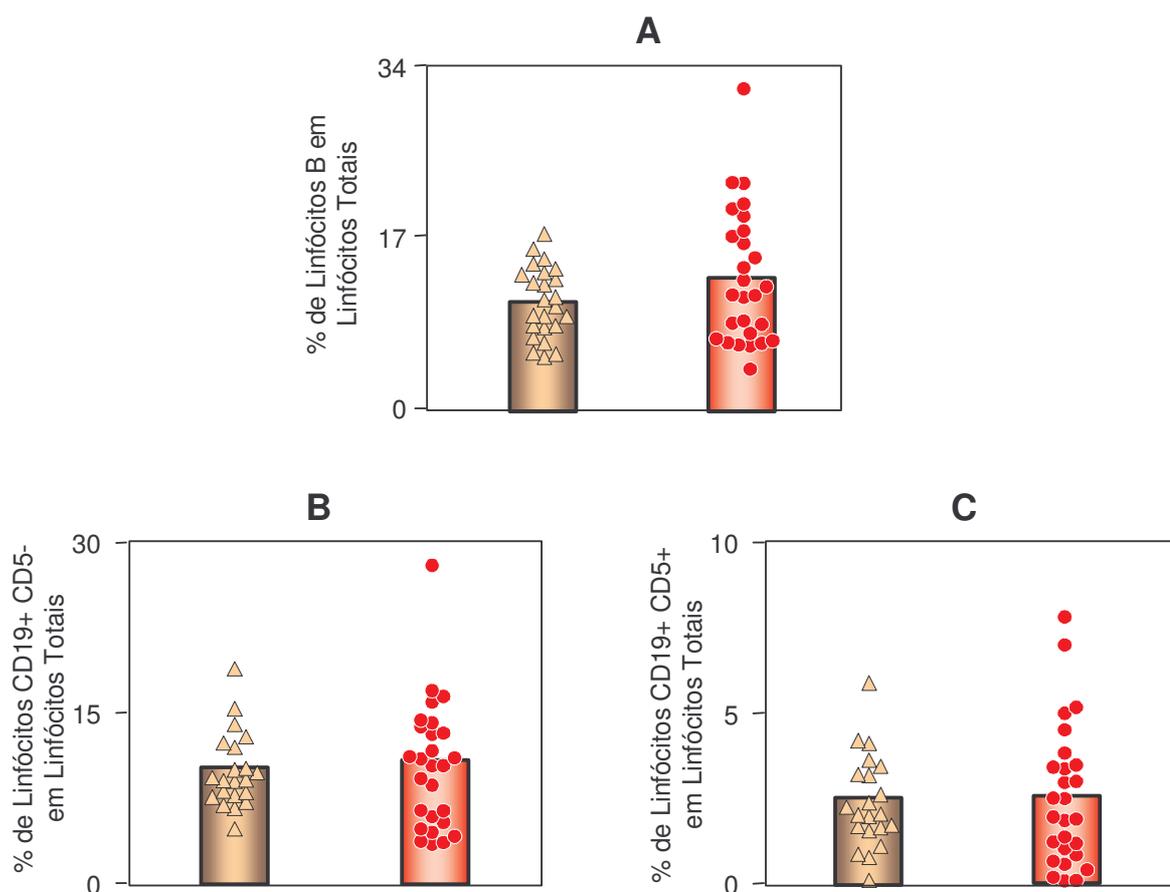
A análise dos dados não demonstrou diferença significativa na comparação de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados (NI=11,39%; LCL=13,78%).

Os resultados do percentual de linfócitos B convencionais (CD19+CD5-) na população de linfócitos totais do sangue periférico estão apresentados na FIG. 19B.

A análise dos dados demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com LCL e o grupo NI (NI=10,59%; LCL=10,93%).

A FIG. 19C apresenta os resultados do percentual de linfócitos B1 (CD19+CD5+) na população de linfócitos totais do sangue periférico.

A análise dos resultados não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com Leishmaniose Cutânea e o grupo NI (NI=2,57%; LCL=2,69%).



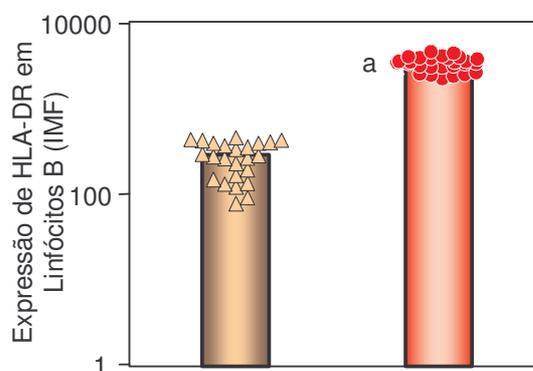
**Figura 19:** Percentual médio de linfócitos B totais CD19+ (A), B convencionais CD19+CD5- (B) e linfócitos B1 CD19+CD5+ (C) no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de linfócitos foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD5 marcados com FITC e anti-CD19 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) dos linfócitos B totais, B convencionais e linfócitos B1 na população de linfócitos totais.

### *B - Densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B*

A avaliação da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B na população de linfócitos totais do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica semi-quantitativa, como ilustrado em Material e Métodos. Os linfócitos foram inicialmente identificados através de aspectos morfométricos, seguida pela análise imunofenotípica semi-quantitativa.

A FIG.20 mostra os resultados da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos dados demonstrou uma expressão maior de HLA-DR<sup>+</sup> em linfócitos B no grupo LCL ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo NI (NI=306,00; LCL=3782,71).



**Figura 20:** Análise da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B circulantes do sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de linfócitos foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos sob forma de dispersão (símbolos) e a média (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

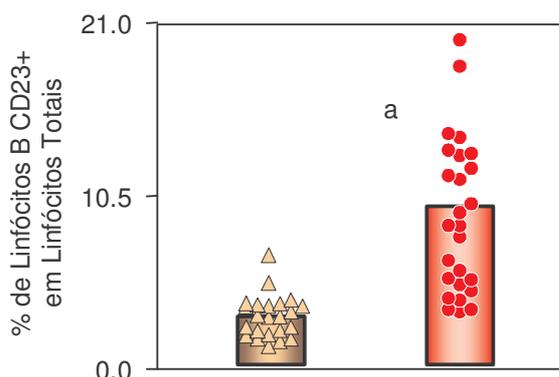
### C - Frequência de linfócitos B CD23+

Para avaliar a expressão da molécula CD23 em linfócitos B na população de linfócitos totais do sangue periférico foram feitos ensaios de dupla marcação, como descrito em Material e Métodos.

A FIG. 21 demonstra o percentual de linfócitos CD19+CD23+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados.

A análise dos dados revelou que o grupo LCL apresentou um percentual maior ( $p < 0,05$ ) de linfócitos B CD23+, em relação ao grupo NI (NI=2,16%; LCL=9,99%).

Em suma, nossos dados referentes aos aspectos imunofenotípicos de linfócitos T e B reforçam os relatos do estabelecimento de mecanismos de imunidade celular e humoral durante a infecção por *Leishmania*. Dessa forma, torna-se relevante avaliar a participação seletiva de subpopulações celulares nesse contexto, considerando diferentes aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de LCL.



**Figura 21:** Percentual de linfócitos CD19+CD23+ no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada (●) e de indivíduos não infectados NI (△). As populações celulares foram marcadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com FITC e anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos através de dispersão dos valores individuais (símbolos) e média percentual (barras) de linfócitos CD19+CD23+ na população de linfócitos totais. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

**Balanco da resposta imune na LCL:**

Visando investigar o balanço do envolvimento da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania*, realizamos uma análise adicional da razão entre os valores absolutos de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células CD19+CD23+ por mm<sup>3</sup> de sangue (DECKER et al., 2003).

Os resultados da razão entre os valores absolutos de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células B CD23+ no sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados estão representados na FIG. 22A.

A análise dos dados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células B CD23+ significativamente menor ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=22,96; LCL=3,46).

Numa outra abordagem, calculamos a razão entre os valores absolutos de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células CD8+HLA-DR+ por mm<sup>3</sup> de sangue. Os resultados dessa razão estão representados na FIG. 22B.

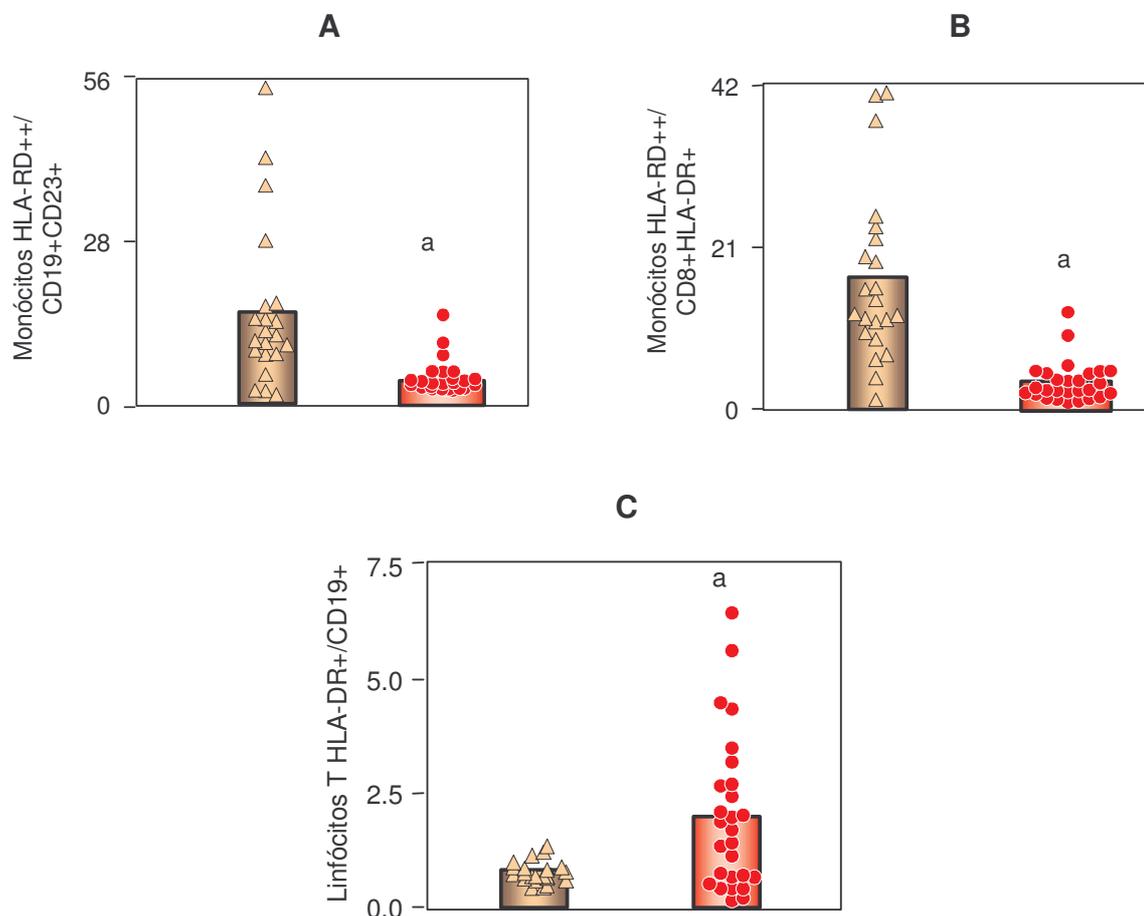
A análise dos dados demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e CD8+HLA-DR+ significativamente menor ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=23,65; LCL=2,96).

A fim de avaliar o balanço da resposta imune celular e humoral, calculamos a razão entre linfócitos T totais ativados e linfócitos B totais no sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados. A FIG. 22C apresenta os resultados dessa razão.

A análise dos resultados revelou que os indivíduos infectados apresentam uma razão entre linfócitos T totais ativados e linfócitos B totais, significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=0,37%; LCL=2,07%).

Em conjunto, esses dados relativos ao balanço da resposta imune inata em relação à imunidade adaptativa celular e humoral sugerem um papel importante da imunidade adaptativa na LCL. Entretanto, considerando os achados referentes aos aspectos imunofenotípicos de linfócitos T e Linfócitos B, demonstrados nesse estudo, acreditamos na importância de uma avaliação mais detalhada da participação seletiva

de subpopulações celulares nesse contexto, considerando diferentes aspectos clínico-laboratoriais do pacientes portadores de LCL.



**Figura 22:** Razão entre Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD19+CD23+ (A), Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD8+HLA-DR+ (B) e Linfócitos T HLA-DR+/CD19+ circulantes (C) no sangue periférico de indivíduos com Leishmaniose Cutânea Localizada LCL (●) e de indivíduos não infectados NI (▲). Os resultados das razões entre a resposta imune inata e adaptativa (A e B) foram calculados empregando-se os valores absolutos de células/mm<sup>3</sup> de sangue enquanto os resultados da razão entre a resposta imune celular e humoral foram calculados empregando-se os valores percentuais de células na população de linfócitos totais. Os resultados estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) da razão de Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD19+CD23+, Monócitos HLA-DR+/Linfócitos T CD8+HLA-DR+ e Linfócitos T CD3+HLA-DR+/Linfócito B total. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

**3 - Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa: ênfase no número e tempo das lesões e na positividade da intradermorreação de Montenegro**

Durante a infecção por parasitos do sub-gênero *Viannia*, diversos aspectos clínico-laboratoriais tornam-se evidentes e sugerem sua possível utilização como indicadores importantes de aspectos inerentes à patogenia e à morbidade na LCL. Nesse contexto, selecionamos dois parâmetros clínicos e um parâmetro laboratorial que consideramos de interesse e com impacto importante nos aspectos imunológicos da LCL, como relatados a seguir, incluindo: número e tempo das lesões e a positividade da intradermorreação de Montenegro. Dessa forma, os pacientes portadores de LCL incluídos nesse estudo foram categorizados em função desses aspectos clínico-laboratoriais e procedemos a análises subseqüentes dos imunofenótipos previamente relatados em nosso estudo.

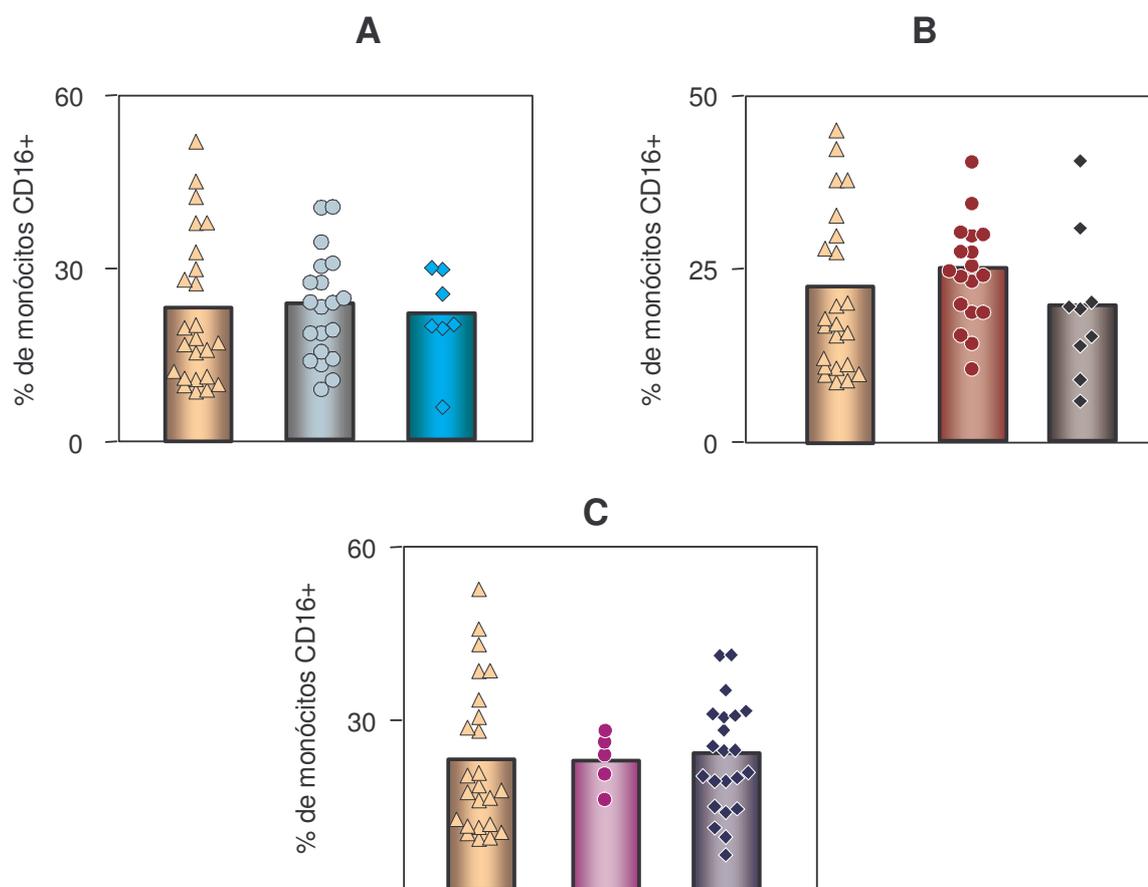
### **I - Aspectos fenotípicos de monócitos circulantes:**

#### *A - Freqüência de “macrófagos - like” (CD16+)*

A avaliação do percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos, como ilustrado em Material e Métodos.

Os resultados do percentual de monócitos CD16+ na população de monócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, estão representados na FIG. 23.

A análise dos dados não mostrou diferença estatística significativa entre os subgrupos de pacientes portadores de LCL em relação ao grupo NI (NI=23,70%; LCL-1=24,38%; LCL-2-4=22,87%; LCL≤60=25,75%; LCL>60=20,68%; LCL-TM-=23,64%; LCL-TM+=24,06%).



**Figura 23:** Percentual de monócitos CD16+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de monócitos circulantes foi identificada através de aspectos morfológicos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD16 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) de monócitos CD16+ na população de monócitos.

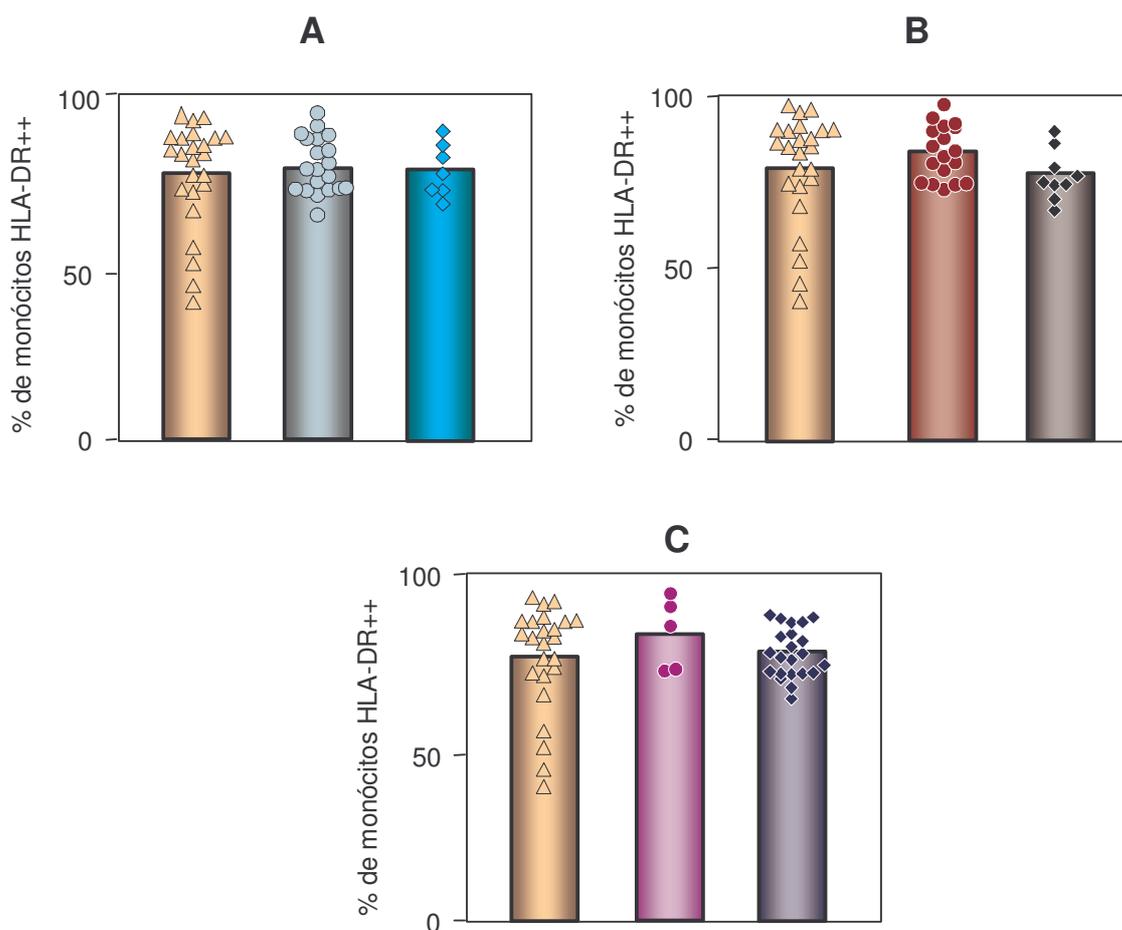
---

*B - Frequência de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++)*

A avaliação do percentual de monócitos HLA-DR++ na população de monócitos do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos, como ilustrado em Material e Métodos.

O percentual de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) na população de monócitos do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, estão representados na FIG. 24

A análise dos dados não mostrou diferença estatística significativa entre os subgrupos de pacientes portadores de LCL em relação ao grupo NI (NI=81,43%; LCL-1=84,01%; LCL-2-4=82,49%; LCL≤60=85,85%; LCL>60=79,15%; LCL-TM-=87,85%; LCL-TM+=82,65%).



**Figura 24:** Percentual de monócitos pró-inflamatórios HLA-DR++ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de monócitos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão representados como dispersão (símbolos) e a média (barras) de monócitos HLA-DR++ na população de monócitos.

