

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS**

**TÍTULO: ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR *IN SITU* E  
*IN VITRO* DE PACIENTES COM LESÃO ATIVA OU CICATRIZ  
DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

**FERNANDA NAZARÉ MORGADO**

Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Pesquisa Clínica em Doenças  
Infecciosas

Orientação: Dra Fátima Conceição-Silva

Local: Laboratório de Imunoparasitologia – Departamento De Imunologia – IOC e  
Ambulatório de Leishmaniose Tegumentar Americana – CRLeish – IPEC.

**RIO DE JANEIRO**  
**FEVEREIRO 2007**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS**

**TÍTULO: ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR *IN SITU* E  
*IN VITRO* DE PACIENTES COM LESÃO ATIVA OU CICATRIZ  
DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

Dissertação apresentada por Fernanda Nazaré  
Morgado para conclusão do Curso de  
Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças  
Infecciosas - IPEC.

Orientação: Dra Fátima Conceição-Silva

Local: Laboratório de Imunoparasitologia – Departamento De Imunologia – IOC e  
Ambulatório de Leishmaniose Tegumentar Americana – CRLeish – IPEC.

RIO DE JANEIRO

FEVEREIRO 2007

Dedico este trabalho ao Raphael, pela sua integridade, companhia incessante e por me fazer enxergar que podemos sempre crescer.

“Tens que acreditar que os ventos soprarão,  
Crer na grama por baixo da neve.  
Ah, é por esta razão que o pássaro pode cantar:  
Em seu dia mais escuro, acredita na primavera.”

*(Autor desconhecido)*

Morgado, Fernanda

Análise da Resposta Imune Celular *in situ* e *in vitro* de Pacientes com Lesão Ativa ou Cicatriz de Leishmaniose Tegumentar Americana: / Fernanda Nazaré Morgado. - - Rio de Janeiro: IPEC-FIOCRUZ, 2007.

XII, 73 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Dra Fátima Conceição-Silva

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2007.

Referências bibliográficas: f. 88-98

1. Imunoparasitologia. 2. Imunopatogenia. 3. Imunologia celular. 4. Leishmaniose Tegumentar Americana. 5. Cicatriz – Tese. I. Conceição-Silva, Fátima. II. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Fátima Conceição-Silva, por todos esses anos de convívio e de amizade, pelo apoio e por tudo que me ensinou.

À Priscila Raibolt pela força nas tardes exaustivas de trabalho e pela amizade.

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunoparasitologia que muito me ajudaram e me encorajaram nos momentos mais difíceis.

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

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

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

À Marli e à Rosana pela calma de organizar o fluxo de pacientes do Ambulatório de Leishmaniose.

À Dra Ginelza dos Santos, cujo trabalho foi fundamental para a realização deste estudo, pois sem a sua insistência e simpatia nada teria acontecido.

Ao Dr Leonardo Quintella e toda equipe do Serviço de Anatomia Patológica do IPEC pelos exames histopatológicos.

Aos Srs. Genilton José Vieira e Rodrigo Mexas do Laboratório de Tratamento de Imagens- IOC, pelo auxílio na aquisição e formatação das figuras.

À Dra. Joseli Lannes Vieira pela cessão do aparelho e programa Soft Imaging System e à Srta. Valeska Vieira pelo auxílio na aquisição e análise das imagens.

Ao Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular pela utilização do criostato para a realização dos cortes dos tecidos estudados.

À Dra Claudia Maria Valette Rosalino pela revisão criteriosa desta dissertação.

Aos Drs Sergio Gomes Coutinho, Claudia Valette Rosalino, Paula Mello De Luca e Armando Schubach por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação. Desde já agradeço as críticas e sugestões.

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

A todos os professores do Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas-IPEC-FIOCRUZ pela dedicação e paciência.

Aos pacientes que padecem de Leishmaniose Tegumentar Americana, pois são o motivo para a realização do estudo e sem os quais ele seria impossível.

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

À Raphaela, meu estímulo, luz da minha vida, que enfeita meus dias com sua beleza, travessuras e alegria.

À minha mãezinha pelo amor, compreensão (mesmo quando parece impossível) e pelo amor que dedica à minha florzinha.

Ao meu avô Mario que esteve sempre presente em todos os momentos de minha vida.

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

## RESUMO

A pele é a maior interface entre o corpo e o ambiente e promove a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos ou trauma. A cicatrização de lesões de pele envolve um processo complexo e depende do controle do processo inflamatório. Uma das doenças de acometimento cutâneo amplamente distribuída em nosso país é a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Nosso estudo de 19 lesões de LTA em atividade mostrou que o infiltrado inflamatório é principalmente constituído por células T e macrófagos, e que a dinâmica de infiltração muda durante a evolução da doença, havendo um aumento da concentração de células CD4<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup>, e redução da carga parasitária. A associação entre a alta expressão de NOS2 (óxido nítrico sintase tipo 2) e a baixa quantidade de parasitos sugere a importância desta enzima na eliminação das formas amastigotas no sítio da lesão. Tendo em vista a possibilidade de persistência parasitária nas cicatrizes de LTA e a importância da resposta imune local para o controle da carga parasitária, conseqüentemente no controle do aparecimento de lesões tardias nos propusemos a avaliar a composição celular e os marcadores de atividade inflamatória presentes nos tecidos cicatriciais utilizando a técnica de imunohistoquímica e comparando com os dados observados em lesões em atividade. Foram estudados 18 pacientes divididos em 2 grupos: 1- cicatrizes recentes (1 ano de cura clínica, n = 9); 2- cicatrizes tardias (3 anos de cura clínica, n = 9). Foi observado que o infiltrado inflamatório anteriormente difuso e intenso nas lesões ativas, torna-se restrito a grupos de células bem delimitados em meio ao tecido fibrótico cicatricial e/ou associado aos anexos cutâneos e em torno de vasos sanguíneos. As cicatrizes com 1 ano de cura clínica, quando das análises pareadas com as lesões em atividade, apresentaram redução significativa do percentual de neutrófilos e dos seguintes marcadores de atividade: NOS2, E-selectina, Ki67, Bcl-2 e Fas. Esta redução mostrou-se acentuada nas cicatrizes mais antigas (3 anos), acompanhada da redução de células T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e células de Langerhans. Em conjunto os resultados sugerem que: 1- a dinâmica do processo inflamatório nas formas cutâneas da LTA mantém um padrão de distribuição celular ao longo do período de atividade que se modifica lentamente mesmo após a aparente cicatrização das lesões; 2- a redução acentuada dos marcadores de atividade e concentração de populações celulares observadas nas cicatrizes com 3 anos de cura



clínica sugerem que após este tempo o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro *in situ* começa a ser estabelecido.

## **ABSTRACT**

The skin is the major interface between our body and the external environment and it is responsible for the first defense against pathogens and trauma. Skin Inflammation plays an important role during the healing of cutaneous lesions of different diseases as American cutaneous leishmaniasis (ATL). In this context, we studied 19 cutaneous ATL lesions during the active disease. Our results showed an inflammatory reaction produced mainly by T lymphocytes and macrophages. The distribution of these cells could modify according to disease outcome, mainly by increasing the concentration of CD4<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells as the parasite load decrease.. In addition, a negative correlation between NOS2 (nitric oxide synthase type 2) and parasite detection was observed, suggesting a direct role of NOS2 in the parasite control. Previous results have showed a presence of residual inflammatory reaction associated with parasite antigens in the scars of ATL lesion. Based on this observation we decide to evaluate the composition of cells and markers of inflammation in scars from the same patients after 1 or 3 years of lesion's healing. We could detect small areas of cells clusters spread all over the fibrotic tissue as well as close to vessels and cutaneous glands. The analysis of the scar tissue showed an important reduction of NOS2, E-selectin, Ki67, Bcl-2 and Fas expression when compared with the lesions. In addition, scars with 3 years duration also presented a reduction of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as well as Langerhans cells. Taken together, the results suggests that: 1- the inflammatory reaction shows a pattern of cellularity during the active phase of the ATL lesion which change slowly even after the clinical healing of the lesions; 2- the analysis of three years old scars showed an important reduction of inflammatory reaction demonstrated by the decrease of either cells and expression of activity markers suggesting that after this period the equilibrium between host and parasite is taking place.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AEC – Aminoethyl carbazole

AP-1 – Ativação da proteína - 1

APC – Célula apresentadora de antígeno

BALB/C – Linhagem de camundongos susceptíveis a maioria das espécies de Leishmania que desenvolvem infecção no modelo murino.

BCR – Receptor de célula B

BHI – Brain Heart Infusion

CD – Grupo de diferenciação

CEP-IPEC – Comitê de ética em pesquisa do IPEC

CIC – Cicatriz

CLA – Antígeno associado a linfócito cutâneo

ConA – Concanavalina A

cpm – Contagem por minuto

CTL – Linfócito T citotóxico

DDF40/CAD – Fator de fragmentação do DNA 40 / desoxinuclease ativada por caspase

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTH – Hipersensibilidade tardia

ELISA – Ensaio imunoenzimático

HE – Hematoxilina-eosina

ICAM-1 – Molécula-1 de adesão intercelular

IDRM – Intradermorreação de Montenegro

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN- $\gamma$  – Interferon- $\gamma$

IL – interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

Lb-Ag – Antígeno de Leishmania sp

LCC – Leishmaniose cutânea crônica

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LFA-1 – Antígeno-1 associado a função integrina do leucócito

LM – Leishmaniose mucosa  
L-NIL – L-N<sup>6</sup>-iminoethyl-lysine  
LPS – Lipopolissacarídeo  
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana  
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal  
MIP – Proteína inflamatória de macrófagos  
MO – macrófago  
ND – Não determinado  
NEU – neutrófilo  
NFkB – Fator nuclear kB  
NK – Célula matadora natural  
NNN – Meio Novy, MacNeal, Nicolle  
NO – Óxido nítrico  
NOS2 – Óxido nítrico sintase do tipo 2  
PBMC – Células mononucleares de sangue periférico  
PBS – Phosphate buffered solution  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PPD – Derivado protéico purificado  
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro  
RNI – Intermediários reativos de nitrogênio  
ROI – Intermediários reativos de oxigênio  
RPL – Resposta proliferativa primária de linfócitos  
SALT – Tecido linfóide associado à pele  
SEM – erro mínimo  
SFB – Soro fetal bovino  
SI – Índice de estimulação  
SIS – Sistema imune da pele  
STAT - Transdutor de sinais e ativador de transcrição  
TCR – Receptor de célula T  
TGF-β – Fator de crescimento tumoral-β  
Th – Célula T auxiliar  
TNF-α – Fator de necrose tumoral-α

Tx-Ag – Antígeno de Toxoplasma gondii

UPD – Unidade perivascular dérmica

VCAM-1 – Molécula-1 de adesão das células vasculares

VLA-4 – Antígeno-4 de ativação tardia

## SUMÁRIO

	p.
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
A DOENÇA E SEU AGENTE.....	20
A RESPOSTA IMUNE DA PELE.....	23
A RESPOSTA IMUNE <i>IN SITU</i> NA LTA.....	25
O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	27
EQUILÍBRIO PARASITO-HOSPEDEIRO.....	28
MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR E FUNCIONAIS NO ESTUDO DA IMUNOPATOLOGIA DAS LEISHMANIOSES.....	29
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
<i>Objetivo geral</i> .....	41
<i>Objetivos específicos</i> .....	41
<b>CASUÍSTICA</b> .....	42
<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	43
<b>METODOLOGIA</b> .....	44
1. <i>Coleta de material biológico</i> .....	44
2. <i>Preparação dos fragmentos teciduais</i> .....	44
3. <i>Histopatologia</i> .....	45
4. <i>Imunohistoquímica</i> .....	45
5. <i>Produção de antígenos de Leishmania braziliensis (Lb-Ag) e Toxoplasma gondii (Tx-Ag)</i> .....	48
6. <i>Resposta proliferativa primária (RPL)</i> .....	48
7. <i>Citometria de fluxo</i> .....	49
8. <i>Análise estatística</i> .....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	50
<i>Caracterização do grupo</i> .....	50
<i>Histopatologia</i> .....	51
<b>IMUNOHISTOQUÍMICA – LESÕES ATIVAS</b> .....	54
1. <i>Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (figura 2)</i> .....	54
2. <i>Distribuição e perfil quantitativo de células de Langerhans e células dendríticas foliculares (tabela 4 e figura 2)</i> .....	56
3. <i>Marcadores de inflamação (figura 3)</i> .....	59
4. <i>Detecção de parasitos</i> .....	63
<b>IMUNOHISTOQUÍMICA – CICATRIZES</b> .....	65
1. <i>Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (figura 6)</i> .....	65
2. <i>Distribuição e perfil quantitativo de células de Langerhans (figura 6)</i> .....	70
3. <i>Marcadores de inflamação (figura 8)</i> .....	70
4. <i>Detecção de parasitos</i> .....	74
<i>Evidenciação de diferenças significativas na análise comparativa lesões em atividade versus cicatrizes – (figuras 10, 11, 12 e 13)</i> .....	74
<i>Análise comparativa cicatrizes versus peles sadias contralaterais – (tabela 7 e figura 14)</i> .....	79
<i>Resposta proliferativa primária</i> .....	82

<i>Caracterização fenotípica das células respondedoras in vitro ao Lb-Ag.....</i>	83
<b>DISCUSSÃO.....</b>	84
<b>CONCLUSÃO.....</b>	92
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	94

## LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1. Marcadores estudados.....	47
Tabela 2. Histopatologia das lesões de LTA de acordo com as características principais evidenciadas nos cortes corados por HE.....	53
Tabela 3. Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório presente nas lesões ativas, cicatrizes e peles sadias contralaterais.....	53
Tabela 4. Contagem percentual e por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios das lesões cutâneas de LTA em relação ao tempo de evolução.....	58
Tabela 5. Intensidade de NOS2 + e E-selectina de acordo com o tempo de evolução das lesões cutâneas de LTA.....	61
Tabela 6. Contagem percentual e por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios das lesões cutâneas de LTA e nas cicatrizes com 1 e 3 anos de cura clínica.....	69
Tabela 7. Contagem percentual e por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios das cicatrizes com 1 e 3 anos de cura clínica, e respectivas peles sadias.....	81



## LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1. Ligação do receptor Fas (CD95) presente na célula alvo e FasL expresso pelo CTL resulta na morte induzida por apoptose.....	37
Figura 2. Lesão ativa: (a) células T CD3 <sup>+</sup> , (b) células T CD4 <sup>+</sup> , (c) células T CD8 <sup>+</sup> , (d) células B, (e) neutrófilos, (f) células de Langerhans. Aumento 200x.....	55
Figura 3. Lesão ativa: (a) células CLA <sup>+</sup> , (b) E-selectina, (c) células Ki67 <sup>+</sup> , (d) células BCl-2 <sup>+</sup> , (e) células Fas <sup>+</sup> , (f) células FasL <sup>+</sup> . Aumento 200x.....	60
Figura 4. Detecção em lesão ativa de endotélio expressando E-selectina. Aumento 400x.....	62
Figura 5. Detecção de macrófagos (A - B); expressão de NOS2 (C - D); parasitas (E - F), preparado como descrito em materiais e métodos. < 2 meses (A, C e E); > 4 meses (B, D e F). (aumento 200x (A - D / barra de aumento = 50 µm) e 400x (E - F / barra de aumento = 25 µm).....	64
Figura 6. Cicatriz: (a) células T CD3 <sup>+</sup> , (b) células T CD4 <sup>+</sup> , (c) células T CD8 <sup>+</sup> , (d) macrófagos, (e) células de Langerhans, (f) células dendríticas foliculares. Aumento 400x.....	67
Figura 7. Detecção através de imunohistoquímica de células CD4 <sup>+</sup> (A - B); expressão de CLA (C - D); preparado como descrito em materiais e métodos. Cicatriz 1 ano de cura clínica (A, C); Cicatriz 3 anos (B, D) (aumento 400x).....	68
Figura 8. Cicatriz: (a e b) células CLA <sup>+</sup> , (c) neutrófilos, (d) células BCl-2 <sup>+</sup> , (e) células Fas <sup>+</sup> , (f) células FasL <sup>+</sup> . Aumento 400x.....	72
Figura 9. Detecção através de imunohistoquímica, em cicatriz, de endotélio expressando E-selectina (A); expressão de CLA (B); preparado como descrito em materiais e métodos. Aumento 200x.....	73
Figura 10. Detecção através de imunohistoquímica de células CD3 <sup>+</sup> (A - B); CD4 <sup>+</sup> (C - D); CD8 <sup>+</sup> (E - F); CD1a <sup>+</sup> (G - H), preparado como descrito em materiais e métodos. Lesão ativa (A, C, E e G); cicatriz (B, D, F e H). Aumento 200x.....	75
Figura 11. Análise comparativa da distribuição fenotípica em (a) lesão ativa <i>versus</i> cicatriz 1 ano de cura clínica e (b) lesão ativa <i>versus</i> cicatriz 3 anos de	

cura clínica. * $p < 0,05$ . MO – macrófagos, NEU – neutrófilos, cic1 – cicatriz 1 ano, cic3 – cicatriz 3 anos.....	76
Figura 12. Análise comparativa de atividade inflamatória em lesão ativa <i>versus</i> cicatriz. (a) Comparação dos marcadores de direcionamento para a pele (CLA), proliferação celular (Ki67) e apoptose (Fas/FasL) com cicatrizes 1 ano e (b) 3 anos de cura clínica. (c) Expressão de NOS2 em lesão ativa <i>versus</i> cicatriz 1 ano e (d) 3 anos. (e) Expressão de E-selectina em lesão ativa <i>versus</i> cicatriz 1 ano e (f) 3 anos. * $p < 0,05$ .....	77
Figura 13. Análise comparativa da intensidade de células de Langerhans em derme em lesão ativa <i>versus</i> (a) cicatriz com 1 ano de cura e (b) com 3 anos de cura clínica. * $p = 0,046$ .....	78
Figura 14. Detecção em pele sadia contralateral de células Fas <sup>+</sup> (A); FasL <sup>+</sup> (B); CD1a <sup>+</sup> (C); E-selectina (D), preparado como descrito em materiais e métodos. Aumento 400x.....	80
Figura 15. Resposta proliferativa primária de PBMC estimuladas com Lb-Ag..	82

## LISTA DE ANEXOS

	p.
1. Termo de consentimento livre e esclarecido – lesões ativas.....	105
2. Termo de consentimento livre e esclarecido – cicatriz.....	108
3. Termo de compromisso e responsabilidade.....	113
4. Carta de aprovação CEP-IPEC/FIOCRUZ.....	114

## INTRODUÇÃO

### A DOENÇA E SEU AGENTE

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero Leishmania. A transmissão ocorre através da picada do inseto vetor, pertencente ao gênero Lutzomyia, cujas espécies envolvidas dependem da localização geográfica.

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

A LTA pode ser dividida em três formas clínicas básicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A forma cutânea localizada tem como principal característica uma lesão ulcerada que se desenvolve no local de inoculação do parasito, pelo inseto vetor. O indivíduo desenvolve úlcera de bordos elevados e fundo granuloso, geralmente única e autolimitada. O teste de Montenegro é positivo e é possível evidenciar resposta imune celular específica *in vitro* (Conceição-Silva et al., 1990).

A leishmaniose mucosa geralmente se caracteriza por destruição tecidual progressiva associada à intensa resposta inflamatória (Amato et al., 2003). Esta lesão surge semanas ou anos após o desaparecimento da lesão cutânea inicial, por provável disseminação hematogênica a partir do foco primário. Trabalhos experimentais em

hamsters parecem corroborar esta hipótese (Kanan, 1975). Mais raramente, a lesão mucosa pode surgir na vigência de úlcera cutânea em atividade.

O quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizado por infiltrações, pápulas e tubérculos envolvendo extensas áreas cutâneas (Brasil, 2000). Tem caráter progressivo e não responde ao tratamento antimonial, com ciclos contínuos de remissão (após o tratamento) e atividade. Os pacientes com LCD não apresentam resposta imunológica do tipo tardio especificamente ao antígeno do parasito *in vivo* (DTH, teste de hipersensibilidade tardia ou reação de Montenegro negativa) nem *in vitro* (resposta proliferativa) (Castes et al., 1983; Castes et al., 1984).

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

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

O Rio de Janeiro é tradicionalmente considerado área endêmica de LTA, e a espécie circulante em nosso meio tem sido identificada como L. braziliensis (Schubach et al., 1998b).

A maioria dos pacientes infectados com L. (V.) braziliensis apresenta a forma cutânea típica (como descrito anteriormente), com localizações variadas, às vezes acompanhada de linfadenopatia regional precoce. Podem ocorrer lesões múltiplas, e em alguns pacientes a doença se apresenta como leishmaniose cutânea disseminada (Barral et al., 1992; Barral et al., 1995; Bittencourt e Barral-Neto, 1995; Grimaldi et al., 1989).

Alguns pacientes infectados por L. (V.) braziliensis, (1 a 10%), desenvolvem leishmaniose mucosa (LM), uma forma destrutiva que compromete nariz, faringe,

palato, lábio superior e laringe. Em 42% dos pacientes ocorre perfuração do septo nasal (Marsden, 1986). A LM tem como característica uma resposta imunológica exacerbada, mediada por células, e é interessante a observação de grande destruição tecidual acompanhada de dificuldade de detecção de parasitos (Carvalho et al., 1985). Estes pacientes apresentam resposta positiva ao teste de Montenegro e a resposta proliferativa *in vitro* de células do sangue periférico, frente ao antígeno. A magnitude desta resposta é geralmente maior que na forma localizada (Carvalho et al., 1985; Castes et al., 1983).