---

*C - Expressão do receptor CD23 por monócitos*

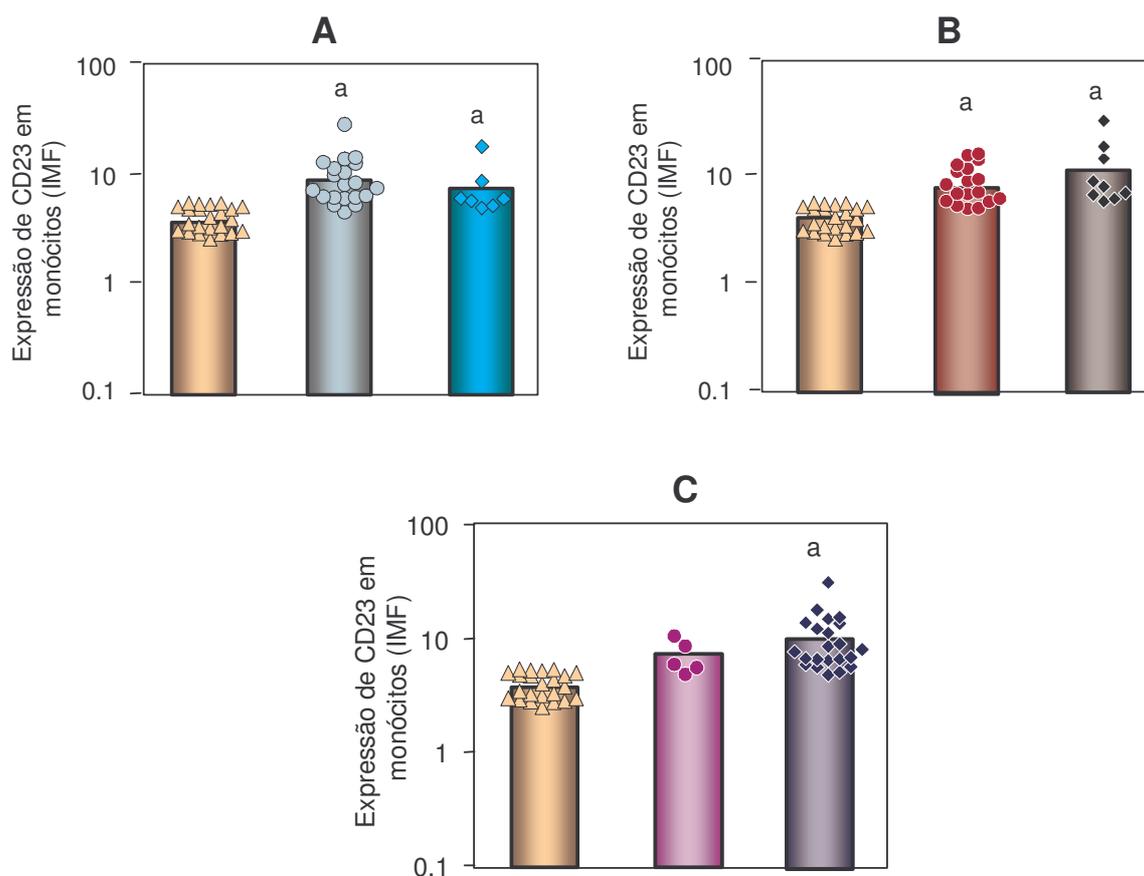
A expressão de CD23 em monócitos na população de monócitos do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica semi-quantitativa, como ilustrado em Material e Métodos. Os monócitos foram inicialmente identificados através de aspectos morfométricos, seguida pela análise imunofenotípica semi-quantitativa.

Os resultados da intensidade média de fluorescência da expressão da molécula CD23 em monócitos do sangue periférico de pacientes, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, estão representados na FIG. 25.

A análise dos dados revelou que os grupos LCL-1, LCL- 2-4, LCL≤60 e LCL >60 apresentaram uma expressão maior ( $p<0,05$ ) da molécula CD23 em monócitos, quando comparado ao grupo NI (NI=4,19; LCL-1=10,95; LCL-2-4=8,20; LCL≤60=9,20; LCL>60=12,31).

A análise dos resultados mostrou ainda que apenas grupo LCL-TM+ apresentou uma maior ( $p<0,05$ ) expressão de CD23 em relação ao grupo NI (NI=4,19; LCL-TM-=7,58; LCL-TM+=10,84).

Esses achados enfatizam a implicação da expressão do receptor CD23 por monócitos, inerente ao contexto da LCL, independente dos aspectos clínico-laboratoriais do paciente, com exceção da positividade no TM.



**Figura 25:** Análise da expressão da molécula CD23 em monócitos no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de monócitos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os dados estão expressos sob forma de dispersão (símbolos) e a média (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão da molécula CD23 em monócitos. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

## II – Aspectos fenotípicos de neutrófilos circulantes:

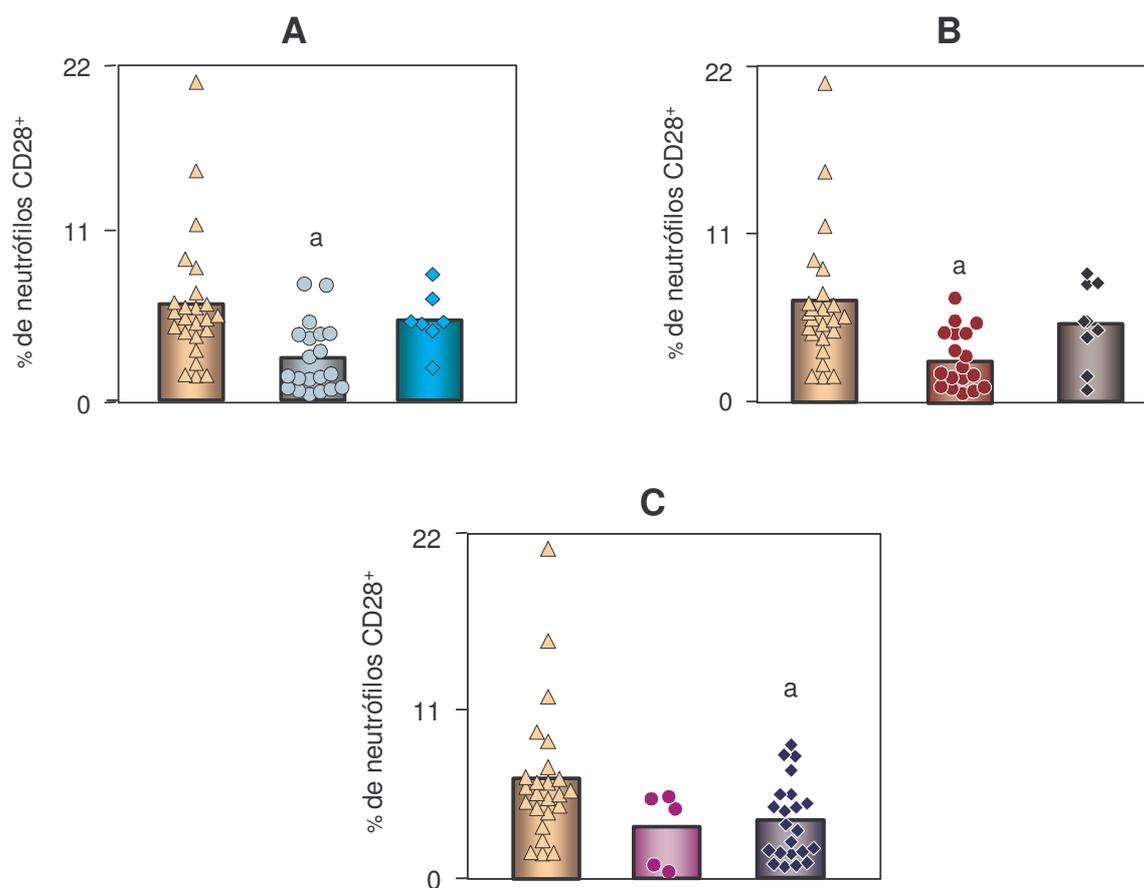
### *A - Freqüência de neutrófilos CD28+*

A avaliação do percentual de neutrófilos CD28+ no sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos, como ilustrado em Material e Métodos.

Os resultados do percentual de neutrófilos CD28+ na população de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, estão representados na FIG. 26.

A análise dos dados mostrou que apenas os grupos LCL-1, LCL≤60 e LCL-TM+ apresentam um percentual menor ( $p < 0,05$ ) de neutrófilos CD28+, quando comparados ao grupo NI (NI=6,74%; LCL-1=3,18%; LCL-2-4=5,74%; LCL≤60=3,06%; LCL>60=5,41%; LCL-TM-=3,59%; LCL-TM+=3,90%).

Esses achados sugerem a participação precoce de células envolvidas na imunidade inata no âmbito da resposta imune durante a infecção por parasitos do subgênero *Viannia*, quando analisamos os subgrupos LCL≤60 e LCL>60.



**Figura 26:** Percentual de neutrófilos CD28<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60, LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfológicos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD28 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os dados estão expressos sob forma de dispersão (símbolos) e a média (barras) de neutrófilos CD28<sup>+</sup> na população de neutrófilos. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

---

### *B - Freqüência de neutrófilos HLA-DR+*

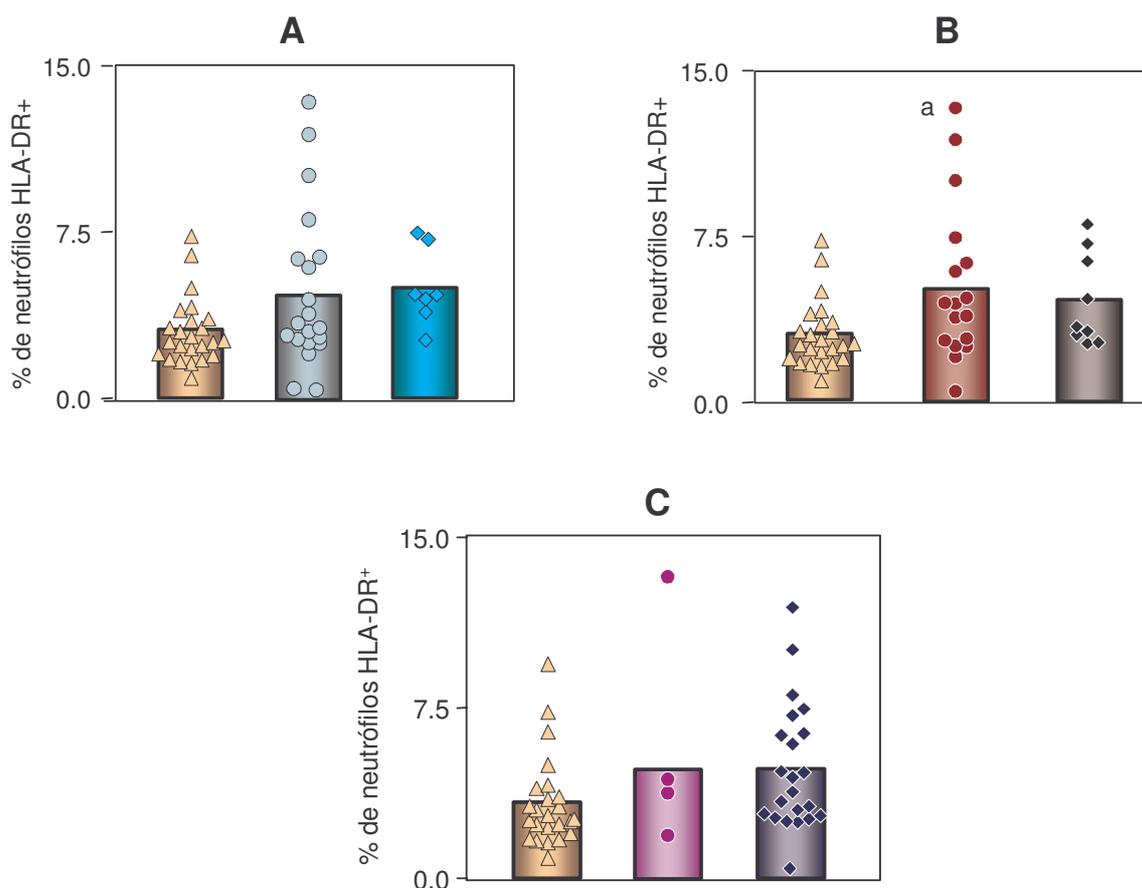
A população de neutrófilos do sangue periférico foi avaliada através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos, como ilustrado em Material e Métodos.

Os resultados do percentual de neutrófilos HLA-DR+ na população de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, estão representados na FIG. 27.

A análise dos resultados revelou que apenas o grupo LCL≤60 dias apresenta um valor percentual de neutrófilos HLA-DR+ significativamente maior ( $p<0,05$ ), em relação ao grupo NI (NI=3,16%; LCL≤60=5,11%; LCL>60=4,72%).

A análise dos resultados não demonstrou diferença estatística na análise dos resultados entre os grupos LCL-1, LCL-2-4, LCL-TM- e LCL-TM+, em relação ao grupo NI (NI=3,16%; LCL-1=4,92%; LCL-2-4=5,14%; LCL-TM-=4,87%; LCL-TM+=5,00%).

Esses resultados reforçam o envolvimento precoce de células associadas à imunidade inata no âmbito da resposta imune durante a infecção por parasitos do subgênero *Viannia*, quando analisamos os subgrupos LCL≤60 e LCL>60.



**Figura 27:** Percentual de neutrófilos HLA-DR+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfológicos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os dados estão expressos sob forma de dispersão (símbolos) e a média (barras) de neutrófilos HLA-DR+ na população de neutrófilos. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

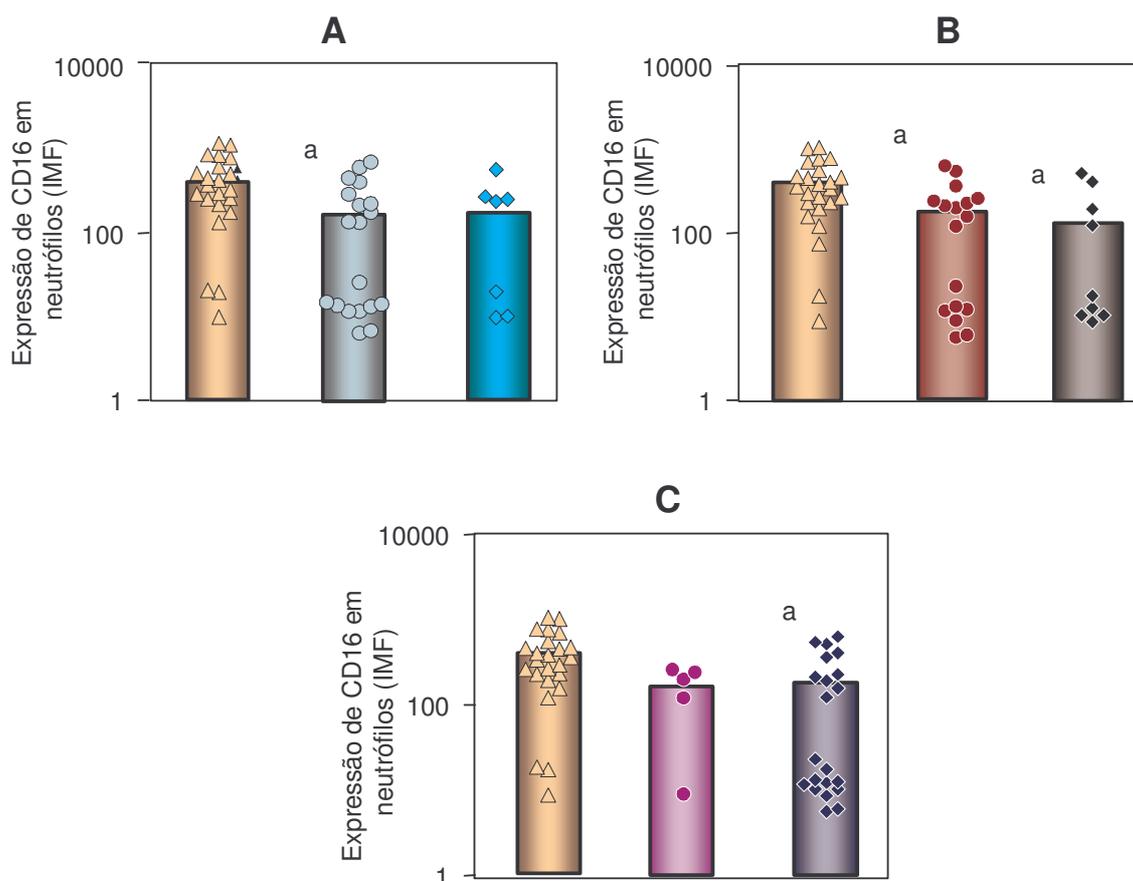
*C - Densidade de expressão do receptor CD16 por neutrófilos*

A avaliação da expressão da molécula CD16 em neutrófilos do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica semi-quantitativa, como ilustrado em Material e Métodos. Os neutrófilos foram inicialmente identificados através de aspectos morfométricos, seguida pela análise imunofenotípica semi-quantitativa.

A FIG. 28 mostra os resultados da expressão de CD16 por neutrófilos na população de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

Foi demonstrada através das análises dos dados uma menor expressão de CD16 nos neutrófilos ( $p < 0,05$ ) nos grupos LCL-1, LCL $\leq$ 60, LCL $>$ 60 e LCL-TM+, quando comparado ao grupo NI (NI=441,26; LCL-1=181,56; LCL-2-4=195,72; LCL $\leq$ 60=198,83; LCL $>$ 60=159,95; LCL-TM-=184,83; LCL-TM+=185,50).

Esses dados sugerem o envolvimento da interface entre a resposta imune celular inata e a resposta imune adaptativa via imunocomplexos no contexto da resposta imune durante a infecção por parasitos do sub-gênero *Viannia*, preferencialmente nos eventos mais tardios, quando analisamos os subgrupos LCL $\leq$ 60 e LCL $>$ 60.



**Figura 28:** Análise da expressão de CD16 em neutrófilos no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD16 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão e a média dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de CD16 por neutrófilos. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

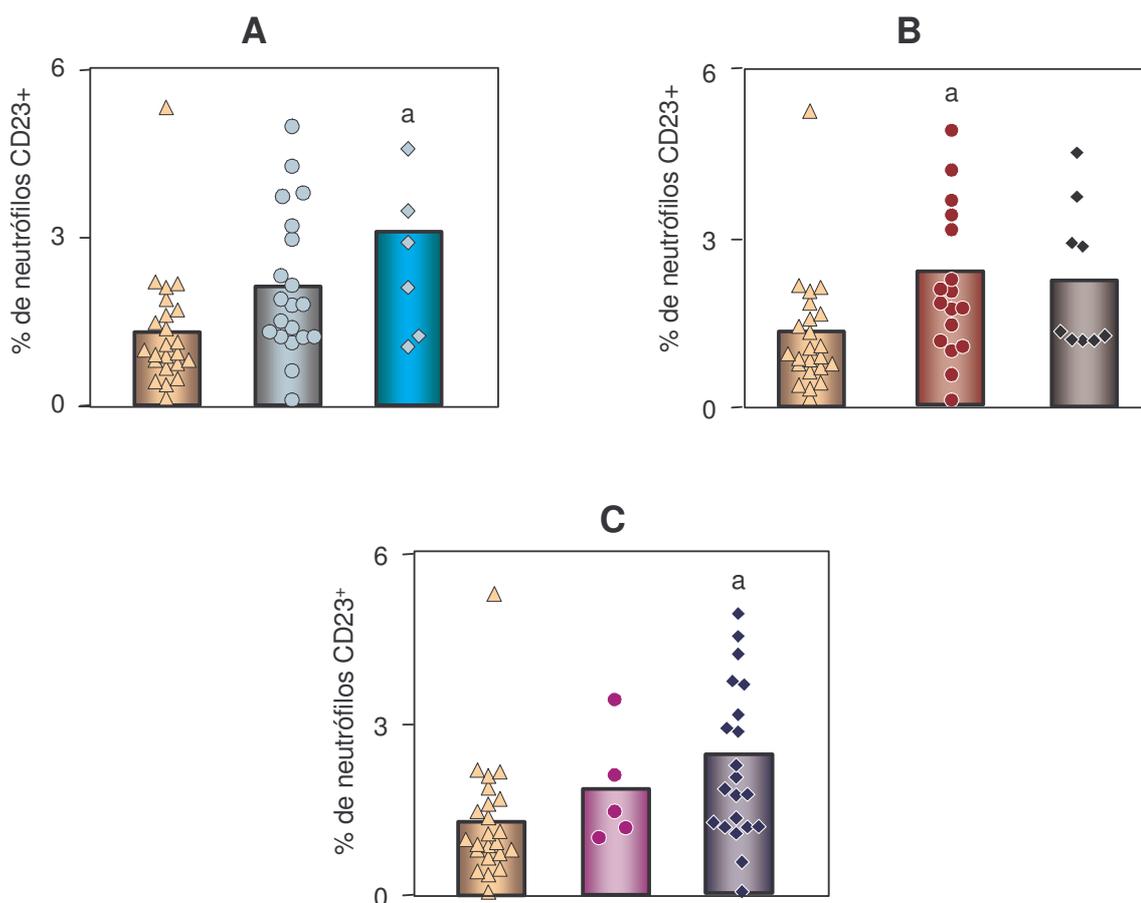
*D - Freqüência de neutrófilos CD23+*

A avaliação do percentual de neutrófilos CD23+ no sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica específica baseada em parâmetros morfométricos e imunofenotípicos, como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 29 mostra os resultados do percentual de CD23 por neutrófilos na população de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

Foi observado, através das análises dos resultados, um maior percentual de neutrófilos CD23+ ( $p < 0,05$ ) nos grupos LCL-2-4, LCL $\leq$ 60 e LCL-TM+, quando comparado ao grupo NI (NI=1,35%; LCL-1=2,17%; LCL-2-4=3,09%; LCL $\leq$ 60=2,44%; LCL $>$ 60=2,33%; LCL-TM-=3,59%; LCL-TM+=3,90%).