De um modo geral, não importando o parasito envolvido, a forma clássica da infecção se caracteriza pelo aparecimento de lesões tegumentares com característica predominantemente ulcerativa e com a formação de um infiltrado granulomatoso crônico evidenciado na histopatologia.

A úlcera leishmaniótica típica tende à cronicidade e pode evoluir para expansão ou regressão, mesmo sem tratamento. A cicatrização pode dar-se num prazo de seis meses a vários anos, curando-se muitas vezes, dentro de 12 a 15 meses (Rey, 1991).

O diagnóstico da LTA compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais consistem na evidenciação do parasito e em provas imunológicas.

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

A detecção de resposta imune específica pode ser feita através da intradermoreação de Montenegro (IDRM), imunofluorescência indireta (IFI) e/ou ensaio imunoenzimático (ELISA), além de resposta proliferativa primária de linfócitos (RPL). Esta última é pouco utilizada na prática.

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

A discussão sobre a erradicação do parasito após a cura clínica foi motivo de controvérsia durante muitos anos. Com o estudo sistemático de cicatrizes e com a possibilidade de utilização de técnicas de grande sensibilidade, a evidencição de parasitos pode ser feita com a detecção de antígenos ou DNA parasitários em lesões de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em cicatrização (Schubach et al., 1998a; Schubach et al., 1998b; Amato et al., 2003; Mendonça et al., 2004). Schubach et al. (2001) demonstraram a existência de antígenos de Leishmania no tecido cicatricial e sugeriram que este fato poderia estar relacionado a mecanismos de manutenção da resposta imune levando a imunoproteção. Por outro lado, como foi possível o isolamento de parasitos em culturas de amostras de cicatriz, também foi sugerido que a persistência do agente infeccioso poderia estar relacionada ao desenvolvimento de lesões secundárias (lesão mucosa ou reativações). Todos estes dados sugerem um equilíbrio dinâmico entre o parasito e o sistema imune, principalmente aquele existente no local. Assim, o estudo de resposta imune da pele e seus mecanismos modulatórios pode ser uma boa ferramenta na compreensão dos mecanismos que mantêm ou alteram este equilíbrio.

## A RESPOSTA IMUNE DA PELE

Nos últimos anos, o estudo de lesões tegumentares tem sido modificado pela valorização da detecção de fatores envolvidos na resposta imune *in situ* ao parasito. Este

fato foi melhor compreendido a partir dos trabalhos que descreveram a resposta imune na pele.

O tegumento cutâneo de simples barreira mecânica à agressão e/ou entrada de agentes físicos, químicos e patogênicos, hoje é visto como sendo fundamental no desenvolvimento e seleção da resposta imune a vários agentes causais (Ahmed et al., 1994; Modlin et al., 1989; Conceição-Silva et al., 1990; Conceição-Silva et al., 1994; Conceição-Silva et al., 1998; Khanolkar-Young et al., 1998; Orteu et al., 1998; Pirmez et al., 1990; Pirmez et al., 1993; Lessin et al., 1999; Bertho et al., 2000). Hoje pode-se falar inclusive em sistemas organizados como o sistema imunológico da pele (SIS – skin immune system; SALT – skin associated lymphoid tissue – Bos e Kapsemberg, 1993, revisão) e dos folículos pilosos (Christoph et al, 2000).

Streenlein (1978, 1983, 1990) define o tecido linfóide associado à pele (SALT) com os seguintes constituintes: queratinócitos, células de Langerhans, células T, células endoteliais da pele e linfonodos de drenagem. O SALT seria parte do sistema imune da pele (SIS) descrito como a resposta associada a células e fatores humorais presentes na pele humana normal (monócitos, macrófagos residentes, mastócitos, granulócitos, queratinócitos entre outros) (Bos e Kapsemberg, 1993).

O estudo funcional de várias células constituintes da pele tem demonstrado sua potencial participação na resposta imune local. Os queratinócitos, por exemplo, além de participar da homeostase do tecido são capazes de, após estimulação, expressar antígenos em complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, podendo atuar como células apresentadoras de antígenos, e nas mesmas condições são produtoras e secretoras de citocinas (Lunger et al., 1990).

Além dos queratinócitos, outras células com função de células apresentadoras de antígenos (APC) estão presentes na pele como as células de Langerhans que derivariam uma população de células dendríticas, macrófagos etc. Outras células do sistema imune, notadamente células T, estão presentes na pele, prontas a serem ativadas no caso de agressão tecidual. Estes linfócitos expressam em sua maioria uma molécula de superfície denominada CLA (“cutaneous lymphocyte antigen”) tipicamente presente em células com “preferência” pela migração para o tegumento cutâneo. Foi calculado que num dado momento, o número de células T presentes na pele de um adulto sadio somaria algo em torno de 4 bilhões, sendo que 90% delas se situariam nas proximidades



dos vasos capilares formando as unidades perivasculares dérmicas (UPD-Bos e Kapsemberg, 1993). Outras células como mastócitos, polimorfonucleares neutrófilos entre outras também estão presentes. Estas células estariam envolvidas em várias fases do processo inflamatório no tegumento cutâneo e os fenômenos de citotoxicidade teriam importante papel tanto na eliminação do patógeno quanto na regulação do processo inflamatório por si. Como exemplo, Oishi et al. (1996) mostraram que a apoptose mediada pelas moléculas denominadas Fas (CD95 – receptor ligado aos processos de apoptose) e FasL (CD95L – molécula ligante do receptor Fas) pode exercer papel importante no "turnover" e diferenciação celular na pele normal, na regulação imune de tumores de pele e na patogênese de várias doenças de pele como as dermatoses, queratoses, lupus, verruca vulgaris entre outras. Guan et al. (2000) ao analisar a cicatrização de feridas não infecciosas provocadas experimentalmente em pele de camundongos, sugeriram que a apoptose através de Fas e Fas-L exerceria função importante na redução da celularidade durante o processo de cicatrização. A mesma sugestão foi dada por Orteu et al. (1998), utilizando a resposta inflamatória induzida por teste intradérmico (PPD). O estudo destes fenômenos trouxe à luz vários pontos que hoje não devem ser esquecidos quando se tenta discutir patologias como as leishmanioses tegumentares, a paracoccidiodomicose secundária, a esporotricose e a hanseníase, por exemplo (Botelho et al., 1998; Gesztesz et al., 1999; Khanoulkar-Young et al., 1998; Kauffman, 1999; Kurokawa et al., 1998; Lucey et al., 1996; Murphy et al., 1994; Stevens et al., 1994; Zeppone-Carlos et al., 1999).