Novamente, os resultados confirmam a presença precoce de células relacionadas à imunidade inata no âmbito da resposta imune durante a infecção, sugerindo uma queda na participação dos neutrófilos nos eventos mais tardios, quando analisamos os subgrupos LCL $\leq$ 60 e LCL $>$ 60.



**Figura 29:** Percentual de neutrófilos CD23+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de neutrófilos circulantes foi identificada através de aspectos morfométricos e imunofenotípicos utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio de neutrófilos CD23+. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com os grupos NI.

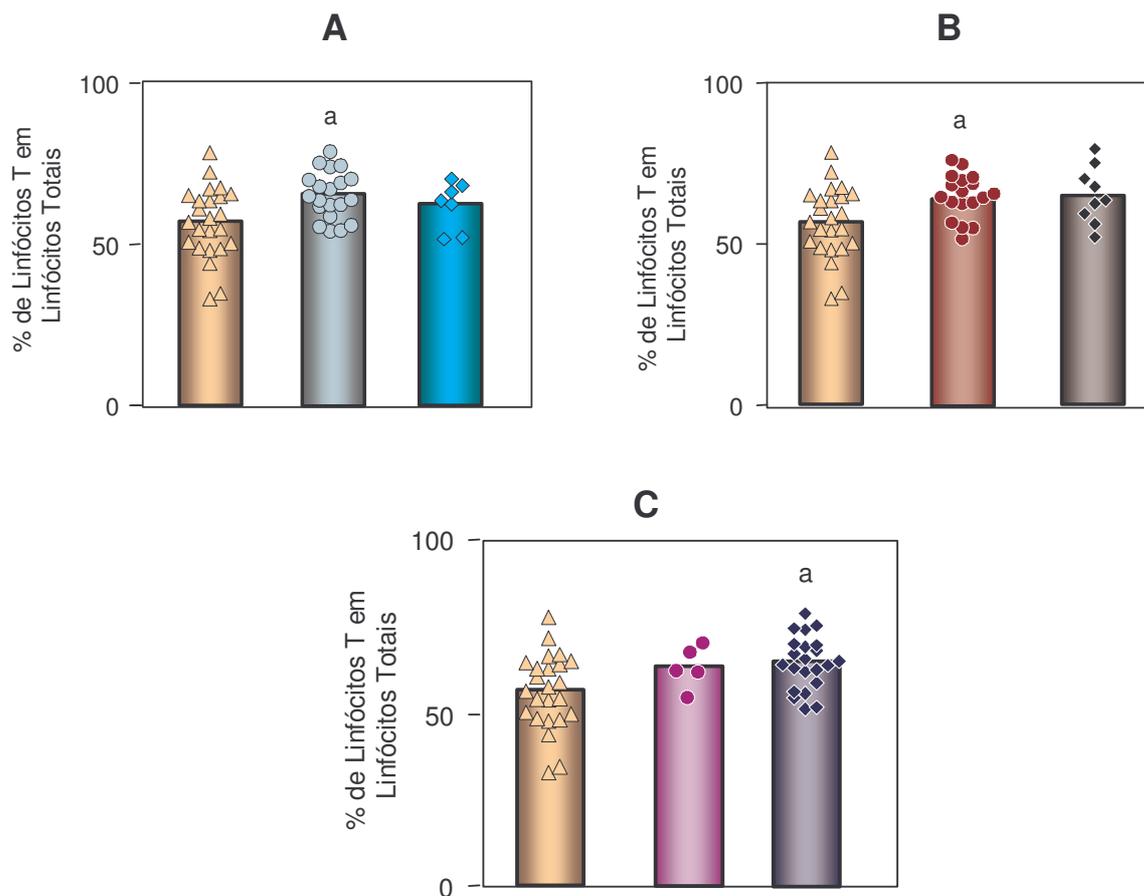
### III - Aspectos fenotípicos de linfócitos T circulantes:

#### *A - Freqüência de subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+)*

O percentual de linfócitos T totais (CD3+) do sangue periférico foi calculado como a média dos valores de células CD3+ obtidos em análises paralelas, como descrito em Material e Métodos.

A FIG. 30 mostra os resultados do percentual de linfócitos T totais (CD3+) do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos resultados demonstrou que os grupos LCL-1, LCL $\leq$ 60 e LCL-TM+ apresentam maior ( $p < 0,05$ ) percentual de linfócitos T CD3+ circulantes quando comparado ao grupo NI (NI=57,91%; LCL-1=66,97%; LCL-2-4=63,13%; LCL $\leq$ 60=65,87%; LCL>60=66,19%; LCL-TM-=64,99%; LCL-TM+=66,20%).



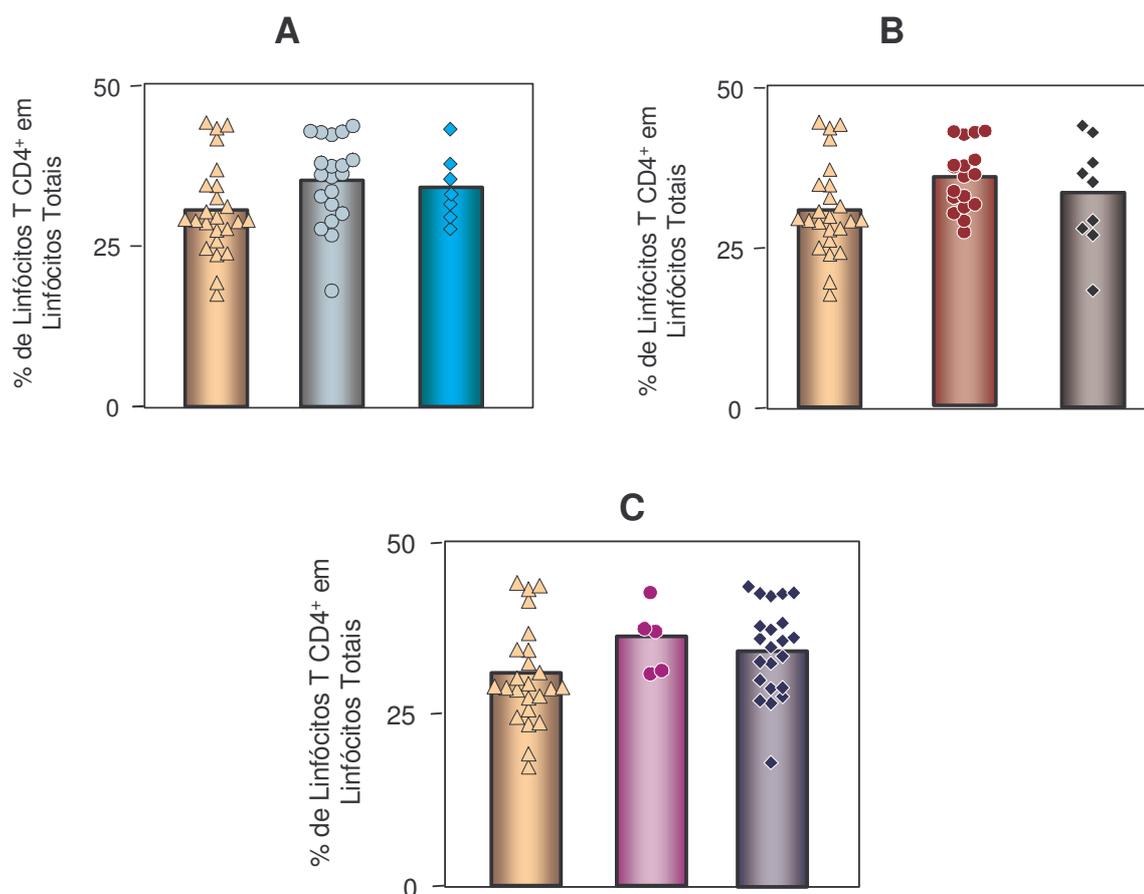
**Figura 30:** Percentual médio de linfócitos T circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). O percentual de linfócitos T totais foi calculado como a média dos valores de células CD3+ obtidos em análises paralelas. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

---

Para avaliar o percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+ na população de linfócitos totais do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e os resultados obtidos através da análise convencional, como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 31 apresenta os resultados dos percentuais de linfócitos T CD4+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos resultados não revelou diferença estatística significativa para o percentual de linfócitos T CD4+, entre os subgrupos de pacientes portadores de LCL, em relação ao grupo NI (NI=31,60%; LCL-1=36,06%; LCL-2-4=34,38%; LCL≤60=36,50%; LCL>60=33,88%; LCL-TM-=36,94%; LCL-TM+=35,33%).

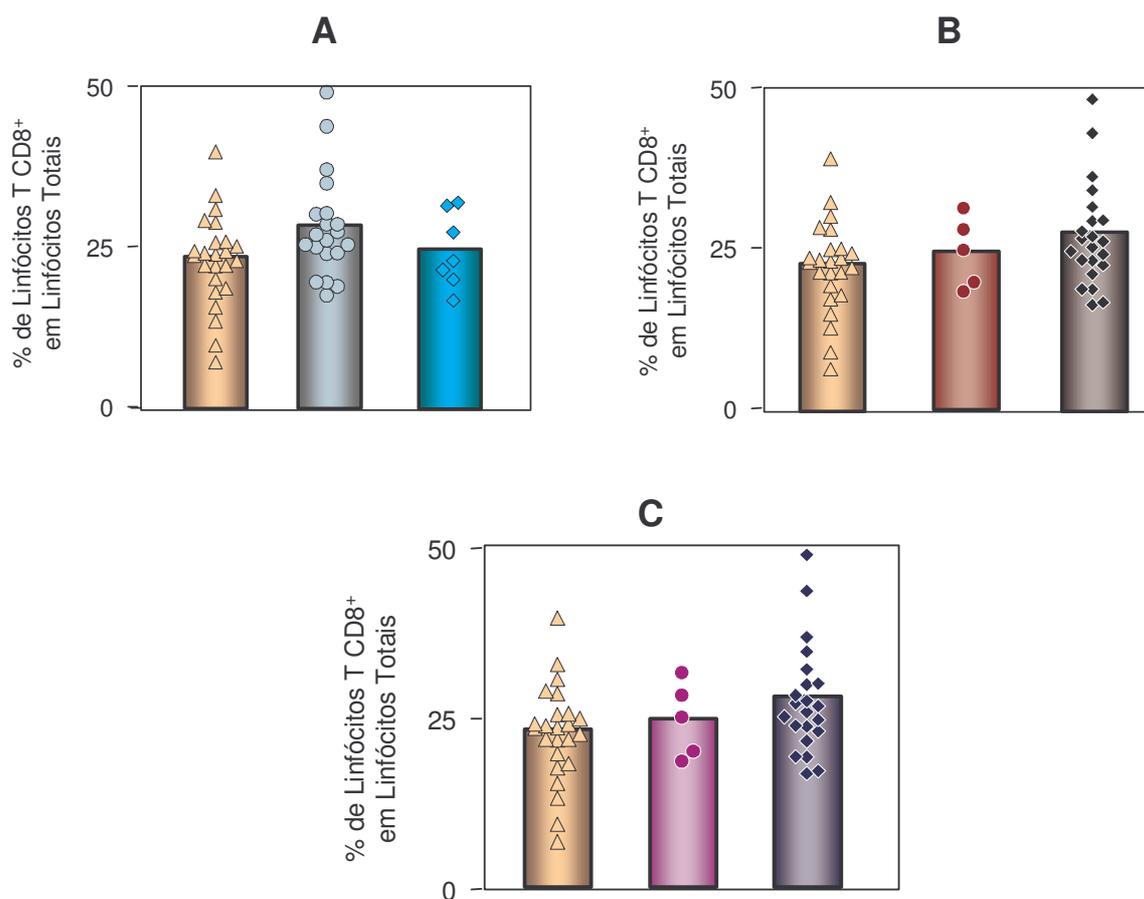


**Figura 31:** Percentual médio de linfócitos T CD4+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de linfócitos foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD4 marcado com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T CD4+ na população de linfócitos totais.

Para avaliar o percentual das subpopulações de linfócitos T CD8+ na população de linfócitos totais do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e os resultados obtidos através da análise convencional, como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 32 apresenta os resultados dos percentuais de linfócitos T CD8+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos dados mostrou ausência de diferença estatística significativa para o percentual de linfócitos T CD8+, entre os subgrupos de pacientes portadores de LCL, em relação ao grupo NI (NI=23,34%; LCL-1=28,52%; LCL-2-4=25,35%; LCL≤60=26,65%; LCL>60=29,80%; LCL-TM-=25,42%; LCL-TM+=28,22%).



**Figura 32:** Percentual médio de linfócitos T CD8+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de linfócitos foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD8 marcado com FITC e anti-CD3 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T CD8+ na população de linfócitos totais.

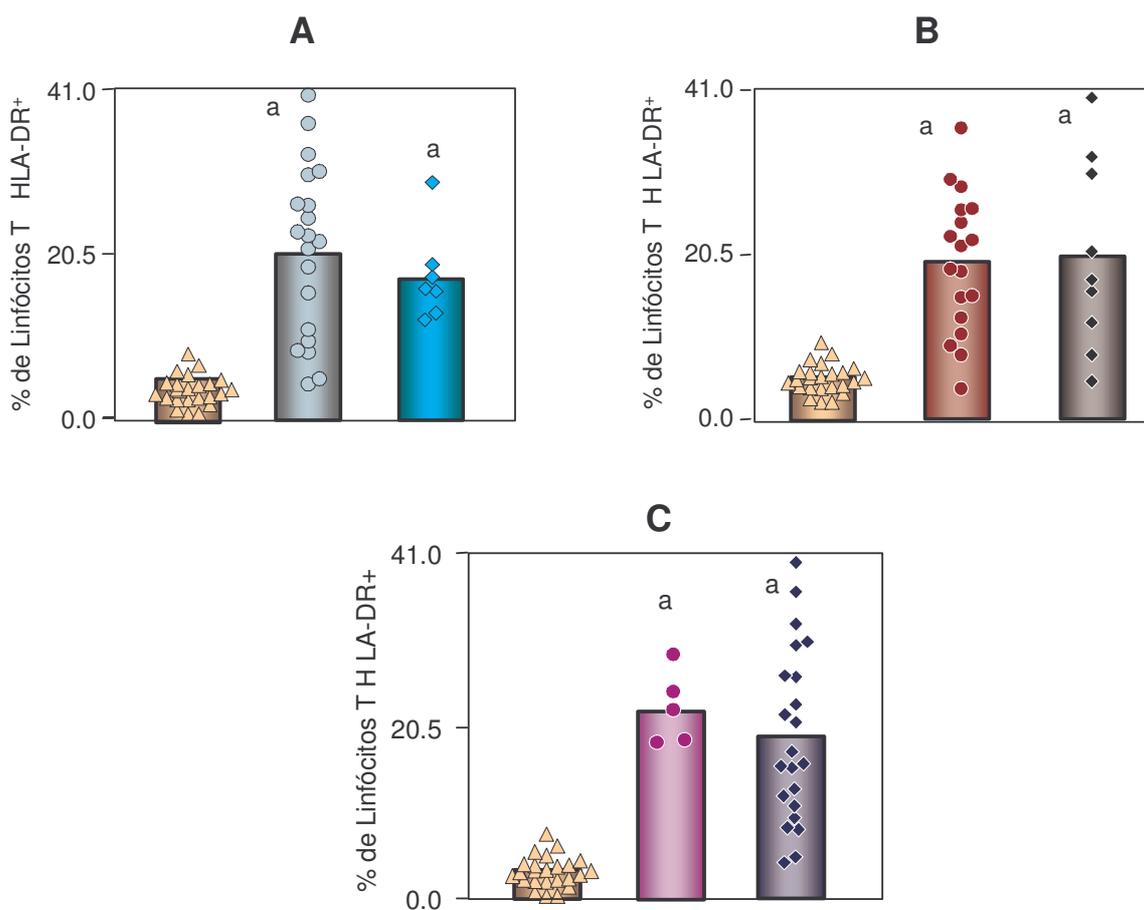
*B - Freqüência de subpopulações de linfócitos T ativados (HLA-DR+)*

A avaliação do percentual das células T totais ativadas (HLA-DR+) no sangue periférico foi estimada através do somatório de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativados.

A FIG. 33 mostra os percentuais de linfócitos T totais ativados no sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos dados demonstrou que todos os subgrupos de pacientes portadores de LCL apresentam um percentual de linfócitos T HLA-DR+ significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=3,75%; LCL-1=21,20%; LCL-2-4=17,87%; LCL $\leq$ 60=20,16%; LCL>60=20,69%; LCL-TM-=23,26%; LCL-TM+=19,67%).

Esses dados reforçam os relatos do estabelecimento de mecanismos de imunidade celular durante a infecção *Leishmania*, independente dos aspectos clínico-laboratoriais do paciente. Dessa forma, torna-se relevante avaliar a participação seletiva de subpopulações celulares nesse contexto.



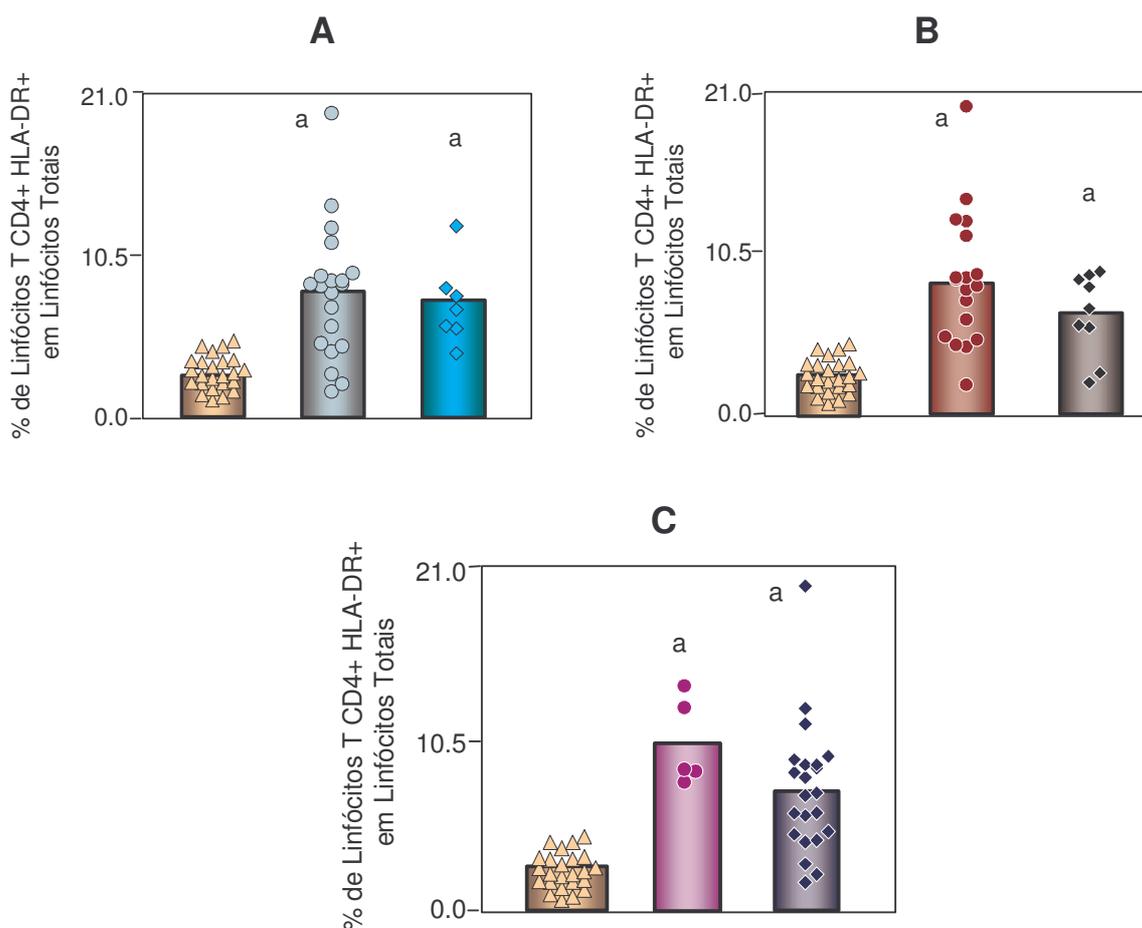
**Figura 33:** Percentual médio de linfócitos T totais HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲).O percentual de linfócitos T totais ativados foi estimado através do somatório de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando o marcador HLA-DR. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T CD8+ na população de linfócitos totais. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

---

A avaliação do percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+ ativados (HLA-DR+) do sangue periférico foi feita através de ensaios de dupla marcação, como ilustrado em Material e Métodos.

Os resultados dos percentuais de linfócitos T CD4+ HLA-DR+ no sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, estão apresentados na FIG. 34.

A análise dos dados demonstrou que todos os subgrupos de pacientes LCL apresentam um percentual de linfócitos T CD4+ HLA-DR+ significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=1,97%; LCL-1=8,32%; LCL-2-4=7,64%; LCL $\leq$ 60=8,78%; LCL>60=6,89%; LCL-TM-=10,54%; LCL-TM+=7,60%). De forma interessante, observa-se que os grupos LCL $\leq$ 60 e LCL-TM- apresentam os valores mais elevados de ativação de células T CD4+.