#### A RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA LTA

Nos últimos anos as técnicas de estudo *in situ* como a hibridização e a imunohistoquímica se tornaram ferramentas importantes para o entendimento da imunopatologia de uma grande variedade de doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, pois permitem a identificação *in situ* do agente infeccioso e do tipo de células e citocinas envolvidas na resposta inflamatória (Amato et al., 2003). Pirmez et al. (1993) sugeriram que o curso clínico da infecção por Leishmania braziliensis no homem estaria associado com o padrão local específico de produção de citocinas, pois

observaram predominância relativa de RNAs de citocinas do tipo 1 como a IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotoxinas em lesões cutâneas localizadas e em reações de hipersensibilidade tardia provocadas pelo teste de Montenegro. Nas lesões provenientes de formas crônicas e mucocutâneas destrutivas da leishmaniose havia a presença simultânea de RNAs de citocinas do tipo 1 e 2, porém com marcante abundância de IL-4. Esterre et al. (1992) caracterizaram a resposta imune celular na leishmaniose cutânea localizada e observaram que o infiltrado inflamatório era composto em sua maior parte por linfócitos T, macrófagos e uma pequena porção de células B, *natural killer* e granulócitos. Além disso, as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentavam-se em quantidades iguais. Lima et al. (1994) encontraram resultados semelhantes quanto à proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células B, e quando relacionaram o tempo de lesão e o fenótipo celular notaram que a porcentagem das células positivas se mantinha fixa para todos os tipos celulares com exceção das células T  $\gamma\delta$  que reduziram com o tempo. A partir destes resultados, estes pesquisadores concluíram que provavelmente estas células seriam importantes na fase inicial da resposta imune na doença granulomatosa.

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

Amato et al. (2003) ao estudarem a caracterização *in situ* da resposta inflamatória na LM antes e após o tratamento, demonstraram a

redução/desaparecimento das lesões inflamatórias e o desaparecimento de formas amastigotas que foram atribuídos principalmente ao tratamento. Apesar disto, o infiltrado de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ou antígenos de Leishmania sp persistiram nas lesões tratadas. Apesar do conhecimento obtido nestes estudos, várias questões ainda permanecem obscuras. Entre elas o papel da relação parasito-hospedeiro na relação infecção - doença.

## O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de lesões de pele envolve um processo complexo, que inclui a indução de inflamação aguda pela injúria inicial (fase inflamatória), seguido de proliferação celular mesenquimal e parenquimal, epitelização e síntese de colágeno (fase proliferativa ou fibroblástica), e uma fase final onde é estabelecido o equilíbrio entre lise e síntese de colágeno e a orientação das fibras (fase de remodelamento) (Greenhalgh, 1998; Hunt et al., 2000; Henry e Garner, 2003).

Alguns dos fatores que controlam o processo inflamatório e a cicatrização já foram descritos. Guan et al. (2000) analisaram camundongos com feridas provocadas experimentalmente e não infectadas, e observaram que a apoptose via Fas e FasL poderia ter uma importante participação na redução da celularidade no processo de cicatrização. Grennhalgh (1998), em revisão, discutiu a importância da apoptose em todas as fases do processo cicatricial, tanto para a redução de células inflamatórias quanto para a redução de células fibroblásticas, e, conseqüentemente passagem de uma fase para a outra. O TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral –  $\beta$ ) parece ter função chave na transição da fase inflamatória para fibroblástica, pois regula negativamente a inflamação (células T e macrófagos) e induz fibrose (Grennhalgh, 1998). O TGF- $\beta$  tem papel relevante na cura de lesões em camundongos infectados por *L. major*. O bloqueio do TGF- $\beta$  *in vivo* levou ao controle da carga parasitária e rápida cicatrização, acompanhados por aumento da produção de óxido nítrico (NO) (Li et al., 1999). Stenger et al. (1996) demonstraram expressão de NOS2 (óxido nítrico sintase tipo 2) a longo prazo no sítio da lesão de pele original e no linfonodo drenante em camundongos infectados com *L. major*, e constataram que a atividade de NOS2 foi dependente de

células T CD4<sup>+</sup>, mas não CD8<sup>+</sup>. A inibição da NOS2 por L-NIL (L-N<sup>6</sup>-iminoethyl-lysine) determinou um aumento da carga parasitária no tecido cutâneo e linfonodo drenante, levando a reativação da doença. Concluíram, então, que a atividade de NOS2 seria crucial para o controle de parasitos persistentes nos hospedeiros imunocompetentes após a resolução da infecção primária. Nas fases de imunossupressão, a inibição da atividade de NOS2 seria um dos mecanismos responsáveis pela reativação endógena de infecções latentes por microrganismos sensíveis ao NO. No homem, este mesmo fenômeno pôde ser observado com a descrição de parasitos viáveis nas cicatrizes de LTA (Schubach et al., 1998a; Schubach et al., 1998b) e na reativação da doença em pacientes aids (Kubar et al., 1998; Czechowicz et al., 1999).

## EQUILÍBRIO PARASITO-HOSPEDEIRO

Em humanos os mecanismos de suscetibilidade e resistência aos agentes infecciosos são complexos devido ao balanço entre respostas patogênicas e protetoras, ao “background” genético e história imunológica variável dos indivíduos infectados (Gaze et al., 2006).

A infecção por *Leishmania* induz a liberação de citocinas que inibem a morte mediada por NO, como TGF- $\beta$  e IL-10. O fosfolipídico da *Leishmania* regula negativamente a produção de IL-12, conseqüentemente inibe a expansão de TH1 e liberação de NO estimulada por INF- $\gamma$ . O TGF- $\beta$  é o supressor mais potente da expressão de NOS2 em macrófagos murinos e atua ao nível pós-transcricional desestabilizando o RNAm de NOS2, retardando a síntese da enzima e acelerando a sua degradação (Bradonisio et al., 2001).

A habilidade do hospedeiro em controlar a infecção pode ser resultado de um balanço entre o número de microrganismos persistentes e células efetoras específicas do sistema imune. Há a possibilidade de que mesmo poucos patógenos sobreviventes possam facilitar a manutenção da imunidade protetora. Tem sido postulado que células T de memória necessitam de perpétua reestimulação causada tanto por reações cruzadas,

a partir de patógenos relacionados ou do ambiente, ou pela presença de antígenos do inóculo primário (Moll et al., 1995).

Assim como em diversas outras infecções, hospedeiros clinicamente curados podem ainda abrigar formas viáveis de *Leishmania sp.* Stenger et al. (1996), como citado anteriormente, estudando a infecção por *Leishmania major* no modelo murino, observaram que 60-70% dos parasitos que persistem nos linfonodos satélites estavam localizados em áreas negativas tanto para NOS2 quanto para marcadores de macrófagos, granulócitos, células dendríticas ou células endoteliais. Na época os autores sugeriram a existência de um outro tipo de célula, que de forma intrínseca ou devido à supressão por produtos bacterianos, seriam deficientes na produção de NO e poderiam servir como alvo seguro para *L. major*. Alguns anos mais tarde o mesmo grupo (Bogdan et al., 2000), analisando a produção de NO por fibroblastos em resposta a citocinas ou produtos bacterianos *in vitro*, observaram que fibroblastos murinos tinham capacidade reduzida de produção desta molécula e eliminação de parasitos de *L. major*, e podiam abrigar tanto formas amastigotas quanto promastigotas. Apesar disto, os parasitos residentes em fibroblastos ainda eram suscetíveis à ação de NO por macrófagos vizinhos. Os autores sugeriram que fibroblastos podem formar um ambiente menos hostil para *L. major* do que os macrófagos, permitindo assim a persistência de formas parasitárias. Além disto, algumas das amastigotas persistentes estavam localizadas no meio extracelular envolvidas por matriz ou em áreas necróticas deficientes de células nucleadas. A sobrevivência e replicação do parasito, no entanto estariam sujeitas ao controle por macrófagos vizinhos, que então, manteriam um equilíbrio estável entre parasito e hospedeiro.

## MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR E FUNCIONAIS NO ESTUDO DA IMUNOPATOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

A composição e a característica funcional do infiltrado inflamatório podem ser estudadas sobre vários aspectos. A utilização de anticorpos policlonais ou monoclonais que detectam marcadores de superfície ou no interior da célula é amplamente difundida e pode indicar particularidades da dinâmica inflamatória. Neste sentido, a escolha dos

marcadores é fundamental para a compreensão deste processo. Neste tópico e na tabela 1 estão resumidos as principais características dos anticorpos monoclonais utilizados e suas especificidades, e alguns resultados já descritos na leishmaniose.

### *Linfócitos e suas subpopulações*

Os linfócitos T são as células centrais da resposta imune adaptativa. A molécula CD3, está localizada na superfície da células T formando o complexo TCR (receptor de células T), e juntamente com  $\zeta$  fazem a transdução de sinais bioquímicos desencadeados pelo reconhecimento de antígenos. Como resultado, estes eventos bioquímicos induzem a ativação funcional das células T. CD4 e CD8 são glicoproteínas transmembranares de células T que se ligam a regiões não polimórficas das moléculas do MHC. Transduzem sinais que, junto com os sinais liberados via complexo TCR, iniciam a ativação das células T. CD4 está presente nas células T auxiliares e regulatórias e reconhece seletivamente moléculas do MHC-II associadas a antígenos. CD8 está presente nas células T supressoras/citotóxicas e liga-se seletivamente às moléculas do MHC-I (Abbas, 2003).

A molécula CD22 é um marcador para linfócitos B, pois é uma proteína associada ao receptor de antígeno da célula B (BCR) e participa da regulação deste tipo celular, via sinalização transmembranar, em resposta a antígenos estranhos (Abbas, 2003).

### *Células de Langerhans e células dendríticas foliculares*

As células de Langerhans epidérmicas são componentes importantes da resposta imune inata da pele, pois iniciam a resposta imune adaptativa local de células T (Lunger et al., 2004). Elas migram para a derme, onde captam antígenos e se dirigem para o linfonodo regional, onde apresentam antígenos para as células T específicas, iniciando assim a resposta imune celular (Elhassan et al., 1994; Moll et al., 1995). Durante a migração, as células de Langerhans se diferenciam em células dendríticas e tornam-se capazes de sensibilizar linfócitos T *naive*. Ao longo deste processo de maturação, as células de Langerhans aumentam a expressão de moléculas do MHC-II e de moléculas

coestimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), CD40 e CD83 (Katou et al., 2000 em revisão).

As células de Langerhans expressam altos níveis da molécula CD1a, com capacidade de apresentar antígenos lipídicos microbianos às células T (Hunger et al., 2004). Elas são capazes de fagocitar *L. major*, porém isto não é importante para eliminação de parasitas, mas sim para a aquisição de antígenos para apresentação à célula T. São também potentes estimuladoras da proliferação de células T específicas para *L. major* e produção de linfocinas, sendo para tal mais eficientes do que os macrófagos (Moll et al., 1993 APUD Xavier et al., 2005).

As células dendríticas foliculares são aquelas providas de projeções membranosas, presentes nos centros germinativos dos folículos linfóides, no baço e nos tecidos linfóides associados às mucosas. Estas células captam antígenos que estão ligados a anticorpos ou a produtos do complemento e exibem esses antígenos em sua superfície para o reconhecimento pelos linfócitos B (Abbas, 2003).

#### *CD68 (Macrófagos) e NOS2 (Óxido nítrico sintase do tipo 2)*

CD68 é uma glicoproteína transmembranar altamente glicosilada, principalmente localizada em lisossomos. Está presente em macrófagos e apresenta função ainda desconhecida (Abbas, 2003).

A óxido nítrico sintase do tipo 2 (NOS2) ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é uma enzima celular que catalisa a síntese de óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina (Michel e Feron, 1997; Bogdan, 2001). NO é um radical de vida curta que transmite sinais celulares envolvidos em vasodilatação, neurotransmissão e citotoxicidade. Efeitos protetores e tóxicos de NO são frequentemente observados em paralelo. Trabalhos têm demonstrado que o radical NO ou derivados do mesmo não atuam somente como molécula efetora antimicrobiana direta, mas também exercem um efeito imunorregulatório protetor para o hospedeiro (Bogdan, 2001). Como mecanismos imunossupressores, têm sido descrito apoptose de células T, a regulação negativa da expressão de MHC de classe II, citocinas ou moléculas coestimulatórias (Bogdan, 2001). Ormerod et al. (1999), estudando o efeito do NO em pele íntegra, observaram que concentrações baixas desta molécula produziam efeitos pró-inflamatórios

acompanhados de aumento do número de células CD3, CD4, CD8 e CD68. Também as células de Langerhans mostraram perda de suas projeções e migração para a derme. Já as doses altas produziam um efeito inibitório com redução destes tipos celulares, provavelmente devido à toxicidade desta molécula.

Os macrófagos são as principais células produtoras de NOS2 (Facchetti et al., 1999), porém outros tipos celulares podem produzi-lo, como por exemplo, os linfócitos T, fibroblastos, células dendríticas e células NK (Bogdan, 2001; Qadoumi et al., 2002). Stenger et al. (1996), estudando a infecção por *Leishmania major* no modelo murino, demonstraram a expressão de NOS2 no sítio original da lesão de pele e no linfonodo satélite de camundongos C57BL/6 após longo tempo de infecção. Ao utilizar um inibidor da NOS2 (L-N<sup>6</sup>-iminoethyl-lysine (L-NIL)), observaram um aumento da carga parasitária e reativação da doença, sugerindo que a falha em manter a atividade de NOS2 pode ser o mecanismo responsável pela reativação de infecções latentes durante fases de imunossupressão. Os autores concluíram que a atividade de NOS2 é fator determinante para o controle de parasitas que ainda persistam no hospedeiro imunocompetente após a resolução da infecção primária. Além disso, efeitos protetores do hospedeiro dependentes da expressão de NOS2 durante as doenças infecciosas incluem a inibição da fibrose tecidual e o término da resposta imune pela apoptose de células TCD4<sup>+</sup> ativadas (Bogdan, 2001).

Já foram identificadas mais de 30 citocinas que modulam a expressão de NOS2 no modelo murino: INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  induzem a sua expressão, enquanto IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  a inibem (Bradoniso et al., 2001). Em humanos, a atividade de NOS2 aumenta após influência de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1) e produtos microbianos (Lipopolissacarídeo – LPS) (Facchetti et al., 1999). Por outro lado, citocinas antiinflamatórias diminuem a sua expressão (IL-10 e IL-4) e a produção de NO, como consequência inibe a eliminação de parasitas intracelulares em macrófagos humanos infectados com *L. major* e *L. infantum* (Bradoniso et al., 2001). O nível de expressão é controlado por vários fatores de transcrição incluindo NF $\kappa$ B, AP-1, STAT-1 $\alpha$  e IRF-1 (Bogdan, 2001).

NO por si só exerce um efeito duplo na transcrição de NOS2. Baixas concentrações de NO (o que ocorre no início da estimulação de macrófagos pelas citocinas) ativa NF $\kappa$ - $\beta$  que regula positivamente a expressão de NOS2. Altas



concentrações produzem um efeito contrário, que pode ajudar a prevenir a produção exacerbada de NO (Bogdan, 2001).