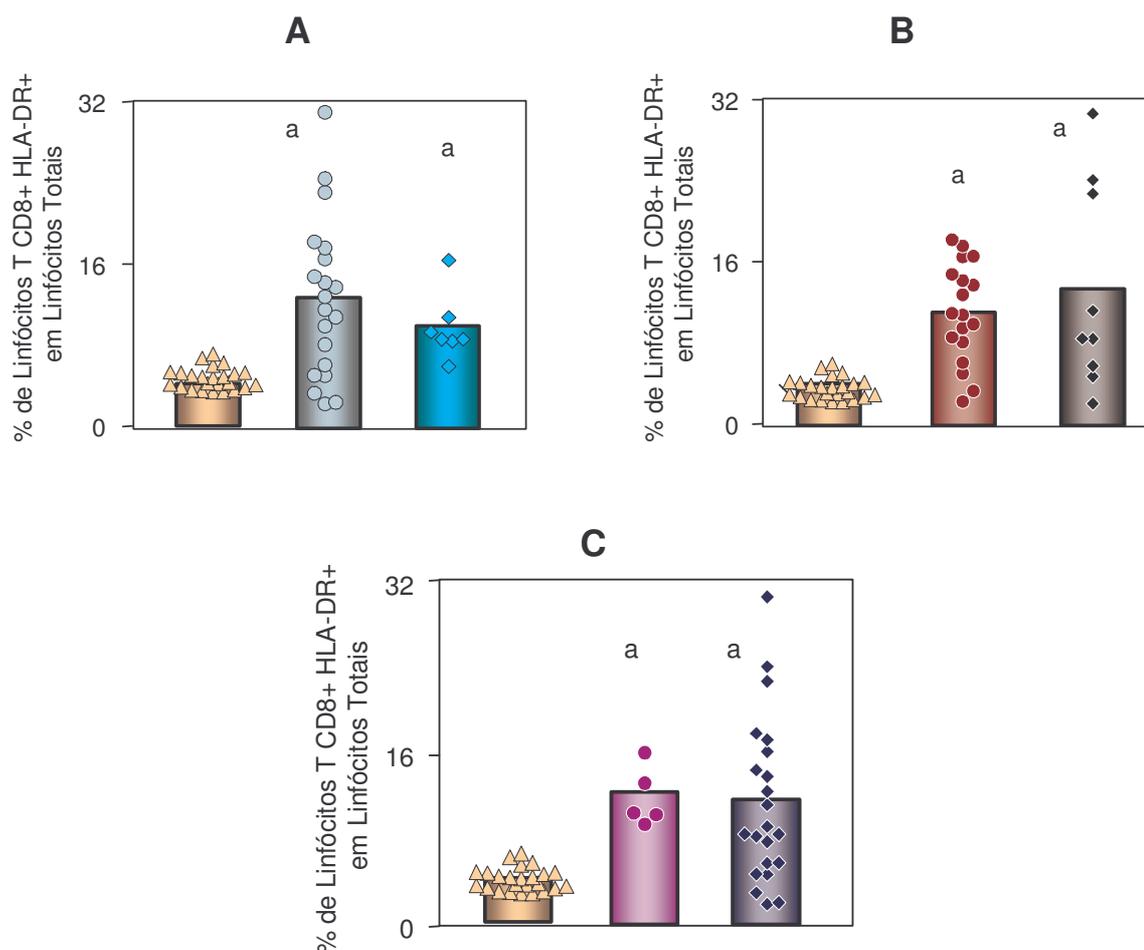
**Figura 34:** Percentual médio de linfócitos T CD4+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de linfócitos T CD4+ ativados foi inicialmente identificada através de aspectos morfológicos seguida pela análise imunofenotípica, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD4 marcado com FITC e anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T CD4+ ativadas na população de linfócitos totais. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

A avaliação do percentual das subpopulações de linfócitos T CD8+ ativados (HLA-DR+) do sangue periférico foi feita através de ensaios de dupla marcação, como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG. 35 mostra os resultados dos percentuais de linfócitos T CD8+ HLA-DR+ no sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos resultados revelou que todos os subgrupos de pacientes LCL apresentaram um percentual de linfócitos T CD8+ HLA-DR+ significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=1,78%; LCL-1=12,88%; LCL-2-4=10,23%; LCL $\leq$ 60=11,39%; LCL>60=13,80%; LCL-TM-=12,72%; LCL-TM+=12,07%), sendo que os subgrupos LCL-1 e LCL>60 apresentaram os maiores valores percentuais de linfócitos T CD8+ ativados.

Em conjunto, os dados de ativação de subpopulações de linfócitos T demonstram o envolvimento dessas subpopulações nos mecanismos de imunidade celular durante a infecção *Leishmania*, independente dos aspectos clínico-laboratoriais do paciente. Entretanto, torna-se ainda importante identificar o balanço da participação dessas subpopulações celulares no âmbito dos diferentes aspectos clínico-laboratoriais avaliados nesse estudo.



**Figura 35:** Percentual médio de linfócitos T CD8+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratorias como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de linfócitos T CD8+ ativados foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD8 marcado com FITC e anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células T CD8+ ativadas na população de linfócitos totais. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

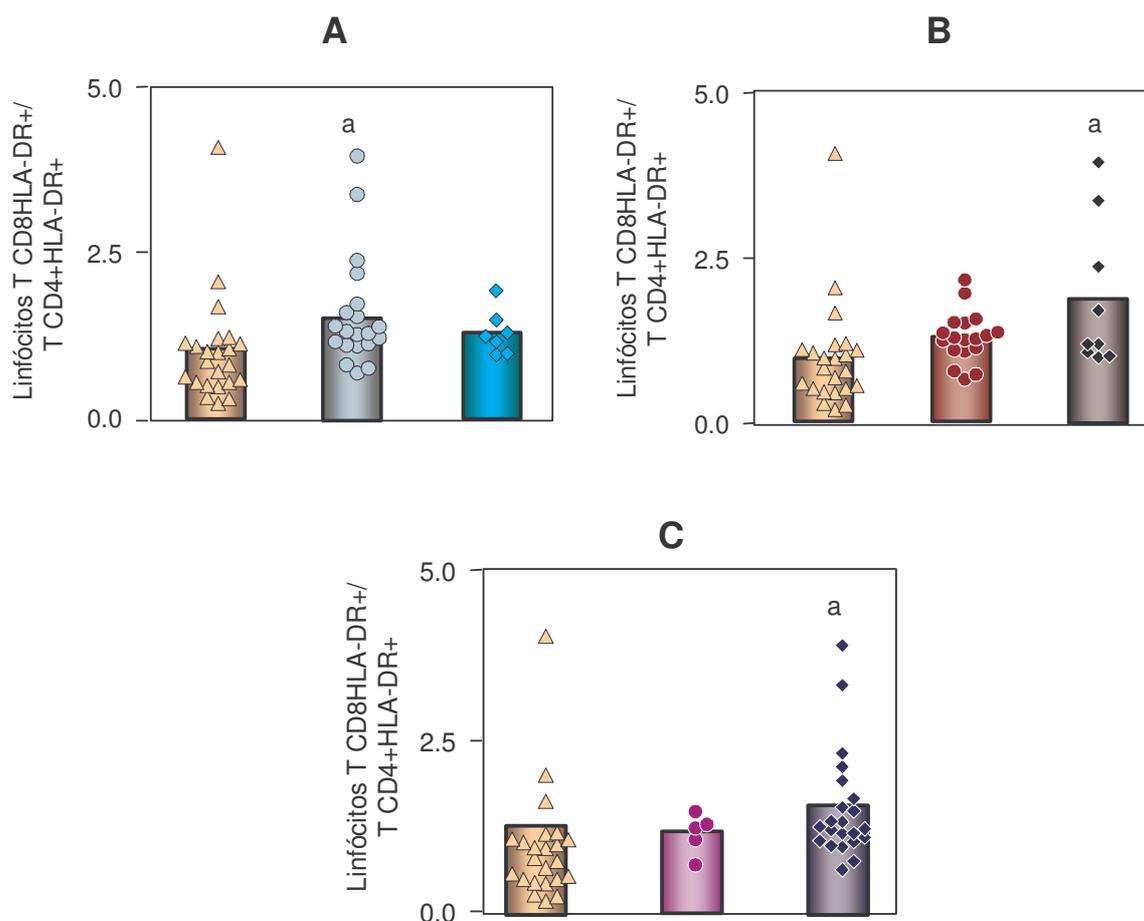
Visando investigar o balanço da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ durante a infecção por *Leishmania*, realizamos uma análise adicional da razão entre os valores percentuais de células CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais e que está representado na FIG. 36.

A análise dos dados demonstrou que LCL-1 apresenta uma razão entre linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ significativamente maior ( $p<0,05$ ), quando comparado com os grupos NI (NI=1,31; LCL-1=1,60; LCL-2-4=1,38).

A análise dos dados demonstrou que LCL>60 apresenta uma razão entre linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ significativamente maior ( $p<0,05$ ), quando comparado com o grupo NI (NI=1,31; LCL≤60=1,23; LCL>60=1,93).

A análise dos dados demonstrou que LCL-TM+ apresenta uma razão entre linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ significativamente maior ( $p<0,05$ ), quando comparado com os grupos NI (NI=1,31; LCL-TM-=1,25; LCL-TM+=1,61).

Esses achados reforçam a hipótese da ativação precoce de células T CD4+ seguida pela expansão da população de linfócitos T CD8+ nos eventos mais tardios na LCL, quando analisamos os subgrupos LCL≤60 e LCL>60. Ainda, é interessante observar que os grupos LCL-1 e LCL-TM+ apresentam valores mais elevados da razão CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+, reforçando o papel protetor da imunidade celular mediada por linfócitos T CD8+ no contexto da LCL.



**Figura 36:** Razão entre linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). Os resultados estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e percentual médio (barras) da razão de linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

#### IV - Aspectos fenotípicos de linfócitos B circulantes:

##### *A - Freqüência de subpopulações de linfócitos B (CD5- e CD5+)*

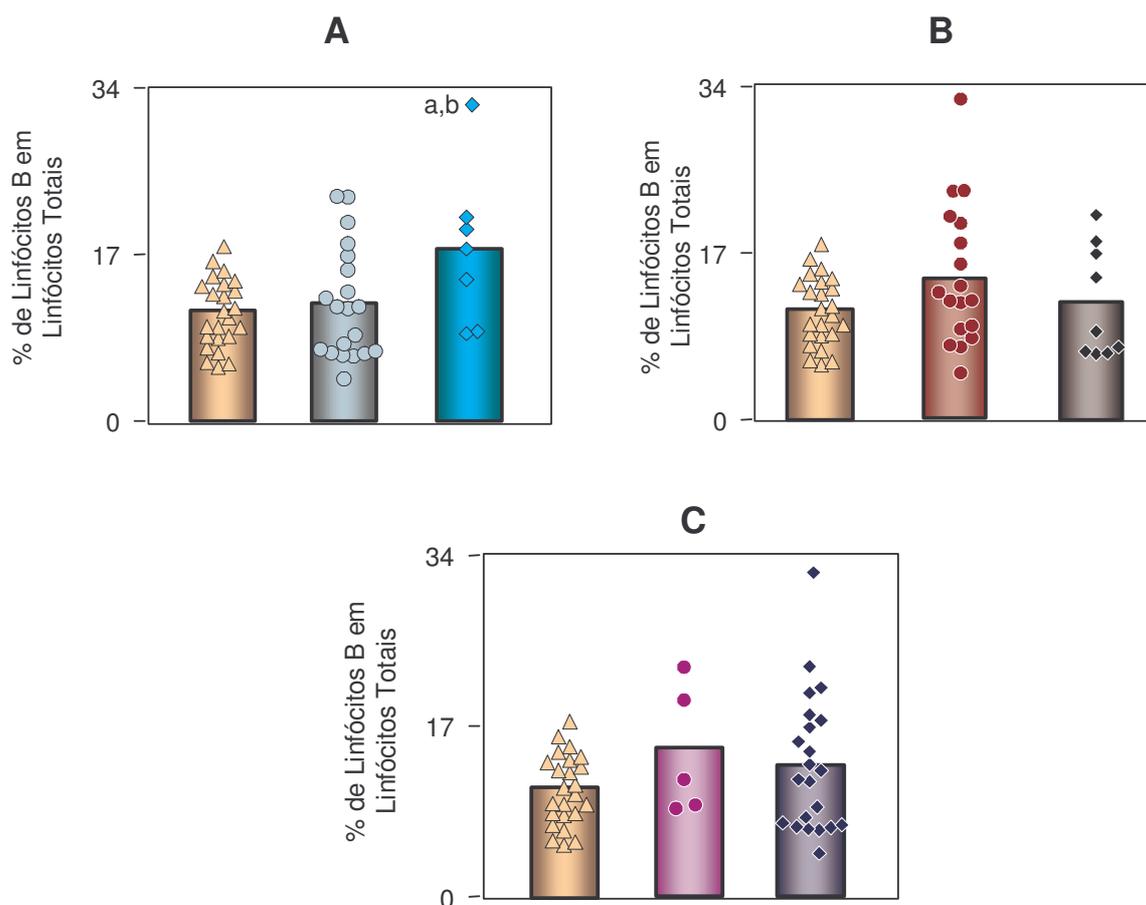
Para avaliar o percentual de linfócitos B na população de linfócitos totais do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e os resultados foram obtidos através da análise convencional, como ilustrado em Material e Métodos.

O percentual de linfócitos B (CD19+) na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais está representado na FIG. 37.

A análise dos dados revelou que apenas o grupo LCL-2-4 apresentou um percentual de linfócitos B totais, significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo NI e LCL-1 (NI=11,39%; LCL-1=12,34%; LCL-2-4=17,88%).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos LCL-1, LCL $\leq$ 60, LCL $>$ 60, LCL-TM- e LCL-TM+ e o grupo NI (NI=11,39%; LCL $\leq$ 60=14,56%; LCL $>$ 60=12,21%; LCL-TM-=14,77%; LCL-TM+=13,55%).

Esses resultados re-enfatizam o envolvimento de mecanismos de imunidade humoral nos aspectos de morbidade durante a infecção *Leishmania*, quando analisamos os grupos LCL-1 e LCL-2-4.



**Figura 37:** Percentual médio de linfócitos B totais CD19+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△).A população de linfócitos B totais foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD19 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células B na população de linfócitos totais. As diferenças estatísticas do grupo LCL número de lesões ( $p<0,05$ ) estão identificadas pela letra “a”, “b” em comparação com o grupo NI, LCL-1, respectivamente.

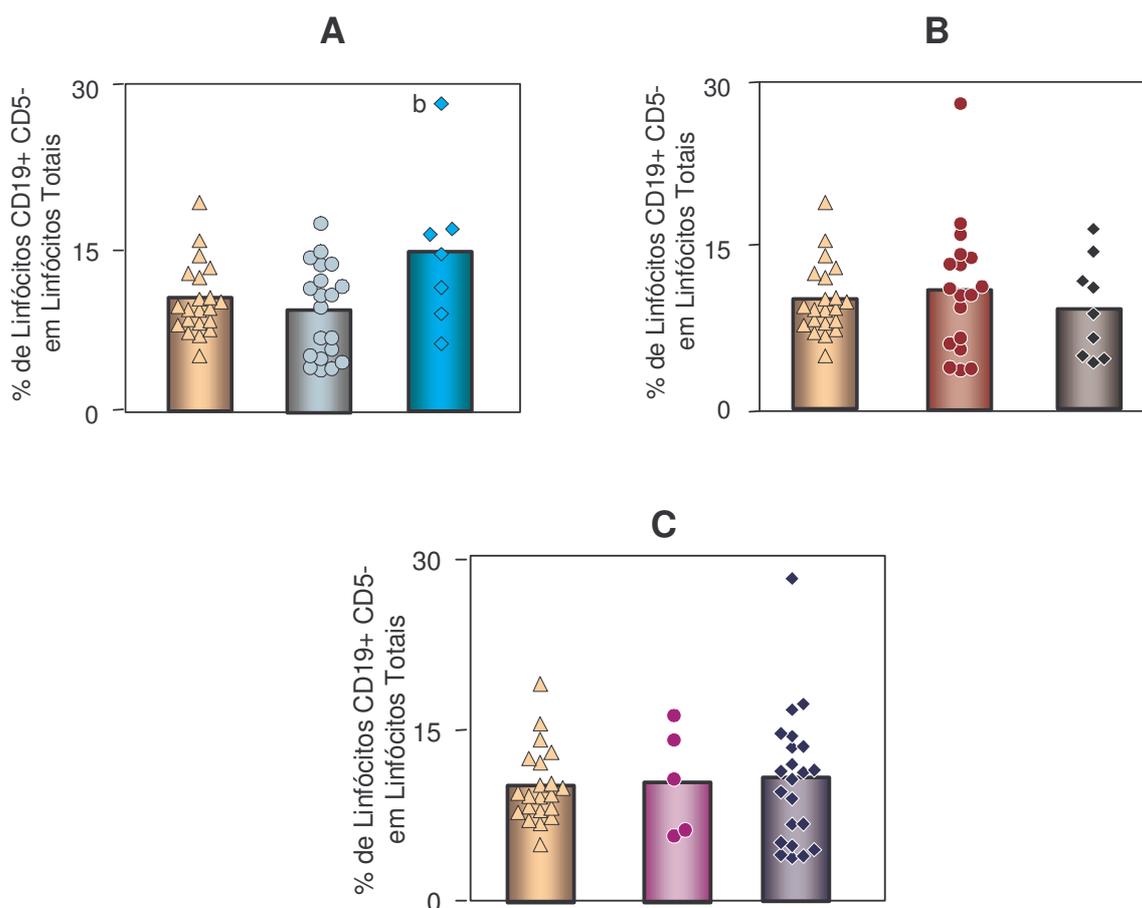
Para avaliar o percentual das subpopulações de linfócitos B convencionais (CD19+CD5-) na população de linfócitos totais do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e os resultados foram obtidos através da análise convencional como ilustrado em Material e Métodos.

O percentual de linfócitos B convencionais na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais está representado na FIG. 38.

A análise dos dados revelou que o grupo LCL-2-4 apresenta um percentual de linfócitos B convencionais, significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo LCL-1, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo NI (NI=10,59%; LCL-1=9,53%; LCL-2-4=14,95%).

Os grupos LCL $\leq$ 60, LCL $>$ 60, LCL-TM- e LCL-TM+ não apresentaram diferença significativa para o percentual de linfócitos B convencionais, quando comparados ao grupo NI (NI=10,59%; LCL $\leq$ 60=11,52%; LCL $>$ 60=9,76%; LCL-TM-=10,92%; LCL-TM+=10,93%).

Esses resultados reforçam a hipótese previamente apresentada do envolvimento dos mecanismos de imunidade humoral nos aspectos de morbidade durante a infecção *Leishmania*, quando analisamos os grupos LCL-1 e LCL-2-4.



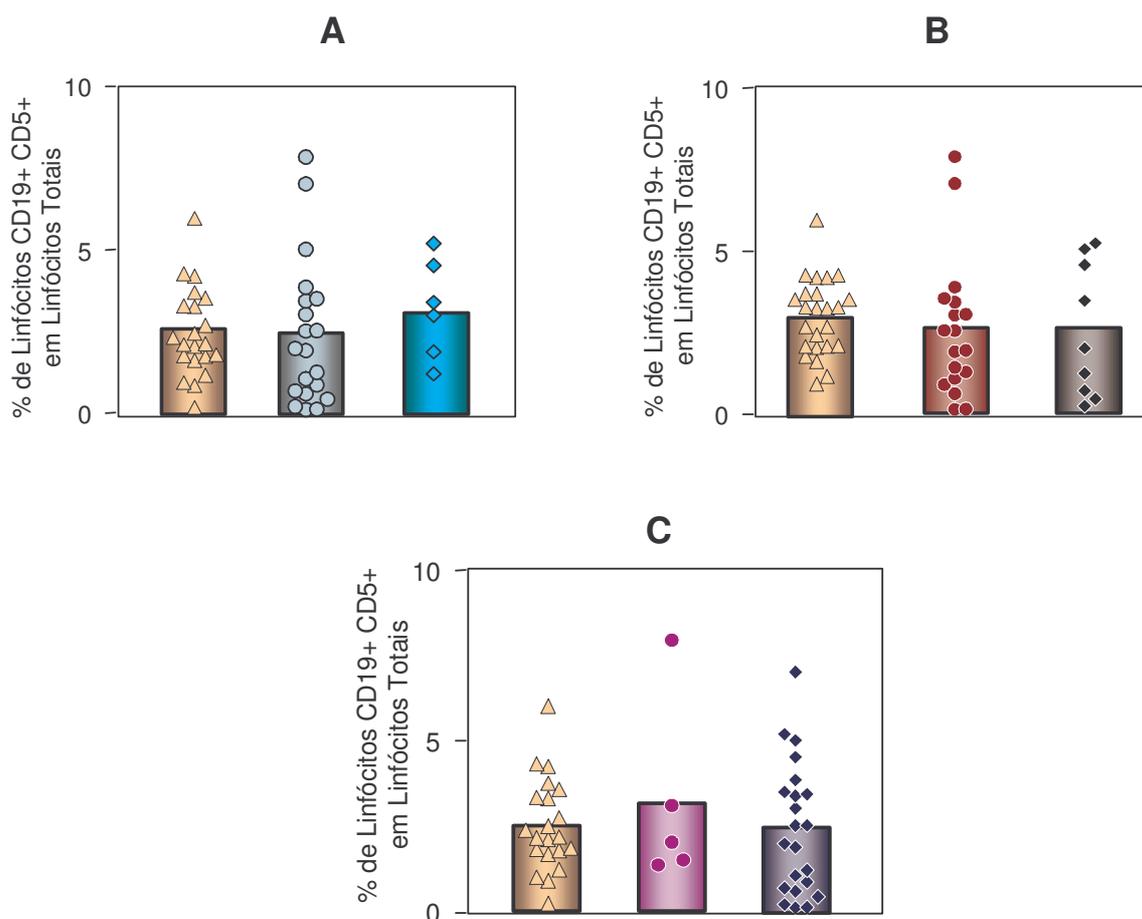
**Figura 38:** Percentual médio de linfócitos B convencionais CD19+CD5- circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de linfócitos B convencionais foi inicialmente identificada através de aspectos morfológicos seguida pela análise imunofenotípica, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD5 marcados com FITC e anti-CD19 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células B convencionais na população de linfócitos totais. A diferença estatística do grupo LCL número de lesões ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “b” em comparação com o grupo LCL-1.

---

Para avaliar o percentual das subpopulações de linfócitos B1 (CD19+CD5+) na população de linfócitos totais do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e os resultados foram obtidos através da análise convencional, como ilustrado em Material e Métodos.

O percentual de linfócitos B1 (CD19+CD5+) na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais está representado na FIG. 39.

A análise dos dados de linfócitos B1 mostrou que não houve diferença estatística entre os subgrupos de pacientes portadores de LCL, em relação ao grupo NI (NI=2,57%; LCL-1=2,55%; LCL-2-4=3,09%; LCL≤60=2,70%; LCL>60=2,67%; LCL-TM-=3,23%; LCL-TM+=2,57%).



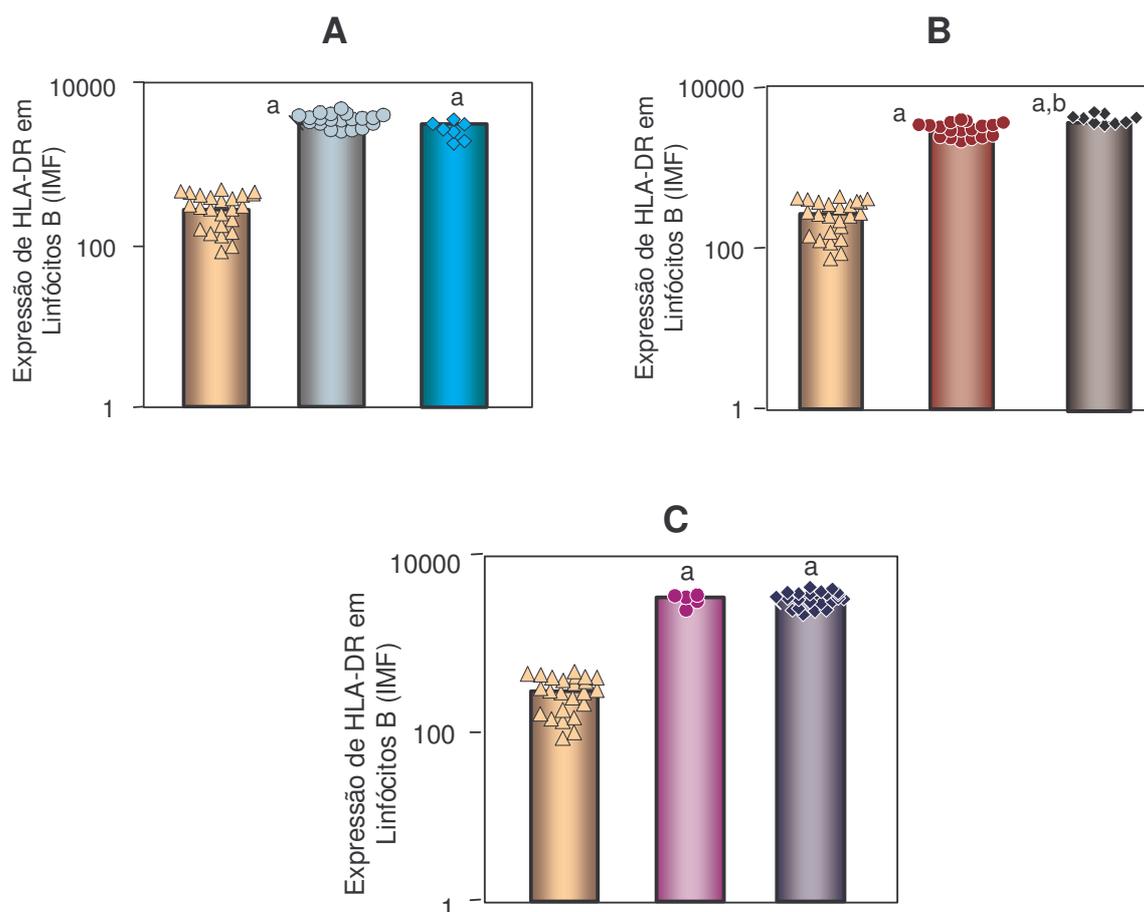
**Figura 39:** Percentual médio de linfócitos B1, CD19+CD5+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de linfócitos B convencionais foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD5 marcados com FITC e anti-CD19 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados como dispersão dos valores individuais (símbolos) e a média (barras) do percentual das células B1 na população de linfócitos totais

*B - Densidade de expressão de HLA-DR em linfócitos B*

A avaliação da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B na população de linfócitos totais do sangue periférico foi feita através de uma estratégia de análise fenotípica semi-quantitativa como ilustrado em Material e Métodos.

A FIG.40 mostra os resultados da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos dados demonstrou que os subgrupos de pacientes portadores de LCL apresentam uma maior expressão de HLA-DR+ em linfócitos B ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo NI. O grupo LCL>60 também apresentou uma maior expressão dessa molécula em relação ao grupo LCL≤60 (NI=306; LCL-1=3800,11; LCL-2-4=3733,02; LCL≤60=3546,53; LCL>60=4255,08; LCL-TM-=3539,24; LCL-TM+=3838,05).



**Figura 40:** Análise da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). A população de linfócitos foi inicialmente identificada através de aspectos morfométricos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-HLA-DR marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos sob forma de dispersão (símbolos) e a média (barras) dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI. A diferença estatística do grupo LCL tempo de lesão ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “b” em comparação com o grupo LCL≤60.

*C - Freqüência de linfócitos B CD23+*

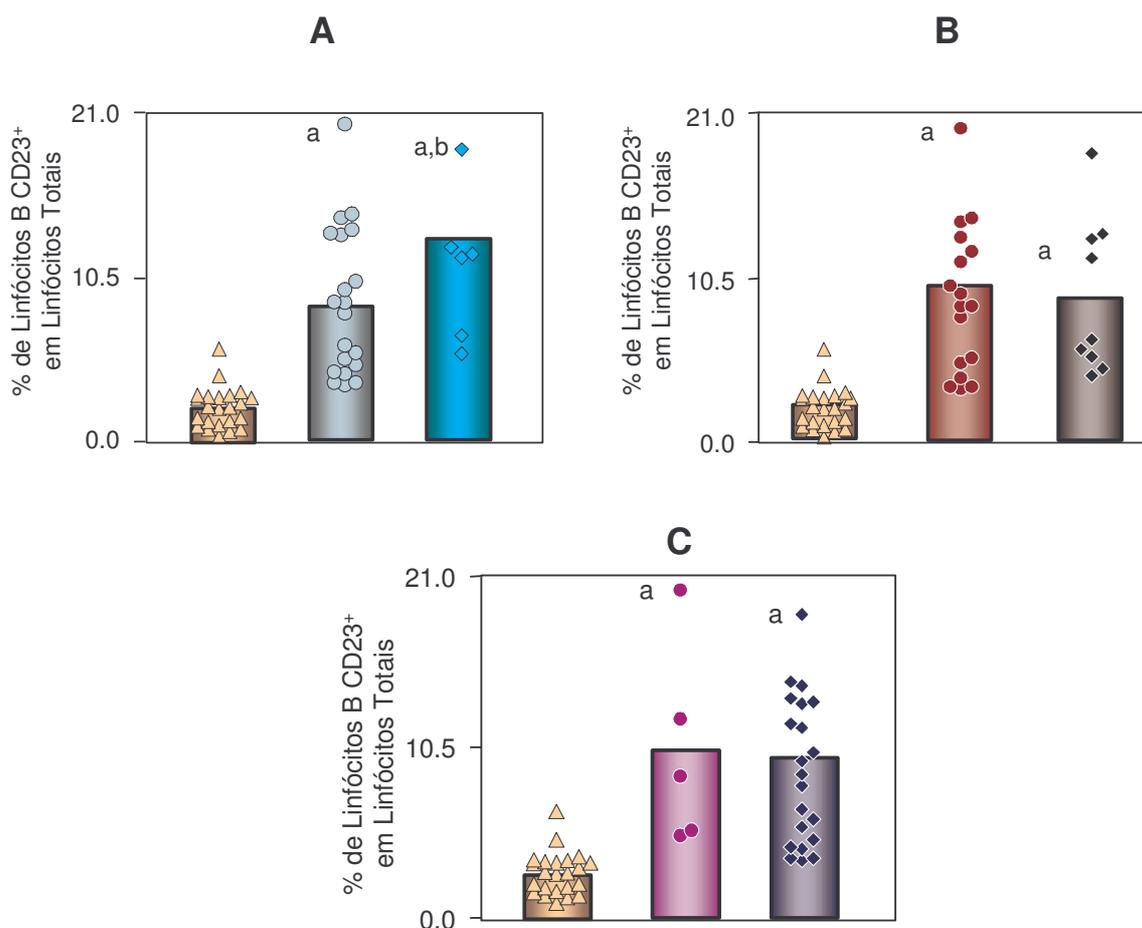
Para avaliar o percentual de linfócitos B CD23+ na população de linfócitos totais do sangue periférico foram feitos ensaios de dupla marcação, como descrito em Material e Métodos.

A FIG. 41 demonstra o percentual de linfócitos CD19+CD23+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes com LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

A análise dos dados revelou que os grupos LCL-1 e LCL-2-4 apresentam um percentual de linfócitos B CD23+, significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo NI. O grupo LCL-2-4 também apresentou um maior percentual de linfócitos B CD23+ em relação ao grupo LCL-1 (NI=2,16%; LCL-1=8,90%; LCL-2-4=13,10%).

A análise dos dados mostrou que os grupos LCL $\leq$ 60, LCL $>$ 60, LCL-TM- e LCL-TM+ apresentam um percentual maior ( $p < 0,05$ ) de linfócitos B CD23+, em relação ao grupo NI. (NI=2,16%, LCL $\leq$ 60=10,22%; LCL $>$ 60=9,53%; LCL-TM-=10,56%; LCL-TM+=9,86%).

Em conjunto, os dados referentes aos aspectos imunofenotípicos de linfócitos B sugerem a importância da avaliação do balanço de aspectos fenotípicos associados à imunidade celular e humoral na LCL, sugerindo maior envolvimento da imunidade humoral nos eventos tardios na LCL, quando analisamos a expressão de HLA-DR em linfócitos B nos subgrupos LCL $\leq$ 60 e LCL $>$ 60. Ainda, salienta a importância da imunidade humoral como elemento relevante nos relatos de maior morbidade na LCL, quando analisamos a freqüência de linfócitos B totais, convencionais e CD23+ nos subgrupos LCL-1 e LCL-2-4.



**Figura 41:** Percentual médio de linfócitos CD19+CD23+ no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). A população de linfócitos foi inicialmente identificada através de aspectos morfológicos seguida pela análise imunofenotípica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com FITC e anti-CD23 marcado com PE, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos através de dispersão dos valores individuais (símbolos) e média percentual (barras) de linfócitos CD19+CD23+ na população de linfócitos totais. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI. A diferença estatística do grupo LCL número de lesões ( $p < 0,05$ ) está identificada pela letra “b” em comparação com o grupo LCL-1.

**Balanco da resposta imune na LCL, em função de parâmetros clínico-laboratoriais:**

Visando investigar o balanço do envolvimento da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *Leishmania*, realizamos uma análise adicional da razão entre os valores absolutos de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células CD19+CD23+ por mm<sup>3</sup> de sangue em pacientes portadores de LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais.

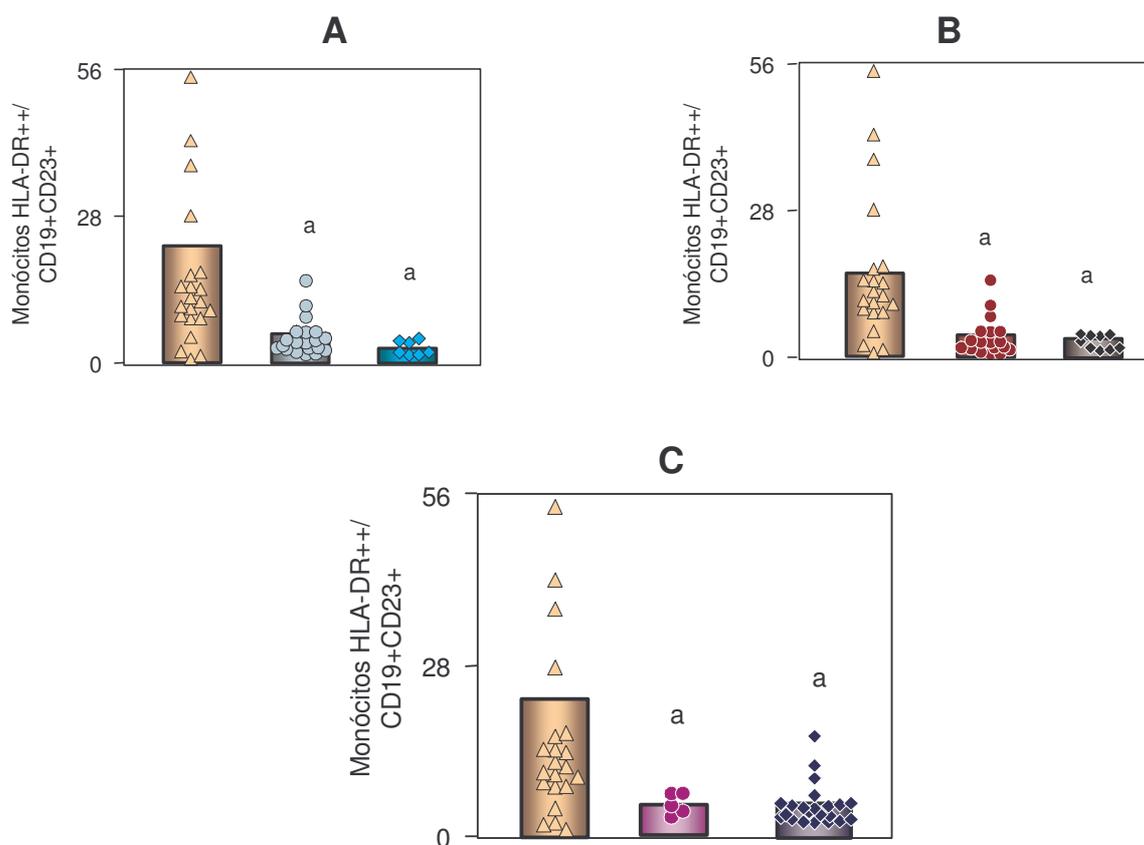
Os resultados da razão entre os valores absolutos de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células B CD23+ no sangue periférico de pacientes com LCL e de indivíduos não infectados estão representados na FIG. 42.

A análise dos dados demonstrou que os indivíduos LCL-1 e LCL-2-4 apresentam uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células B CD23+ significativamente menor ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os indivíduos não infectados (NI=22,96; LCL-1=3,98; LCL-2-4=1,98).

A análise dos dados demonstrou que os grupos LCL≤60 e LCL>60 apresentam uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células B CD23+ significativamente menor ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os indivíduos não infectados. Entretanto os indivíduos LCL≤60 apresentam uma razão maior em relação ao grupo LCL>60 (NI=22,96; LCL≤60=4,02; LCL>60=2,34).

A análise dos dados demonstrou que os indivíduos LCL-TM- e LCL-TM+ apresentam uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células B CD23+ significativamente menor ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=22,96; LCL-TM-=3,26; LCL-TM+=3,51).

Esses achados sugerem o predomínio da ativação de células envolvidas na imunidade adaptativa com a expansão da população de linfócitos CD19+CD23+ em todos os grupos avaliados.

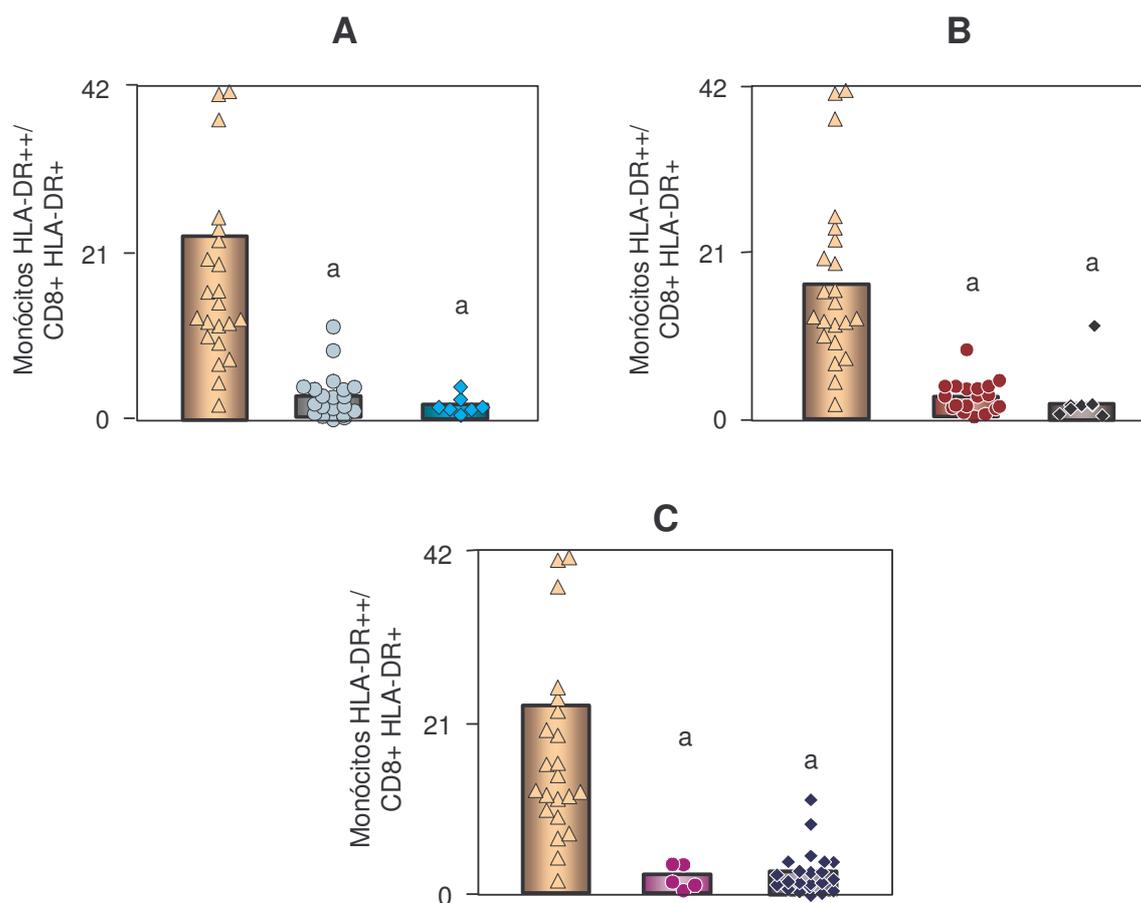


**Figura 42:** Razão entre Monócitos HLA-DR+/CD19+CD23+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (○), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (△). Os resultados foram calculados empregando-se os valores absolutos de células/mm<sup>3</sup> de sangue e estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e valor médio (barras) da razão de Monócitos HLA-DR+/CD19+CD23+. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

Numa outra abordagem, calculamos a razão entre os valores absolutos de monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e células CD8+HLA-DR+ por mm<sup>3</sup> de sangue em indivíduos portadores de LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais. Os resultados dessa razão estão representados na FIG. 43.

A análise dos dados demonstrou que todos os subgrupos de indivíduos infectados apresentam uma razão entre monócitos pró-inflamatórios (HLA-DR++) e CD8+HLA-DR+ significativamente menor ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=23,65; LCL-1=3,25; LCL-2-4=2,12, LCL≤60=3,12; LCL>60=2,63; LCL-TM-=2,48; LCL-TM+=3,07).

Em suma, esses resultados salientam novamente o predomínio da ativação precoce de células envolvidas na imunidade inata, seguida pelo envolvimento da imunidade adaptativa com a expansão da população de linfócitos T CD8+HLA-DR+ nos eventos mais tardios na LCL, quando analisamos os subgrupos LCL≤60 e LCL>60.

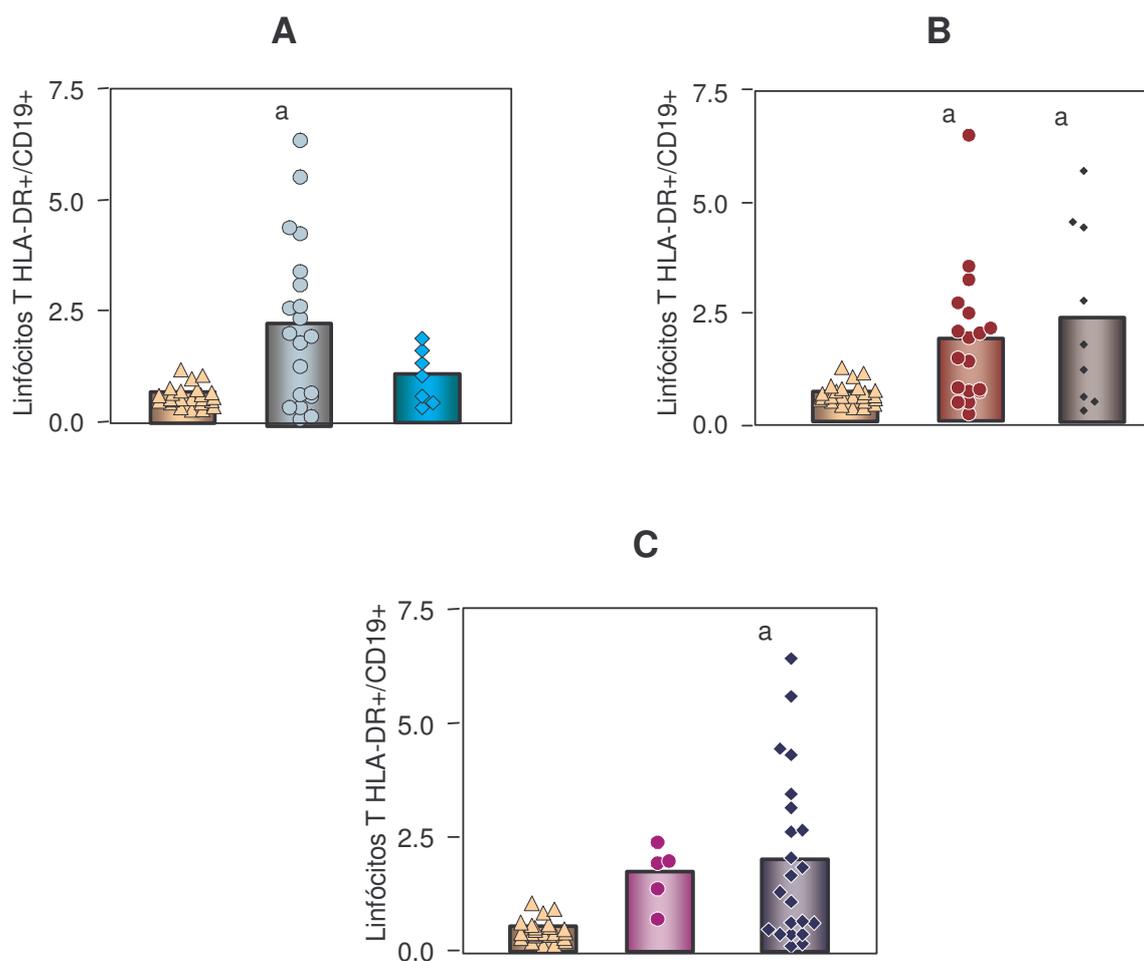


**Figura 43:** Razão entre Monócitos HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). Os resultados foram calculados empregando-se os valores absolutos de células/mm<sup>3</sup> de sangue e estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e valor médio (barras) da razão de Monócitos HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. As diferenças estatísticas (p<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

Numa abordagem final, analisamos o balanço entre a resposta imune celular e humoral através do cálculo da razão entre linfócitos T totais ativados/linfócitos B totais presentes no sangue periférico de portadores de LCL, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais. Os resultados dessa razão estão representados na FIG. 44.