Segundo Qadoumi et al. (2002) a expressão de NOS2 é indispensável para a resolução de infecções por *Leishmania major* e *Leishmania donovani* em camundongos. Ao analisar biópsias de lesões de pele de pacientes com LCL ou LCD causadas por *L. mexicana* observaram que a expressão de NOS2 nas lesões com menor carga parasitária era muito maior do que naquelas lesões com alta carga parasitária. Baseados nestes resultados sugeriram que o curso benigno da LCL seria resultado da alta expressão de NOS2.

NOS2 é também expressa em um amplo espectro de doenças inflamatórias em humanos. Esta enzima tem sido detectada em macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose pulmonar, córtex cerebral de pacientes adécticos com demência severa, em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com hepatite C e malária, na pele de pacientes com lepra tuberculóide ou leishmaniose cutânea localizada (Bogdan, 2001).

Diaz et al. (2005) analisaram a produção local de NOS2 e sua relação com a expressão de citocinas TH1/TH2 em lesões de pacientes com LTA. Estes autores observaram que existe um padrão funcional *in situ* para cada forma da doença. Na LCL foi observada alta expressão de NOS2 e maior número de células IL-12<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> associados à resposta imune do tipo TH1, o que direciona para a cura das lesões. Por outro lado, pacientes com LCD apresentaram menor expressão de NOS2 associada à resposta do tipo TH2, com níveis aumentados de células IL-4<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>, que mantêm um estado tolerogênico incapaz de controlar a infecção, levando a disseminação do parasita pela pele. Não foram encontradas referências a estudo de NOS2 em lesão mucosa de LTA em atividade.

#### *Elastase neutrofílica (Neutrófilos e precursores de neutrófilos)*

Os neutrófilos estão envolvidos na resistência à leishmaniose cutânea no modelo murino de infecção por *L. major*. Evidências mostram que estas células predominam nas fases iniciais de infecção e seus números decrescem com a progressão da infecção. A evidenciação de neutrófilos em áreas de destruição de parasitos e a redução deste tipo

celular contendo parasitas intracelulares com o decorrer da doença sugerem uma importante função parasiticida durante a fase aguda de infecção (Pompeu et al., 1991).

Em trabalho posterior, foi evidenciado um intenso infiltrado de polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, na derme de camundongos BALB/C e C57BL/6 nas primeiras horas após a infecção por *L. major*. Estes neutrófilos apresentaram um ou mais parasitas no interior de seus vacúolos citoplasmáticos. Com a evolução, o quadro histopatológico mudava completamente, e os polimorfonucleares passavam a ser raros e havia predominância de monócitos e macrófagos. A observação de significativo número de parasitas com diversos graus de degeneração no interior dos neutrófilos, sugeriu que este tipo celular atuava de forma ativa na destruição de parasitas. A depleção de neutrófilos murinos levou ao desenvolvimento de lesões mais severas e aumento da carga parasitária no linfonodo drenante. Corroborando assim, a idéia de que neutrófilos apresentam importante função como células efetoras da imunidade inata, por serem responsáveis pela fagocitose e morte de parasitas na reação inflamatória aguda, e pela redução da disseminação de parasitas para o linfonodo drenante (Lima et al., 1998).

Segundo Venuprasad et al. (2003), o controle da infecção por neutrófilos é mediado por alterações na função de células T. A ativação da molécula CD28 em neutrófilos, após a interação com a molécula B7 de macrófagos, resultou na liberação de IFN- $\gamma$ . Como efeito da presença desta citocina, houve a restrição do crescimento parasitário e a modulação da secreção de citocinas por células TCD4<sup>+</sup>, levando a alta liberação de IFN- $\gamma$  e menor expressão de IL-4. Assim, os neutrófilos foram capazes de direcionar a resposta de células T para tipo 1, com conseqüente aumento da atividade leishmanicida e controle da carga parasitária. Ribeiro-Gomes et al. (2004) evidenciaram que interações entre macrófagos e neutrófilos mortos influenciavam de forma importante a resposta hospedeira à infecção, podendo ser pró-inflamatória ou anti-inflamatória dependendo da cepa de camundongo utilizada. Cepas susceptíveis (BALB/C) apresentaram produção de TGF- $\beta$  por macrófagos e alta carga parasitária. Camundongos resistentes (C57BL/6) apresentaram produção de TNF- $\alpha$  e destruição parasitária. Tacchini-Cottier et al. (2000) observaram que a depleção de neutrófilos de camundongos BALB/C prevenia o pico recente de RNAm para IL-4 e era capaz de

inibir o desenvolvimento de células Th2. Em paralelo, havia a resolução da lesão e este efeito protetor mostrava-se dependente de IL-12.

Alguns dados ainda são controversos: Zandbergen et al. (2004) observaram que neutrófilos humanos obtidos de sangue periférico fagocitavam, porém não eram capazes de eliminar o parasito. Estas células infectadas secretavam altos níveis de quimiocina MIP-1 $\beta$ , que atraía os macrófagos. Os macrófagos rapidamente fagocitavam os polimorfonucleares apópticos e infectados, o que resultava na liberação de TGF- $\beta$  (citocina anti-inflamatória). Assim, os parasitos internalizados eram capazes de sobreviver e multiplicar nos macrófagos, utilizando os neutrófilos como um meio para entrar silenciosamente em sua célula hospedeira final.

#### *CD62E (E-selectina) e CLA (Antígeno associado a linfócito cutâneo)*

Quando o antígeno é encontrado em um tecido específico, como por exemplo, a pele, a ativação de células T no linfonodo satélite resulta na produção de células efectoras antígeno específicas que expressam receptores de localização para aquele sítio. Desta forma a resposta imune é direcionada para o sítio inicial de infecção ou estímulo (Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

As células T comprometidas com a migração para a pele são identificadas pela expressão de um carboidrato de superfície celular denominado antígeno linfocitário cutâneo (CLA). O CLA é ligante para E-selectina, que consiste em uma molécula de adesão de endotélio induzida sob condições de inflamação por IL-1 e TNF- $\alpha$  (Teraki et al., 2004). As selectinas são responsáveis pela adesão e rolamento, processo que permite a captação de leucócitos circulantes pelas células endoteliais, juntamente pela ação de quimiocinas e outras moléculas de adesão como ICAM-1. A interação entre CLA/E-selectina, VLA-4/VCAM-1 e LFA-1/ICAM-1 são necessárias para a migração transendotelial das células T CLA<sup>+</sup> circulantes (Santamaría-Babí, 2004).

CLA é expresso por aproximadamente 30% das células T de memória circulantes e está ausente nas células T virgens. As células T encontradas nas lesões inflamatórias de pele são principalmente CD45RO<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>, sendo poucas as células acumuladas na pele inflamada que não expressam CLA<sup>+</sup> (Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

A expressão desta molécula tem sido descrita em doenças alérgicas ou autoimunes (Jung et al., 2002; Kupper & Fuhlbrigge, 2004), porém pouco tem sido relatado quanto à influência destas células em doenças infecciosas.