A análise dos dados demonstrou que os subgrupos LCL-1, LCL $\leq$ 60, LCL $>$ 60 e LCL-TM $+$  apresentam uma razão de Linfócitos T totais ativados (HLA-DR $+$ ) /Linfócitos B totais (CD19 $+$ ) significativamente maior ( $p < 0,05$ ), quando comparados com os indivíduos não infectados (NI=0,37%; LCL-1=2,38%; LCL-2-4=1,19%, LCL $\leq$ 60=1,89%; LCL $>$ 60=2,35%; LCL-TM $-$ =1,79%; LCL-TM $+$ =2,13%). Entretanto, é interessante observar que o grupo LCL $>$ 60 apresenta a maior razão entre os aspectos imunofenotípicos da imunidade celular em relação a humoral.

Esses achados reforçam mais uma vez a importância de um predomínio da imunidade celular sobre a humoral nos eventos protetores na LCL quando analisamos os subgrupos LCL-1 e LCL-2-4, bem como os subgrupos LCL-TM $-$  e LCL-TM $+$ . Além disso, os dados dos subgrupos LCL $\leq$ 60 e LCL $>$ 60 sugerem maior envolvimento da resposta celular nos eventos tardios.



**Figura 44:** Razão entre Linfócitos T HLA-DR+/CD19+ circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada, categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais como: (A) LCL-1 (●), LCL-2-4 (◆); (B) LCL≤60 (●), LCL>60 dias (◆), (C) LCL-TM- (●), LCL-TM+ (◆) e de indivíduos não infectados NI (▲). Os resultados foram calculados empregando-se os valores percentuais de células na população de linfócitos totais e estão expressos sob forma de dispersão dos valores individuais (símbolos) e valor médio (barras) da razão de Linfócitos T CD3+HLA-DR+/CD19+. As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

**Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa na Leishmaniose Tegumentar Americana**

---

**SÍNTESE DOS RESULTADOS**

Considerando o grande número de alterações significativas observadas para os diversos parâmetros fenotípicos celulares e moleculares empregados nesse estudo, elaboramos a seguir, um diagrama com a síntese dos resultados (FIG. 45). Inicialmente, foram consideradas as diferenças significativas observadas entre o grupo LCL e o grupo NI (FIG. 45A). Em seguida, foram realizadas análises das interseções entre os subgrupos de pacientes LCL, categorizados em função de parâmetros clínico-laboratoriais. Esse tipo de abordagem visou distinguir alterações intrínsecas da LCL daquelas capazes de ser associadas com o número de lesões (FIG. 45B), tempo de lesão (FIG. 45C) e a positividade no teste de Montenegro (FIG. 45D), sendo específicas de uma determinada categoria clínica. Para tal, com o objetivo de facilitar a interpretação e discussão dos resultados, bem como a elaboração de conclusões baseadas nas evidências de perfil fenotípico diferencial, a FIG. 45 apresenta um diagrama ilustrativo com a síntese dos resultados.

A análise das informações contidas na FIG. 45 permitiu a verificação que pacientes portadores de LCL, quando analisados em conjunto em relação ao grupo NI apresentam um perfil de resposta imune misto, com alterações tanto em aspectos fenotípicos associados à imunidade inata (Monócitos e Neutrófilos), quanto adaptativa (Linfócitos T e B), bem como da resposta imune adaptativa celular e humoral, sugerindo o envolvimento complexo de mecanismos imunológicos. Além disso, na análise do compartimento da imunidade inata, observam-se tanto eventos fenotípicos sugestivos de ativação (▲Monócitos CD23+, ▲Neutrófilos HLA-DR+, ▲Neutrófilos CD23+) bem como mecanismos reguladores (▽Neutrófilos CD28+, ▽Neutrófilos CD16+), No âmbito da imunidade adaptativa, observam-se também um perfil misto, com envolvimento de aspectos fenotípicos sugestivos da ativação simultânea da imunidade celular e humoral (▲LTHLADR+, ▲LTCD4+HLADR+, ▲LTCD8+HLADR+, ▲LBHLADR+, ▲CD19+CD23+).

Considerando a complexidade da resposta imune durante a infecção por *Leishmania*, a ausência de sincronidade/perfil preferencial dos eventos imunológicos observados nos portadores de LCL, e o perfil misto de resposta identificado em nosso estudo, tivemos o interesse de avaliar a possível associação desses achados fenotípicos com diferentes aspectos clínico-laboratoriais. Nesse contexto, selecionamos três importantes aspectos mais relevantes no âmbito da infecção humana por *Leishmania*, os quais estão diretamente associados com características de morbidade e

os eventos de proteção já descritos na literatura, incluindo: número de lesões cutâneas, tempo de lesão e a positividade no teste de Montenegro. Embora, também tenhamos avaliado a associação entre aspectos demográficos, tais como sexo e idade, apenas os parâmetros clínico-laboratoriais apresentaram alterações estatísticas distintas das observadas previamente na análise conjunta dos portadores de LCL. Esse tipo de abordagem, previamente realizada em nosso laboratório (MASINI, A.B., 2005), já havia sugerido o impacto importante dessas variáveis clínico-laboratoriais no estudo do perfil de citocinas intracitoplasmáticas no contexto da LCL e a ausência de associação daquele perfil com aspectos demográficos da população em estudo.

No âmbito das alterações imunológicas específicas de um determinado grupo clínico-laboratorial, observamos um predomínio de alterações em aspectos fenotípicos associados à imunidade celular no grupo LCL-1 (▲LTCD8+HLADR+/CD4+HLA-DR+, ▲LTHLADR+/LB). Por outro lado, observamos um predomínio de aspectos da imunidade humoral no grupo LCL-2-4 (▲LB, ▲CD19+CD5-, ▲CD19+CD23+). Em conjunto, esses resultados reforçam o papel protetor da imunidade celular mediada por linfócitos T CD8+ no contexto da LCL. Ainda, esses resultados re-enfatizam o envolvimento de mecanismos de imunidade humoral nos aspectos de morbidade durante a infecção pela *Leishmania*, quando analisamos os grupos LCL-1 e LCL-2-4 (FIG. 45B).

A análise dos dados fenotípicos à luz da categorização do grupo LCL em função do tempo de lesão, permitiu observar uma dinâmica dos eventos da imunidade inata, mais freqüente em portadores de lesão recente LCL≤60 (▽ Neutrófilos CD28+, ▲ Neutrófilos HLA-DR+, ▲ Neutrófilos CD23+) e adaptativa, preferencialmente detectadas em portadores de lesão crônica LCL>60 (▲LTCD8+HLADR+/CD4+HLA-DR+, ▲HLADR em LB) (FIG. 45C).

Aspectos imunofenotípicos característicos do grupo LCL-TM+ foram aqueles da imunidade inata e adaptativa diretamente associados à imunidade celular leishmanicida (▲CD23 em Monócitos, ▲LTCD8+HLADR+/CD4+HLA-DR+, ▲LTHLA-DR+/LB). Esses dados reforçam os relatos prévios de que a positividade no teste de Montenegro é um importante indicador laboratorial da habilidade de montar uma resposta imune celular protetora anti-*Leishmania* (FIG. 45D).

Considerando as características imunofenotípicas intrínsecas da LCL, independentes dos aspectos clínico-laboratoriais avaliados, destacam-se a participação

simultânea da imunidade adaptativa celular e humoral com uma elevação significativa da ativação de linfócitos T (LT HLA-DR+, LTCD4+HLA-DR+ e LTCD8+HLA-DR+) e células B (LB CD23+). Além disso, observa-se um predomínio da imunidade adaptativa, pela presença constante da reduzida taxa de monócitos pró-inflamatórios em relação aos eventos da imunidade celular e humoral (Monócitos HLA-R++/CD8+HLA-DR+ e Monócitos HLA-R++/LBCD23+), independente da categorização dos portadores de LCL.

Como característica imunofenotípica associada aos eventos de proteção, observa-se nos grupos LCL-1, LCL>60 e LCL-TM+ uma ativação preferencial da resposta imune mediada por linfócitos T CD8+, sobressaindo à ativação de linfócitos T CD4+, dada a maior taxa da expressão de HLA-DR por células citotóxicas, em relação às células auxiliares (LTCD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+). Além disso, no âmbito da positividade do teste de Montenegro, realça-se a indução na expressão de CD23 por monócitos como evento acoplado à detecção laboratorial da imunidade celular. Em contrapartida, no grupo que representa maior grau de morbidade na LCL (LCL-2-4), observa-se maior comprometimento do compartimento humoral com alterações mais significativas em aspectos fenotípicos de linfócitos B.

No estudo simulador da dinâmica dos eventos imunológicos durante a LCL, observa-se o envolvimento precoce de neutrófilos na infecção por *Leishmania*, com o estabelecimento mais tardio da imunidade celular mediada por linfócitos T CD8+.

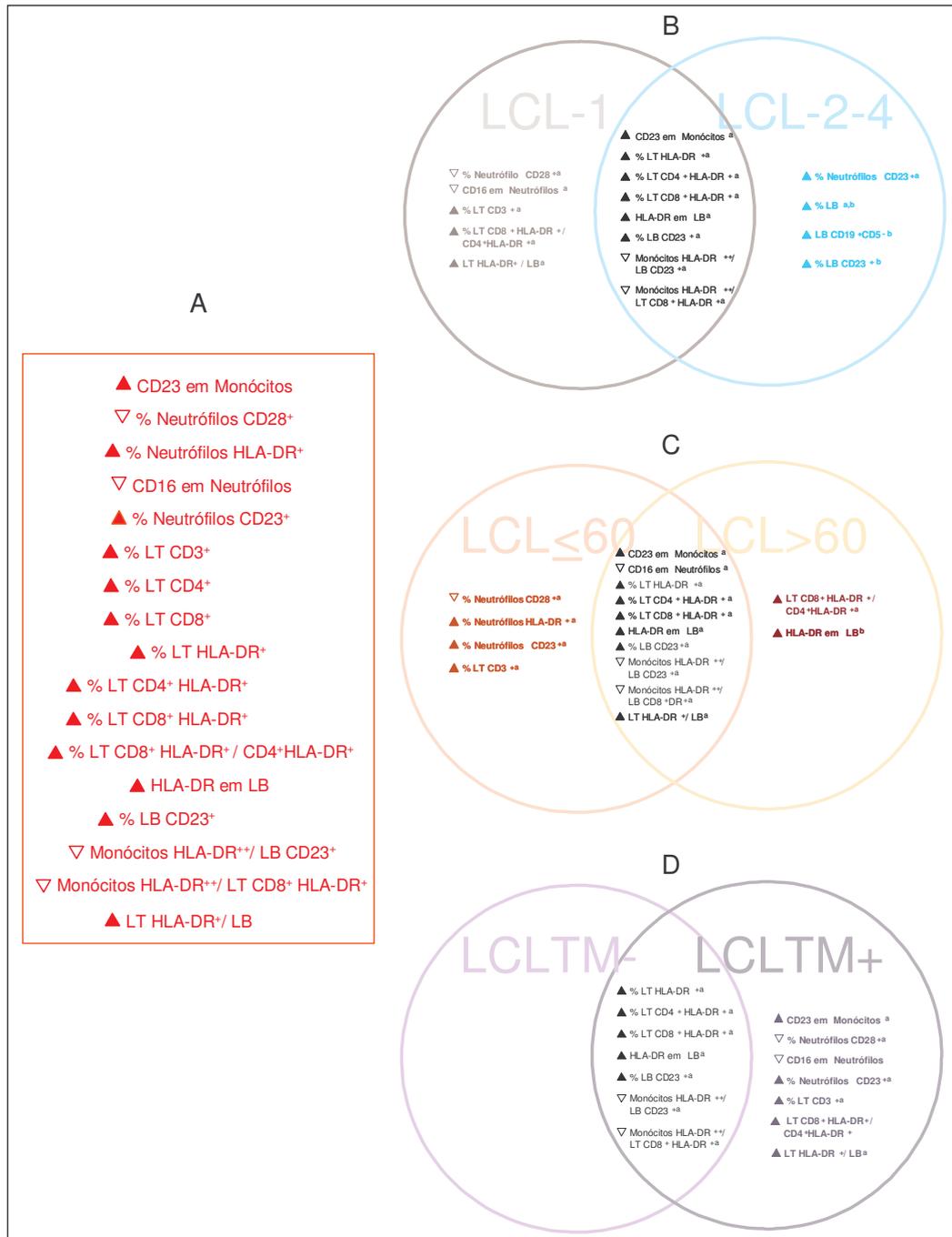


Figura 45: Análise cross-sectional do perfil fenotípico de células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa, bem como em eventos da imunidade celular e humoral, no sangue periférico de pacientes portadores da LCL analisados em conjunto (A), ou categorizados em função de aspectos clínico-laboratoriais, incluindo número de lesões (B), tempo de lesão (C) e positividade no teste de Montenegro (D). A orientação das setas representa elevação ou diminuição estatisticamente significativa entre os parâmetros avaliados. As letras “a” e “b” representam diferenças significativas em relação ao grupo NI e ao outro subgrupo de paciente portador de LCL em cada análise.

**DISCUSSÃO**

Diversos estudos que avaliam aspectos inerentes ao complexo grupo de doenças denominado “Leishmanioses”, chamam a atenção para a natureza multifatorial dos eventos associados ao estabelecimento/manutenção de diferentes formas clínicas, dando suporte a hipóteses de que mecanismos complexos estão envolvidos na indução e/ou regulação da patogenia das leishmanioses. Nesse contexto, a LCL apresenta diferentes aspectos que podem ser atribuídos a fatores ligados ao parasito, como por exemplo, a virulência dependente da espécie envolvida no processo infeccioso. ROMERO et al. (2001), observaram que pacientes infectados com *L. braziliensis* apresentam um menor número de lesões, que, entretanto, apresentam-se maiores que aquelas observadas em pacientes infectados com *L. guyanensis*. SILVEIRA et al. (2004) demonstram que indivíduos portadores de LCL infectados por *L. amazonensis* apresentam uma capacidade maior em montar uma resposta imune do Tipo 2, quando comparados aos indivíduos infectados com *L. braziliensis*, o que proporcionaria o estabelecimento de manifestações clínicas mais graves, como por exemplo, a LCD.

Ainda, no contexto dos aspectos que interferem na patogênese da LTA, diversos estudos têm focalizado atenção em fatores ligados ao hospedeiro, incluindo o polimorfismo de expressão gênica de produtos do complexo maior de histocompatibilidade (LARA et al., 1991; OLIVO-DIAZ et al., 2004), a presença de co-infecções (De LIMA BARROS et al., 2005; ROMERO et al., 2004; RABELLO et al., 2003) bem como o estado imunológico do indivíduo, no que se refere à capacidade de montar uma resposta imune com maior caráter protetor ou indutor de morbidade (POMPEU et al., 2001). No âmbito da imunogenética, os trabalhos chamam a atenção para a importância da influência da expressão de genes específicos do HLA de classe I (HLA-A,B,C) e classe II (HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR) (LARA et al., 1991; OLIVO-DIAZ et al., 2004). Os resultados desses estudos indicam que os genes do HLA de classe I parecem não apresentar um impacto relevante na susceptibilidade a LCL. Por outro lado, os genes do HLA de classe II parecem ser relevantes para a expressão clínica de LCL, como o HLA-DRB1\*0407 (OLIVO-DIAZ et al., 2004) e HLA-DQw3 (LARA et al., 1991), relacionados à susceptibilidade, e o HLA-DP\*0401 (OLIVO-DIAZ et al., 2004), relacionado à resistência na LCL. Os estudos que avaliam o impacto das co-infecções nas manifestações clínicas a LTA chamam a atenção para um relato de 2000 casos de pacientes co-infectados por Leishmania-HIV, apresentando LCL ou LMC causada por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (ROMERO et al., 2004).

Dentre os principais tópicos abordados nos estudos que avaliam a resposta imune na infecção humana por parasitos do gênero *Leishmania*, vários aspectos são amplamente investigados. Alguns estudos visam compreender melhor, os mecanismos imunológicos envolvidos na resistência/susceptibilidade desse complexo de doenças, enquanto outros focalizam na participação diferenciada dos compartimentos celular e humoral da resposta imune, com ênfase em aspectos imunofenotípicos de células da imunidade inata e da resposta adaptativa. Ainda, no âmbito da resposta imune, diversos trabalhos demonstram que no decurso da infecção, a expressão diferencial de citocinas é um fator que controla a imunopatogenia da LCL (MELBY et al., 1994; ROCHA et al., 1999).

Embora alguns dos elementos envolvidos no desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas das leishmanioses já tenham sido descritos, estudos adicionais fazem-se ainda necessários para a compreensão da dinâmica desse processo. O estudo da participação de diferentes populações celulares nos eventos de resistência e susceptibilidade chama a atenção para o envolvimento tanto da resposta imune celular, como humoral. Nesse contexto, a detecção de moléculas expressas na superfície de células tem permitido um grande avanço na pesquisa científica aplicada ao estudo de doenças infecto-parasitárias humanas. Empregando sistemas de análises imunofenotípicas mais elaborados e protocolos experimentais mais atuais, torna-se possível ainda, a análise simultânea de um maior número de moléculas por superfície celular, possibilitando a identificação e/ou caracterização de novas subpopulações celulares. Esse tipo de abordagem oferece assim, informações adicionais que podem enriquecer os conhecimentos acerca das diferentes manifestações clínicas da LTA.

Nesse trabalho, desenvolvemos um estudo de aspectos imunofenotípicos de leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de LCL numa abordagem “cross-seccional” que permitiu avaliar o impacto de diferentes aspectos clínico-laboratoriais relevantes no contexto da LCL, aqui denominados “número de lesões”, “tempo de lesão” e “positividade no teste de Montenegro”. A partir dos resultados obtidos, elaboramos 4 diagramas (FIG. 45A, B, C e D) com o objetivo de permitir uma análise mais detalhada das diferenças observadas entre os grupos avaliados.

Para facilitar o entendimento das considerações propostas a partir dos resultados obtidos nesse estudo, apresentaremos a seguir uma discussão dirigida para cada objetivo específico proposto nesta investigação. Assim, inicialmente serão avaliados os

aspectos inerentes a LCL quando avaliamos o grupo de pacientes infectados em relação ao grupo controle (FIG. 45A). A seguir, serão abordados os aspectos imunofenotípicos especificamente identificados para cada subgrupo de pacientes portadores de LCL, categorizados em função dos aspectos clínico-laboratoriais avaliados (FIG. 45B, C e D).

Considerando as alterações fenotípicas observadas no grupo LCL para as células envolvidas na imunidade inata (FIG. 45A), nossos resultados sugerem o estabelecimento de um perfil complexo de eventos, com a presença simultânea de mecanismos relacionados à ativação – aumento na expressão de CD23 por monócitos (FIG. 11), uma elevada frequência de neutrófilos HLA-DR+ (FIG. 13) e CD23+ (FIG. 15) e mecanismos relacionados à modulação da resposta imune - diminuição no percentual de neutrófilos CD28+ (FIG. 12), além de uma queda na expressão de CD16 por neutrófilos (FIG. 14). A participação de células envolvidas na imunidade inata durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania* tem sido descrita por diversos autores. O papel protetor de monócitos através da atividade fagocítica e leishmanicida pela produção de TNF- $\alpha$  e NO tem sido amplamente investigada (VOULDOUKIS et al., 1995). Por outro lado, o papel de neutrófilos no contexto de LTA, tem sido recentemente descrito em modelo experimental murino de infecção com *L. major*, sugerindo a participação importante desses fagócitos nos eventos iniciais de instalação do processo infeccioso, sendo essas células as primeiras a chegarem no foco de infecção e o primeiro “habitat” das formas infectantes de *Leishmania* até o momento da chegada de macrófagos ao local da inoculação do parasito (AGA et al., 2002). Esse perfil misto de ativação/modulação de neutrófilos, paralelo com a hiperexpressão de CD23 por monócitos sugere que esses eventos heterogêneos poderiam não estar ocorrendo simultaneamente e que, na verdade a existência de outros fatores, como por exemplo, a ausência de sincronidade de infecção no grupo de pacientes LCL ou diferenças em aspectos clínico-laboratoriais poderiam ser variáveis relevantes capazes de interferir no perfil imunofenotípico observado no grupo LCL. Essa hipótese será abordada oportunamente ao longo dessa discussão.

No compartimento de células envolvidas na imunidade adaptativa, ao avaliar no grupo LCL a frequência de células T ativadas, através da análise do marcador de ativação HLA-DR (KO et al., 1979), observamos uma elevação significativa em relação ao grupo controle (FIG. 17A), consistente com o envolvimento da imunidade celular nos

eventos imunológicos desencadeados pela infecção por *Leishmania* (LIEW & O'DONNELL, 1993). A resposta imune celular apresenta um papel importante nas infecções associadas à patógenos intracelulares (KAUFMANN, 1993). A LCL apresenta uma relevante resposta mediada por células T, caracterizada por uma alta proliferação linfocitária frente a antígenos de *Leishmania* (CASTES et al., 1983; CARVALHO et al., 1985). Da CRUZ et al. (1994) associaram o envolvimento da resposta imune celular aos mecanismos de resistência na LCL. Estudos de GAAFAR et al. (1999), demonstraram a existência de um menor percentual de linfócitos T CD8+ ao diagnóstico, quando comparado aos valores observados em pacientes portadores de LCL durante o processo de cura pós-terapêutica, avaliando o PBMC desses pacientes. Estudos desenvolvidos por Da CRUZ et al. (1994) e COUTINHO et al. (1998) também chamam a atenção para presença de um maior percentual de linfócitos T CD8+ nas culturas de células de indivíduos curados, em relação aos indivíduos avaliados antes do tratamento, os quais apresentam um predomínio de linfócitos T CD4+. Esses autores acreditam que no processo de cura pós-terapêutica, mais importante que o predomínio de linfócitos T CD8+ seria o balanço entre as células T CD4+ e T CD8+, em que as primeiras teriam sua proporção diminuída durante o processo de cura. Em nosso estudo, a análise de subpopulações de células T ativadas no grupo LCL demonstrou um aumento significativo tanto de células T CD4+ (FIG. 17B), quanto de células T CD8+ ativadas (FIG. 17C). Essas alterações fenotípicas observadas reforçam a idéia que um perfil misto de ativação celular poderia ser consequência da ausência de sincronidade na infecção dos pacientes incluídos no grupo LCL e chamam a atenção para a necessidade de subcategorização dos pacientes portadores de LCL, a fim de avaliar se o aumento seletivo na freqüência dessas células poderia ser um reflexo de fatores clínico-laboratoriais distintos. Ainda, nesse contexto, a análise do balanço entre a ativação celular de linfócitos T CD4+/CD8+ seria um aspecto relevante a ser considerado como proposto por Da CRUZ et al. (1994) e COUTINHO et al. (1998).

A participação da resposta imune humoral na infecção por *Leishmania* ainda apresenta lacunas importantes e os resultados já apresentados parecem ainda controversos, visto que a maioria dos estudos chama a atenção para o papel protetor conferido pela resposta imune celular (LIEW & O'DONNELL 1993). Cabe salientar que nossos dados mostraram um aumento significativo na expressão de HLA-DR por células B circulantes (FIG. 20), além de uma elevação na freqüência de linfócitos B

ativados CD23+ (De MIGUEL et al., 2003) em indivíduos portadores da LCL (FIG. 21), confirmando o estado de ativação dessa população celular nos pacientes portadores de LCL.

Ao considerarmos os aspectos clínicos da LTA, diversos estudos chamam a atenção para a importância da análise de características consideradas relevantes, tais como: manifestação clínica da LTA (LCL, LMC ou LCD) (ROMERO et al., 2001), tamanho da intradermoreação de Montenegro (SOUZA-ATTA et al., 2002), número das lesões (ULRICH et al., 1988; MENDONÇA et al., 1988; SOUZA-ATTA et al., 2002), e tempo de evolução das lesões (ULRICH et al., 1988; MENDONÇA et al. 1988). Nesse contexto, nos propusemos avaliar o impacto do número de lesões no perfil imunofenotípico dos leucócitos circulantes em indivíduos portadores de LCL, como indicador clínico de morbidade da infecção. Para tal sub-categorizamos o grupo LCL em LCL-1 e LCL-2-4. Nossos dados demonstram de forma interessante, que existe uma alteração preferencial na população de linfócitos B no grupo LCL 2-4, com aumento significativo na frequência de linfócitos B circulantes (FIG. 37A), na subpopulação de células B convencionais (CD19+CD5-) (FIG. 38A) e de linfócitos B ativados (CD19+CD23+) (FIG. 41A). Esses aspectos imunofenotípicos celulares podem ser associados com os resultados descritos por MENDONÇA et al. (1988) que demonstraram níveis de IgG significativamente maiores em pacientes portadores de lesões múltiplas, quando comparados com pacientes apresentando lesão única. A presença de altos títulos de anticorpos específicos reflete a característica invasiva da infecção. Os resultados mostram que o predomínio de linfócitos B direciona a uma forma mais grave da infecção, como demonstrado por SCHURR et al. (1986) onde o elevado nível de anticorpos está associado às formas mais graves da leishmaniose, como por exemplo, a LCD. Essas observações são reforçadas por estudos desenvolvidos por PALANIVEL et al. (1996), que demonstraram o envolvimento das células B na manutenção da resposta do Tipo 2, através da produção de IL-10. Em conjunto, nossos dados confirmam através do perfil imunofenotípico, os achados sorológicos do maior envolvimento da resposta imune humoral em pacientes portadores de lesões múltiplas (MENDONÇA et al. 1988; MOSLEH et al., 1995).

Nossos dados referentes aos aspectos imunofenotípicos de células da imunidade inata, demonstraram um aumento seletivo de neutrófilos CD23+ no grupo de indivíduos portadores de lesões múltiplas. Estudos desenvolvidos por VELLA et al. (1999)

demonstraram que a expressão de CD23 por neutrófilos é regulada por IFN- $\gamma$ , reforçando a hipótese de que portadores de lesões múltiplas apresentam um predomínio de uma resposta imune do Tipo 2.

Na análise dos pacientes portadores de lesão única, torna-se evidente o predomínio de uma imunidade celular adaptativa, com um aumento de linfócitos T, paralelo a um aumento da razão entre linfócitos T CD8+ HLA-DR+/T CD4+ HLA-DR+ (FIG. 36A) e um aumento da razão entre linfócitos T HLA-DR+/CD19+ (FIG. 44A). Esses achados reforçam o envolvimento de células T CD8+ nos aspectos de proteção na infecção por *Leishmania* (Da CRUZ et al., 1994; COUTINHO et al., 1998; GAFFAR et al., 1999).

Ainda considerando os aspectos clínicos relevantes na LTA, existem relatos acerca da influência do tempo de evolução da lesão sobre o perfil imunológico associado aos fatores inerentes aos eventos de instalação do processo infeccioso, bem como no controle ou progressão da infecção (SOUZA-ATTA et al., 2002). Nesse sentido, nos propusemos avaliar impacto do tempo de evolução das lesões cutâneas no perfil imunofenotípico dos leucócitos circulantes de indivíduos portadores de LCL, classificando-os em função do tempo de lesão em dois grupos distintos: portadores de lesão recente (LCL $\leq$ 60) e portadores de lesões crônicas (LCL $>$ 60), segundo proposto por CARVALHO et al. (1985).

Nossos resultados demonstraram de forma interessante, que pacientes portadores de lesões recentes (LCL $\leq$ 60) apresentaram alterações no perfil imunofenotípico de neutrófilos circulantes com aspectos tipicamente relacionados com a ativação/modulação de eventos da imunidade inata, incluindo um aumento significativo no percentual de neutrófilos HLA-DR+ (FIG.27B), neutrófilos CD23+ (FIG. 29B) e queda na frequência de neutrófilos CD28+ (FIG. 26B). Esses resultados sugerem a existência de uma possível dualidade no papel de neutrófilos nos eventos imunológicos desencadeados pela infecção por *Leishmania*.

Os estudos acerca dos neutrófilos têm mostrado sua grande importância em eventos iniciais da infecção por *Leishmania*, participando ativamente do processo complexo de atividades que podem determinar o estabelecimento da doença ou controle do processo infeccioso (SANDILANDS et al., 2003). Na verdade, a literatura carece de uma melhor elucidação sobre o papel dos neutrófilos nas infecções por *Leishmania*, uma vez que há trabalhos que relatam uma atividade protetora (RIBEIRO-

GOMES et al., 2004) e outros uma atividade facilitadora em relação ao estabelecimento da infecção (TACCHINI-COTTIER et al., 2000). RIBEIRO-GOMES et al. (2004) através de estudos em modelo experimental, demonstraram que a depleção de PMN em camundongos BALB/c reduz a carga parasitária, enquanto que, em camundongos B6 observa-se uma exacerbação da infecção. TACCHINI-COTTIER et al., (2000) demonstraram que os neutrófilos contribuem para o desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, além de influenciar no desenvolvimento da resposta do Tipo 2.

Ressaltando essa dualidade do papel de neutrófilos no processo infeccioso, van ZANDBERGEN et al. (2002) demonstraram que, em camundongos, após a infecção com *L. major*, os parasitos secretam um fator quimiotático para neutrófilos – *Leishmania* chemotactic factor (LCF), sendo interiorizados por essas células que migram para o local da infecção. Além disso, nos neutrófilos em que se encontram as *Leishmanias* interiorizadas, ocorre a liberação de IL-8, promovendo seu próprio recrutamento.

Os neutrófilos funcionam então, como um reservatório para a *Leishmania*, e são estimulados a secretarem fatores quimiotáticos também para macrófagos, como CCL-3 (MIP-1 $\alpha$ ) e CCL-4 (MIP-1 $\beta$ ) (proteína inflamatória de macrófago 1 $\alpha$  e 1 $\beta$ , respectivamente). Após 2-3 dias da infecção, os neutrófilos sofrem apoptose, os macrófagos recrutados fagocitam os neutrófilos, agora como corpos apoptóticos (SAVILL et al., 1989; van ZANDBERGEN et al., 2004), identificados através da fosfatidilserina, molécula expressa na superfície das células que sofreram apoptose (FADOK et al., 1992). Essas células apoptóticas funcionam como um mecanismo indireto de transmissão da *Leishmania*, uma vez que são fagocitadas pelos macrófagos. O tempo de vida dos neutrófilos na circulação é de 6-10 horas, após esse período sofrem apoptose. Essas células podem ter o período de vida prolongado, quando incubadas *in vitro* com citocinas pró-inflamatórias, como fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), IL-8, IL-1 $\beta$ , glicocorticóides e produtos bacterianos (COLLOTA et al., 1992). AGA et al. (2002), têm mostrado que as *Leishmanias* também podem estender o período de vida dos neutrófilos, interferindo na via da caspase-3, impedindo, por certo tempo, que essas células sofram apoptose. O tempo do efeito anti-apoptótico é o necessário para manter as *Leishmanias* vivas até o momento da chegada dos macrófagos, ocorrendo, então a apoptose dos neutrófilos infectados, sendo fagocitados pelos macrófagos. Essa

pode ser uma via silenciosa que os parasitos utilizam para entrar nos macrófagos. Após a ingestão dos corpos apoptóticos dos PMN infectados, os macrófagos liberam citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$ . As *Leishmanias* internalizadas por essa via indireta sobrevivem e multiplicam-se nos macrófagos (van ZANDBERGEN et al., 2004).

Entretanto, os neutrófilos podem destruir as *Leishmanias* por enzimas proteolíticas e por oxigênio reativo (REMALEY et al., 1984), sendo assim, além da capacidade migratória e atividade microbicida, os neutrófilos podem também funcionar com um reservatório para a *Leishmania* como mencionado anteriormente.

Os estudos que avaliam os eventos de alterações fenotípicas dos neutrófilos demonstram que a ligação cruzada de CD28 nos neutrófilos do sangue periférico humano resulta no aumento inicial da expressão do receptor A de IL-8 (IL-8RA ou CXCR-1), havendo um aumento da quimiotaxia induzida por IL-8. Foi demonstrado, portanto, o importante papel da molécula CD28 na regulação da expressão de CXCR-1 e na migração de neutrófilos em resposta ao IL-8 (VENUPRASAD et al., 2001). Ainda, com base nas mudanças do fenótipo celular envolvido no processo migratório, JOLLY et al. (2004) observaram que o receptor para IgE de alta afinidade, Fc $\epsilon$ RI, está envolvido no processo de recrutamento das células ao foco inflamatório. De acordo com MONTESEIRIN et al. (2005), o bloqueio do receptor para IgE de baixa afinidade, Fc $\epsilon$ RII, induz uma baixa modulação na expressão de CD62L (L-selectina – molécula de adesão) na superfície dos neutrófilos. Esses dados corroboram com os nossos achados, uma vez que encontramos uma diminuição do percentual de neutrófilos CD28<sup>+</sup> (FIG. 26B) e um aumento na frequência de neutrófilos CD23<sup>+</sup> (FIG. 29B) no grupo de pacientes portadores de lesões recentes (LCL $\leq$ 60), indicando que a diminuição de CD28 e o aumento de CD23 nos neutrófilos são indicadores do aumento da migração dessas células ao foco inflamatório. Além disso, encontramos um aumento no percentual de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> nos pacientes com lesões recentes (FIG. 27B), reforçando o processo de migração dessas células ao local da injúria, visto que LEI et al. (2001) observaram que a ligação cruzada do MHC II com antígenos induz a produção de IL-8 por neutrófilos humanos.

Ainda avaliando a expressão de marcadores de superfície nos neutrófilos circulantes, observamos de maneira interessante, uma diminuição da expressão de CD16 (Fc $\gamma$ RIII) em neutrófilos nos indivíduos com lesão recente e tardia (FIG. 28B), com uma queda mais acentuada no grupo LCL $>$ 60. RAVETCH & PERUSSIA (1991)

mostraram que neutrófilos expressam constitutivamente o receptor de baixa afinidade para IgG (FcγRIIIb/CD16). A estimulação celular através dos FcγRs pode resultar na modulação da expressão desse receptor na superfície celular bem como na indução de várias funções efetoras, estando envolvidas na geração de produtos oxidativos, na fagocitose, na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (HULETT & HOGARTH, 1994). A diminuição da expressão de CD16 resulta da interação desses receptores com imunocomplexos (FOSSATI et al., 2002). Esse resultado mostra o envolvimento da resposta imune humoral nos pacientes com LCL, principalmente na fase tardia de infecção.

Embora LAUFS et al. (2002) tenham demonstrado que a fagocitose de *Leishmanias* por neutrófilos possa ocorrer tanto na presença quanto na ausência de opsoninas, os parasitos fagocitados na ausência de opsoninas sobrevivem no interior dos neutrófilos por até um dia. Em conjunto, esses dados associados aos nossos achados imunofenotípicos, reforçam a hipótese para um papel duplo de neutrófilos durante a infecção por *Leishmania*, podendo contribuir tanto para a manutenção dos parasitos no seu interior nos eventos mais precoces (LCL≤60), quanto para a eliminação do parasito nos eventos tardios dependendo de outros fatores gerados no microambiente da infecção.

Dando suporte a essa hipótese, nossos resultados mostram um aumento na expressão de HLA-DR em linfócitos B como um indicador imunofenotípico de maior envolvimento da imunidade humoral nos eventos tardios da LCL. Avaliando a expressão de HLA-DR+ por linfócitos B (CD19+HLA-DR+), observamos um aumento significativo no grupo LCL>60, em relação ao grupo LCL≤60 (FIG. 40B). Essa informação é consistente com os relatos de baixos níveis de reatividade sérica de IgG anti-*Leishmania* encontrados em pacientes portadores da LTA com lesões cutâneas únicas ou recentes (ULRICH et al., 1988; MENDONÇA et al., 1988). CONVIT et al. (1993) mostraram que anticorpos específicos anti-*Leishmania* apresentam baixos níveis de reatividade sérica nos casos de lesão recente, enquanto CHIARI et al. (1973) relatam, inclusive, observações de negatividade sorológica em pacientes com lesões recentes. Além disso, dados obtidos, recentemente, em nosso laboratório, avaliando especificamente os grupos de pacientes incluídos nesse estudo, demonstram que o grupo LCL≤60 apresenta, geralmente, níveis menores de reatividade de IgG anti-formas promastigotas vivas de *L. braziliensis*, avaliados através da citometria de fluxo

(ROCHA, R.D. 2005, comunicação pessoal). Ainda, nesse contexto, VIEIRA et al. (2002) sugerem que a produção de anticorpos, preferencialmente IgG1, poderia estar envolvida nos eventos de opsonização mais efetiva, havendo, dessa forma, uma melhor contenção da infecção.

Assim, partindo dessas informações, em associação com os nossos resultados, observamos uma maior participação da resposta imune humoral na fase tardia da LCL. Considerando ainda que a expressão de CD16 por neutrófilos pode estar associada aos mecanismos efetores de IgG, nossos dados imunofenotípicos de linfócitos B, pareados com relatos prévios de ROCHA, R.D. (2005, comunicação pessoal) sobre a reatividade sorológica de IgG anti-*Leishmania* desses indivíduos, reforçam a hipótese de que a diminuição da expressão de CD16 por neutrófilos na fase tardia de infecção, evidencia a participação mais efetiva de mecanismos de interface da resposta imune celular inata e humoral adaptativa nos eventos tardios na LCL.

Em contraposição aos achados imunofenotípicos observados em pacientes do grupo LCL $\leq$ 60, nossos resultados demonstraram que pacientes portadores de lesões tardias (LCL $>$ 60) apresentam um perfil imunológico mais relacionado com uma possível polarização da resposta imune para um padrão de reatividade da imunidade adaptativa, destacando-se, além das alterações fenotípicas em linfócitos B, previamente abordadas nessa seção, um típico balanço relacionado à imunidade protetora anti-*Leishmania* dado pelo aumento da razão entre linfócitos T CD8+HLA-DR+/CD4+HLA-DR+ (FIG. 36B).

Embora, nesse estudo, não tenha sido contemplado a análise do perfil de citocinas produzido por essas células, MASINI, A.B. (2005, comunicação pessoal) demonstraram que indivíduos portadores de lesão crônica apresentam um predomínio de uma resposta imune do Tipo 1, gerando assim um microambiente favorável ao desencadeamento de mecanismos celulares de imunidade adaptativa imunoprotetores que participariam efetivamente no processo de resolução da infecção, através de mecanismos leishmanicidas múltiplos. Consistente com essas observações, MASINI, A.B. (2005, comunicação pessoal) observou um número maior de células T CD4+ IFN- $\gamma$  positivas no grupo de pacientes com lesão recente. No entanto, a produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8+ foi significativamente maior no grupo de pacientes portadores de lesão tardia. Esses relatos em conjunto com o predomínio de linfócitos T CD8+/CD4+

ativados no grupo LCL>60 (FIG. 36B) reforçam as hipóteses da importância de linfócitos T CD8+ nos eventos protetores na LCL (Da CRUZ et al., 1994; MENDONÇA et al., 1995).

Ao considerar os aspectos laboratoriais na LTA, as principais investigações demonstram a importância da análise de características relevantes, tais como: reatividade sorológica e, principalmente a positividade no teste de Montenegro. Nesse estudo, avaliamos o impacto da positividade do teste de Montenegro, como indicador laboratorial da presença de eventos imunoprotetores em indivíduos portadores de LCL, sub-categorizados com LCL-TM- e LCL-TM+. O teste de intradermoreação de Montenegro detecta a presença da hipersensibilidade tardia, revelando a capacidade do paciente em elaborar uma resposta imune celular frente a antígenos do parasito, sendo um procedimento amplamente utilizado no diagnóstico laboratorial de LTA. A reação positiva manifesta-se através do desenvolvimento de uma endureção local cerca de 48 a 72 horas após a inoculação do antígeno. Normalmente, a positividade do teste ocorre por volta de alguns meses após início da lesão cutânea, e dessa forma, é bastante freqüente o fato de pacientes com lesões recentes apresentarem resultados negativos no teste (MONTENEGRO, 1926). Nossos resultados demonstraram que o grupo LCL-TM+ apresentou um conjunto de alterações fenotípicas indicadoras de maior envolvimento de eventos da imunidade celular inata e adaptativa, incluindo um aumento na expressão de CD23 por monócitos circulantes (FIG. 25C), uma elevação na freqüência de linfócitos T CD8+ circulantes com maior razão entre células T CD8+/CD4+ ativadas (FIG. 36C).

Os estudos que avaliam o papel da imunidade celular no contexto da LTA demonstram que a resposta imune inata é muito importante como um mecanismo de defesa, contendo a disseminação da infecção, bem como, secretando citocinas que contribuem para a manutenção do microambiente, no qual as células T serão primadas, promovendo o estabelecimento de uma imunidade adquirida efetiva contra os parasitos. Nesse contexto, VOULDOUKIS et al. (1995) observaram que a ligação do receptor CD23 (FcεRII) por IgE resulta na produção de NO, promovendo a morte da *Leishmania* no interior dos macrófagos, mesmo na ausência de TNF-α. Acreditamos que o aumento na expressão de CD23 em monócitos observado no grupo LCL-TM+ (FIG. 25C), poderia refletir um aspecto imunofenotípico da imunidade inata, estando diretamente associado à imunidade celular leishmanicida. Os dados encontrados na análise dos

linfócitos T e subpopulações ativadas nos permitem especular que a resposta imune inata estaria criando um microambiente com predomínio das citocinas do Tipo 1, favorecendo o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, efetiva para a ativação dos mecanismos leishmanicidas pela interação dos eventos da imunidade inata e adaptativa.

Em suma, nossos resultados mostraram que os mecanismos imunológicos que acompanham a infecção humana por *Leishmania* são constituídos de eventos complexos, multifatoriais que envolvem o estabelecimento concomitante de ativação e imunorregulação do compartimento da imunidade inata bem como aspectos fenotípicos sugestivos da ativação paralela da imunidade celular e humoral. Esse perfil complexo e, a princípio controverso de alterações fenotípicas pode ser parcialmente esclarecido, quando consideramos a importância do impacto diferencial de aspectos clínico-laboratoriais nos parâmetros fenotípicos da resposta imune de indivíduos portadores de LCL. Nesse contexto, observamos um predomínio de alterações fenotípicas associadas à imunidade celular em indivíduos portadores de lesão única e um maior envolvimento da imunidade humoral em portadores de lesões múltiplas. Foi possível também identificar uma dinâmica nos eventos imunológicos na LCL, com alterações em parâmetros da imunidade inata, mais freqüentemente observados em portadores de lesão recente, enquanto o envolvimento da resposta imune adaptativa foi preferencialmente detectado em portadores de lesão crônica. Ainda, os aspectos imunofenotípicos da imunidade inata e adaptativa, diretamente associados à imunidade celular leishmanicida, foram seletivamente identificados em associação com a positividade no teste de Montenegro.

**Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa na Leishmaniose Tegumentar Americana**

---

**CONCLUSÕES**

1. Pacientes portadores de LCL apresentam alterações no perfil fenotípico de leucócitos circulantes, sugestivas do estabelecimento concomitante de ativação (▲Monócitos CD23+, ▲Neutrófilos HLA-DR+, ▲Neutrófilos CD23+) e imunorregulação (▽Neutrófilos CD28+, ▽Neutrófilos CD16+) do compartimento da imunidade inata;

2. No âmbito da imunidade adaptativa, observa-se um perfil misto, com envolvimento de aspectos fenotípicos sugestivos da ativação paralela da imunidade celular e humoral (▲LTHLADR+, ▲LTCD4+HLADR+, ▲LTCD8+HLADR+, ▲LBHLADR+, ▲CD19+CD23+).

3 a. Há um predomínio de alterações fenotípicas associados á imunidade celular no grupo LCL-1 (▲LTCD8+HLADR+/CD4+HLA-DR+, ▲LTHLADR+/LB), com maior prevalência de alterações em aspectos da imunidade humoral no grupo LCL-2-4 (▲LB, ▲CD19+CD5-, ▲CD19+CD23+), o que reforça o envolvimento da imunidade celular mediada por linfócitos T CD8+ nos eventos protetores e dos mecanismos de imunidade humoral nos aspectos de morbidade durante a infecção pela *Leishmania*.

3 b. A categorização do grupo LCL em função do tempo de lesão, permitiu identificar uma dinâmica nos eventos da imunidade inata, mais freqüente em portadores de lesão recente LCL≤60 (▽ Neutrófilos CD28+, ▲ Neutrófilos HLA-DR+, ▲ Neutrófilos CD23+) e adaptativa, preferencialmente detectadas em portadores de lesão crônica LCL>60 (▲ LTCD8+HLADR+/CD4+HLA-DR+, ▲HLADR em LB), mantendo-se um perfil misto de imunidade celular e humoral em portadores de lesão crônica.

3 c. Seletivos do grupo LCL-TM+, foram os aspectos imunofenotípicos da imunidade inata e adaptativa diretamente associados à imunidade celular leishmanicida (▲ CD23 em Monócitos, ▲LTCD8+HLADR+/CD4+HLA-DR+, ▲LTHLA-DR+/LB).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ADJARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, H.M.; ESLAMI, B.M.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection, **Infection and Immunity**, v. 68,n. 4, p. 1760-1764, 2000.
2. AGA, E.; KATSCHINSKI, D.M.; van ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T.J. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*, **J Immunol.**, v. 169, n. 2, p. 898-905, 2002.
3. BABAI, B.; LOUZIR, H.; CAZENAVE, P.A.; DELLAGI, K. Depletion of peritoneal CD5+ B cells has no effect on the course of the *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, p. 123-129, 1999.
4. BACKSTROM, E.; KRISTENSSON, K., LJUNGGREN, G. Activation of Natural Killer Cells: Underlying Molecular Mechanisms Revealed. **Scandinavian Journal of Immunology**,; v. 60, p. 14-22, 2004.
5. BADARO, R. and JOHNSON WD JR. The role of interferon-gamma in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**; v. 169, n. 1, p. 233-238, 1994.
6. BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W.D. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 487-497, 1987.
7. BELGE, K.U.; DAYYANI F.; HORELT, A., SIEDLAR, M., FRANKENBERGER, M., FRANKENBERGER, B.; ESPEVIK, T.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J. Immunol.**, v. 168, n. 7, p. 3536-3542, 2002.

8. BOURREAU, E.; GARDON, J.; PRADINAUD, R.; PASCALIS, H.; PRÉVOT-LINGUET, G.; KARIMINIA, A.; PASCAL, L. TH2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of TH1 responses. **American Society for Microbiology**,; v. 71, n. 4, p. 2244-2246, 2003.
9. CABRERA, M.; RODRIGUEZ, O.; MONSALVE, I.; TOVAR, R.; HAGEL, I. Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 88, p. 145-151, 2003.
10. CACERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F.J.; SANCHEZ, M.A.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, R.L.; BLOOM, B.R.; CONVIT, J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clin Exp Immunol**,v. 91,n. 3,p. 500-505,1993.
11. CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA, J.L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis, **J. Immunol.**, v.135, n. 6, p.4144-4148, 1985.
12. CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDON, A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 27, n. 2, p. 176-186, 1983.
13. CHIARI, A.C.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, A.P. Reação de imunofluorescência indireta no controle de tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 15, n. 5, p. 298-303, 1973b.
14. COLOTTA, F.; RE, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI,S.; MANTOVANI,A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, v. 80, p. 2012-2020, 1992.

15. CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, C.T.; TAPIA, F.J.; CACERES-DITTMAR, G.; CASTES, M.; RONDON, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; v. 87, n. 4, p. 444-448, 1993.
16. COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; DA-CRUZ, A.M.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.; BERTHO, A.L.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Exp Parasitol.** v. 84, n. 2, p. 144-155, 1996.
17. COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; SANTIAGO, M.A.; DE-LUCA, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 31, n. 1, p. 139-142, 1998.
18. DA-CRUZ, M.A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; BERTHO, L.A.; COUTINHO, G.S. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis, **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p.2614-2618, 1994.
19. DA-CRUZ, A.M.; FILGUEIRAS, D.V.; COUTINHO, Z.; MAYRINK, W.; GRIMALDI, G. JR.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.; COUTINHO, S.G. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, n. 4, p. 537-542, 1999.
20. DECKER, D.; SPRINGER, W.; DECKER, P.; TOLBA, R.; REMIG, J.; STRUNK, H.; von RUECKER, A. Changes in TH1/TH2 immunity after endovascular and conventional infrarenal aortic aneurysm repair: its relevance for clinical practice. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 25, n. 3, p. 254-261, 2003.
21. De MIGUEL, S.; JOVER, J.A.; VADILLO, C.; JUDEZ, E.; LOZA, E.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, B. B cell activation in rheumatoid arthritis patients under infliximab treatment. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 21, n. 6, p. 726-732, 2003.

22. De LIMA BARROS, M.B.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ET AL. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta Trop.**, v. 93, n. 1, p. 41-47, 2005.
23. ESTERRE, P.; DEDET, J.P.; FRENAY, C.; CHEVALLIER, M.; GRIMAUD, J.A. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study, **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 421, n. 3, p. 239-247, 1992.
24. FADOK, V.A.; SAVILL, J.S.; HASLETT, C.; BRATTON, D.L.; DOHERTY, D.E.; CAMPBELL, P.A.; HENSON, P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 149, n. 12, p. 4029-4035, 1992.
25. FOSSATI, G.; MOOTS, R.J.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Differential role of neutrophil Fcγ3 receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. **Arthritis Rheum.**; v. 46, n. 5, p. 1351-1361, 2002.
26. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil e 1980 a 1988. Disponível em <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em:01/08/2002. Boletim Epidemiológico – Edição especial, Brasília, 3:15-16,1999.
27. GAAFAR, A.; VERESS, B.; PERMIN, H.; KHARAZMI, A.; THEANDER, G.T.; EL HASSAN, M.A. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*, **Clinical Immunology**, v. 91, n. 3, p. 314-320, 1999.
28. GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G.H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L.B.; SANTRICH, C.V.; SARIVA, N.G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**,; v. 45, n. 3, p. 281-289, 1991.

29. GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990.
30. GRIMALDI, G.; TESH, R.B., McMAHON-PRATT, D. A Review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**,; v. 41, p. 687-725, 1989.
31. GRIMALDI, G. JR. and TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**; v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
32. HEINZEL, P.F.; SADICK D.M.; HOLADAY, J.B.; COFFMAN, L.R.; LOCKSLEY M.R. Reciprocal expression of interferon  $\gamma$  or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis, **J. Exp. Med.**, v. 169; p. 59-72, 1989.
33. HOERAUF, A.; LOHOFF, M.; ROLLINGHOFF, M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. **Int. Immunol.**, v. 6, p. 1117-1124, 1994.
34. HOWARD, J.G.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W.L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 303-314, 1980.
35. HULETT, M. and HOGARTH, P.M. Molecular basis of Fc receptor function. **Adv. Immunol.**; v. 57, p. 1-127, 1994.
36. JOLLY, S.P.; BEKTAS, M.; OLIVERA, A.; GONZALEZ-ESPINOSA, C.; PROIA, L.R.; RIVERA, J.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Transactivation of Sphingosine-1-phosphate receptors by Fc $\epsilon$ RI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. **The Journal of Experimental Medicine**,; v. 199, n. 7, p. 959 – 970, 2004.

37. KAUFMANN, S.H. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p.129-163, 1993.
38. KO HS, FU SM, WINCHESTER RJ, YU DT, KUNKEL HG. La determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells. **J Exp Med.**, v. 150, n. 2, p. 246-255, 1979.
39. KUBEYINJE, E.P.; BELAGAVI, C.S.; JAMIL, Y.A. Cutaneous leishmaniasis in expatriates in Northern Saudi Arabia. **East. Afr. Med. J.**, v. 74, n. 4, p. 249-251, 1997.
40. LABRADA, M.; WEIGLE, K.; VALDERRAMA, L.; SARAIVIA, N.G. Evaluation of immunoglobulin isotype specific to Leishmania in tegumentary American leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 3, p. 409-416, 1989.
41. LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.) **The leishmaniasis in Biology and Medicine**. Londres: Academic Press Inc, 1987. p. 1-120. (Biology and Epidemiology, v. 1).
42. LARA, M.L.; LAYRISSE, Z.; SCORZA, J.V.; GARCIA, E.; STOIKOW, Z.; GRANADOS, J.; BIAS, W. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. **Hum. Immunol.**, v.30, n. 2, p. 129-135, 1991.
43. LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C. Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Inf. Immunol.**, v. 70, p. 826-835, 2002.
44. LEI, L.; ALTSTAEDT, J.; von der OHE, M.; PROFT, T.; GROSS, U.; RINK, L. Induction of interleukin-8 in human neutrophils after MHC class II cross-linking with superantigens. **J. Leukoc. Biol.**; v. 70, n. 1, p. 80 - 86, 2001.

45. LIEW, F.Y. and O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 32, p. 161-259. 1993.
46. LIMA, H.C.; VASCONCELOS, A.W.; DAVID, J.R.; LERNER, E.A. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 50, n. 6, p. 743-747, 1994.
47. LOCKSLEY, R.M.; HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; GARDNER, K.D.JR. Murine cutaneous leishmaniasis susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v. 138, n. 5, p. 744-749, 1987.
48. MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.
49. MARZOCHI, M.C. A Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J. Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.
50. MARZOCHI, M.C.A. and MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 162-164, 1997.
51. MARTINEZ-ARENDS, A.; TAPIA, F.J.; CACERES-DITTMAR, G.; MOSCA, W.; VALECILLOS, L.; CONVIT, J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. **Acta Trop.**, v. 49, n. 4, p. 271-280, 1991.
52. MAASHO, K.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E.; HAILU, A.; AKUFFO, H. Indications of protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. **Infect. Immun.**, v. 66, n.6, p. 2698-2704, 1998.
53. MAYRINK, W.; DA COSTA, C.A.; MAGALHAES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; LIMA, A.O.; MICHALICK, M.S.; WILLIAMS, P. A field trial of a vaccine against American

dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society**, v. 73, n. 4, p. 385-387, 1979.

54. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M.V.; DIAS, M.; MARTINS, A.V.; MAGALHAES, P.A.; DA COSTA, C.A.; FALCAO, A.R.; MELO, M.N.; FALCAO, A.L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 73, n. 2, p. 123-37, 1979.
55. MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, C.A.; MAGALHAES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A.; MICHALICK, M.S.; FERREIRA CARVALHO, E.; BARROS, G.C.; ET AL. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espirito Santo, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**,v.79,n.3,p.259-269,1985.
56. MELBY, C.P.; ANDRADE-NARVAEZ, J.F.; DARNELL, J.B.; VALENCIA-PACHECO, G.; TRYON, V,V.; PALOMO-CETINA A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis, **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 837-842, 1994.
57. MENDONÇA, S.C.; SOUZA, W.J.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 347-355, 1988.
58. MENDONÇA, C.F.S.; De LUCA, M.P.; MAYRINK, W.; RESTOM, G.T.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; Da-CRUZ M.A.; BERTHO, L.; COSTA, A.C.; GENARO, O.; TOLEDO, P.C.P.V.; COUTINHO, S. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 2, p. 195-201, 1995.
59. MONTENEGRO, J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 13, p. 187, 1926.

60. MODLIN, R.L.; TAPIA, F.J.; BLOOM, B.R.; GALLINOTO, M.E.; CASTES, M.; RONDON, A.J.; REA, T.H.; CONVIT, J. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 60, n. 2, p. 241-248, 1985.
61. MOSLEH, I.M.; SALIBA, E.K.; AL-KHATEEB, M.S.; BISHARAT, Z.; OUMEISH, O.Y.; BITAR, W. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta Trop.**, v. 59, n. 2, p. 163-72, 1995.
62. MONTESEIRIN, J.; CHACON, P.; VEJA, A.; SANCHEZ-MONTESEIRIN, H.; ASTURIAS, J.A.; MARTINEZ, A.; GUARDIA, P.; PEREZ-CANO, R.; CONDE, J. L-selectin expression on neutrophils from allergic patients. **Clin. Exp. Allergy.**; v. 35, n. 9, p. 1204-1213, 2005.
63. MULLER, K.; van ZANDBERGEN G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural Killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, n. 1-2, p. 73-76, 2001.
64. OLIVO-DIAZ, A.; DEBAZ, H.; ALAEZ, C.; ISLAS, V.J.; PEREZ-PEREZ, H.; HOBART, O.; GORODEZKY, C. Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. **Hum. Immunol.**, v. 65, n. 3, p. 255-261, 2004.
65. O'NEIL, C.E.; LABRADA, M.; SARAVIA, N.G. *Leishmania (Viannia) panamensis*-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 49, n. 2, p. 181-188, 1993.
66. PALANIVEL V, POSEY C, HORAUF AM, SOLBACH W, PIESSENS WF, HARN DA. B-cell outgrowth and ligand-specific production of IL-10 correlate with Th2 dominance in certain parasitic diseases. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 68-77, 1996.

67. PEARSON, R.D. and STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.
68. PIRMEZ, C.; COOPER, C.; PAES-OLIVEIRA, M.; SCHUBACH, A.; TORIGIAN, K.V.; MODLIN, L.R. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesion, **J. Immunol.**, v. 145, n. 9, p. 3100-3104, 1990.
69. POMPEU, M.M.L.; BRODSKY, C.; TEIXEIRA, M.J.; CLARÊNCIO, J.; VAN WEYENBERG, J.; COELHO, I.C.B.; CARDOSO, S.A.; BARRAL, A., BARRAL-NETO, M. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7453-7460, 2001.
70. RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.
71. RAVETCH, J.V. and PERUSSIA, B. Alternative membrane forms of FcγRIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. **J. EXP. MED.**, v. 170, p. 481-497, 1989.
72. REMALEY, A.T.; KUHNS, D.B.; BASFORD, R.E.; GLEW, R.H.; KAPLAN, S.S. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 18, p. 11173-11175, 1984.
73. RIBEIRO-GOMES, F.L.; OTERO, A.C.; GOMES, N.A.; MONIZ-DE-SOUZA, M.C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A.C.; CALICH, V.L.; COUTINHO, S.G.; LOPES, M.F.; DOSREIS, G.A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.
74. ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; DE JESUS, A.R.; FILHO, D.C.; FILHO, A.C.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO, E.M. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 5,

---

p. 1731-1734, 1999.

75. ROMERO, A.S.G.; GUERRA, V.F.M.; PAES, G.M.; MACEDO, O.V. LR; Comparison of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical findings and diagnostic approach. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1304-13012, 2001.
76. ROMERO, H.D.; TARANTO, N.J.; MALCHIODI, E.L. American integumentary leishmaniasis associated with AIDS in Argentina. **Medicina (B Aires)**, v. 64, n. 1, p. 47-50, 2004.
77. ROSS, R, Further notes on *Leishmania's* bodies. **British Medical Journal**, v. 11,p. 1401, 1903.
78. SACKS, D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* Promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, p.100-103, 1989.
79. SARAIVA, N.G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN A.F.; NAVAS, C.; PALMA, G.; WEIGLE, K.A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J. Infec. Dis.*, v. 159, p. 725-735, 1989.
80. SANDILANDS, G.P.; HAUFFE, B.; LOUDON, E.; MARSH, A.G.; GONDOWIDJOJO, A.; CAMPBELL, C.; FERRIER, R.K.; RODIE, M.E. Detection of cytoplasmic CD antigens within normal human peripheral blood leucocytes. **Immunology**, v. 108, n. 3, p. 329-337,2003.
81. SAVILL, J.S.; WYLLIE, A.H.; HENSON, J.E.; WALPORT, M.J.; HENSON, P.M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **J. Clin Invest.**, v. 83, n. 3, p.865-875, 1989.

82. SCHURR, E.; KIDANE, K.; YEMANEBERHAN, T.; WUNDERLICH, F. Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre. **Trop. Med. Parasitol.**; v. 37, n. 4; p. 403-408, 1986.
83. SHAW, J. J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In: BURGUER, J. F. (Ed.) **Contributions to the Knowledge of Diptera: A collection of articles on Diptera Commemorating the life and work of Graham B. Fairchild.** Florida: Associated Publishers, 1999. p. 503-507. (Memoirs on Entomology, International, v.14).
84. SHORTT, H.E.; SMITH, R.O.A.; SWAMINATH, C.S.; KRISHNAN, K.V. Transmission of Kala-azar by the bite of *Phlebotomine argentipes*. **Indian Journal of Medical Research.**; v. 18, p. 1373-1375, 1931.
85. SILVEIRA, T.F.; LAISON, R.; CORBETT, E.P.C. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.
86. SOUSA-ATTA, M.L.; SALAME, G.S.; D'OLIVEIRA, A. JR.; ALMEIDA, R.P.; ATTA, A.M.; CARVALHO, E.M. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 101-104, 2002.
87. STENGER, S. and ROLLINGHOFF, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. **Ann. Rheum. Dis.**; v. 60, n. 3, p. 43-46, 2001.
88. STEVENS, T.L.; BOSSIE, A., SANDERS, V.M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R.L.; MOSMANN, T.R.; VITETTA, E.S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-258, 1988.
89. TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEI, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOUIS, J.A. An immunomodulatory function for neutrophils

during the induction of a CD4<sup>+</sup> Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol.** v. 165, n. 5, p. 2628-2636, 2000.

90. TOLEDO, V.P.; MAYRINK, W.; GOLLOB, K.J.; OLIVEIRA, M.A.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; PINTO, J.A.; AFONSO, L.C. Immunotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological aspects before and after treatment. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p.89-98, 2001.
91. ULRICH, M.; CENTENO, M.; MATTOU, Z.; CONVIT, J. Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 39, n. 2, p. 179-184, 1988.
92. van ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p.4177-4184, 2002.
93. van ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A., SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.
94. VELLA, A.; BELLAVITE, P.; ADAMI, A.; ORTOLANI, R.; BENONI, G.; CARLETTO, A.; BIASI, D.; CARAMASCHI, P.; TRIDENTE, G. Expression of FCepsilonII/CD23 on human neutrophils isolated from rheumatoid arthritis patients. **Inflammation.**, v. 23, n. 5, p.471-479,1999.
95. VENUPRASAD, K.; PARAB, P.; PRASAD, D.V.; SHARMA, S.; BANERJEE, P.R.; DESHPANDE, M.; MITRA, D.K.; PAL, S.; BHADRA, R.; MITRA, D.; SAHA, B. Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. **Eur J Immunol.**; v. 31, n. 5, p. 1536-1543, 2001.

- 
96. VIEIRA, M.G.S.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, A.L., BARBOSA, A.A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 979-983, 2002.
97. VOULDOUKIS, I., ISSALY, F., FOURCADE, C.; PAUL-EUGENE, N., AROCK M., KOLB, J.P., da SILVA, O.A.; MONJOUR L., POINSOT H., TSELENTIS Y. CD23 and IgE expression during the immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. **Res. Immunol.**, v.145, n. 1, p. 17-27, 1994.
98. VOULDOUKIS, I.; RIVEROS-MORENO, V.; DUGAS, B.; OUAAZ, F.; BÉCHEREL, P.; DEBRÉ, P.; MONCADA, S.; MOSSALAVYI, D. The killing of *Leishmania major* by human macrophage is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 7804-7808, 1995.
99. WEI, X.Q.; CHARLES, I.G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G.J.; HUANG, F.P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature** v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995.
100. WOODMAN, R.C.; JOHNSTON, B.; HICKEY, M.J.; TEOH, D.; REINHARDT, P.; POON, B.Y.; KUBES, P. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. **Exp. Med.**, v. 188, n. 11; p. 2181-2186, 1998.
101. World Health Organization (WHO), <http://www.who.int/tdr/dw/leish2004.htm>
102. ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. **Immunology**, v. 17, n. 9, p. 424-428, 1996.