#### *FasL (CD95L) e Fas (CD95)*

Os linfócitos T citotóxicos (CTLs) promovem defesas potenciais contra a infecção por vírus e patógenos intracelulares. Os CTLs podem eliminar a célula alvo através da exocitose de grânulos (por ação de perforina e granzimas) ou através da via Fas. A ligação entre o receptor Fas da célula-alvo e o FasL no CTL desencadeia reações em cascata levando a ativação de caspases. Inicialmente ocorre a ativação da caspase-8, que por sua vez é capaz de ativar diretamente outros membros da família de caspases, como a caspase-3. Ou pode levar a clivagem de proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 e a translocação do BID e BAX (moléculas envolvidas no processo de apoptose) para a mitocôndria. Uma vez inseridas na membrana mitocondrial, BID e BAX induzem a liberação do citocromo c, o que resulta na ativação da caspase-9. Assim a caspase-9 é capaz de ativar a caspase-3. O resultado é a ativação de DFF40/CAD (fator de fragmentação do DNA 40 / desoxinuclease ativada por caspase) que cliva o DNA levando a morte celular (Barry e Bleackley, 2002). Este processo está esquematizado na figura 1, adaptada de Barry e Bleackley, 2002.

Alguns trabalhos têm mostrado a influência da via Fas no desenvolvimento e resolução de lesões estéreis (Guan et al., 2000) ou causadas por agentes infecciosos (Oddo et al., 1998; Zenewicz et al., 2004; Mustafa et al., 2001; Mustafa et al., 2005). Guan et al. (2000) observaram a importância da redução da celularidade, via Fas-FasL, durante a cicatrização de lesões de pele em camundongos.

Conceição-Silva et al. (1998) evidenciaram que camundongos infectados por *L. major*, deficientes de sistema Fas, não apresentavam a cicatrização de suas lesões. Também observaram que a administração de FasL recombinante, aos camundongos deficientes deste indutor, resultava na resolução das lesões cutâneas demonstrando a importância desta via na eliminação de parasitas. Ainda observaram que os macrófagos infectados *in vitro* aumentavam a expressão de Fas em resposta ao IFN- $\gamma$ , tornando-se suscetíveis a apoptose induzida por células TCD4<sup>+</sup>.

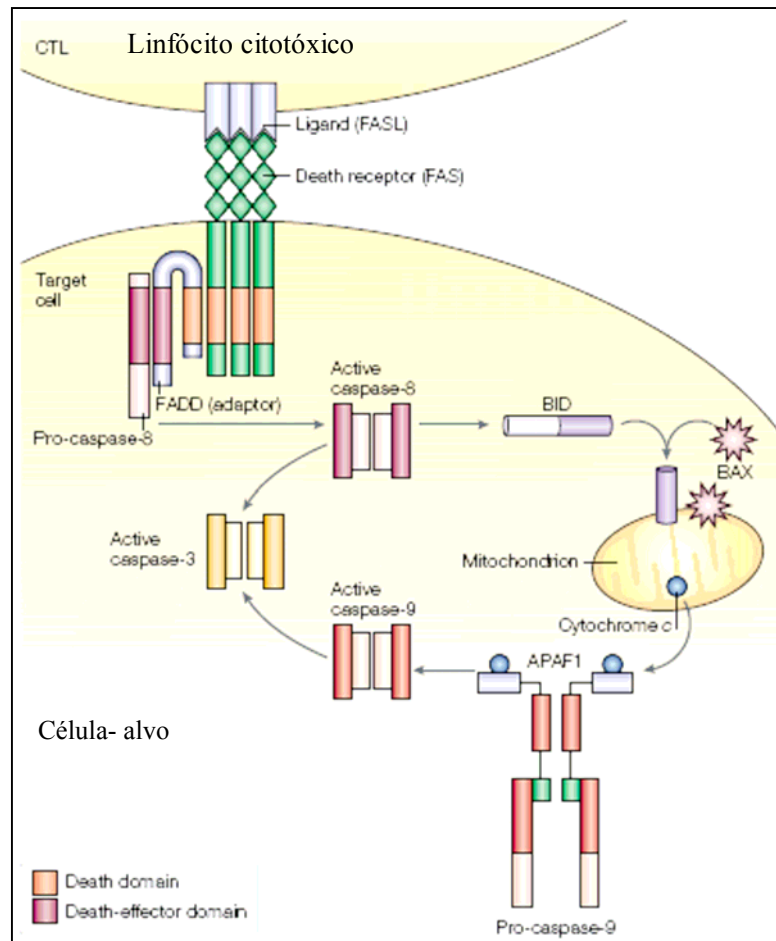


Figura 1. Ligação do receptor Fas (CD95) presente na célula alvo e FasL expresso pelo CTL resulta na morte induzida por apoptose. A estimulação do receptor Fas resulta no recrutamento e ativação da caspase iniciadora (caspase-8) através da interação com a molécula adaptora FADD (proteína domínio de morte associada ao Fas). A caspase-8 pode ativar diretamente outros membros da família das caspases, como por exemplo a caspase-3. Por outro lado, a ativação da caspase-8 resulta na clivagem da molécula pró-apoptótica BID (membro da família BCl-2) e translocação do BID e BAX para a mitocôndria. Uma vez inseridos na mitocôndria, BID e BAX induzem a liberação do citocromo c mitocondrial, o que resulta na ativação da caspase-9. Daí a caspase-9 é capaz de ativar a caspase-3.

*Ki67 (Proliferação celular) e BCl-2 (Inibição da apoptose)*

Ki67 consiste em uma proteína nuclear expressa em células em proliferação e ausente em células em repouso ( $G_0$ ) (Sawhney e Hall, 1992). Muito tem sido descrito quanto à utilização deste marcador como prognóstico (Pich et al., 2004; Diest et al., 2006) ou diagnóstico diferencial para afecções cancerosas (Kaplan et al., 2005). Porém são raros os trabalhos com foco em doenças infecciosas, e nenhum sobre leishmaniose.

Os membros da família BCl-2 formam um grupo de fatores regulatórios da apoptose. Eles podem ser pró-apoptóticos (BID, BAX) ou anti-apoptóticos (BCl-2, BCl-w). Estas proteínas anti-apoptóticas podem ligar-se à conformação ativa do BAX para prevenir a sua inserção na membrana mitocondrial externa, mantendo assim a permeabilidade normal e prevenindo a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais como o citocromo c. Desta forma, as proteínas da família BCl-2 podem, indiretamente, regular a atividade de caspases (Fan et al., 2005).

Orteu et al. (1998) estudaram a reação de hipersensibilidade tardia provocada por PPD e acompanharam a expressão destes dois marcadores, entre outros. Observaram que nesta reação, a geração de resposta envolve não apenas o recrutamento, mas também a proliferação de células T, enquanto a resolução ocorre em parte pela indução de apoptose das células T infiltrantes. Eles sugeriram que as fases proliferativas e de resolução da resposta parecem ser controladas por diferentes níveis do mesmo grupo de citocinas (IL-15, IL-2, TNF- $\alpha$ ), cuja presença promoveria a proliferação, e a ausência destes mediadores levaria a apoptose. A não regulação da apoptose de células T poderia contribuir para a cronicidade da inflamação de doenças cutâneas.

Estes resultados demonstram a potencialidade do estudo de marcadores de atividade inflamatória *in situ* que podem ser de grande valia na compreensão da dinâmica da relação parasito-hospedeiro no processo imunopatológico da LTA.

## JUSTIFICATIVAS

Apesar dos dados já obtidos, ainda não foi possível caracterizar de forma sistemática a correlação/associação da presença e concentração de determinados tipos celulares e seus produtos com a apresentação clínica, tempo de lesão e, principalmente, com a resposta à terapêutica. Além disto, o estudo longitudinal (lesão X cicatriz) num mesmo paciente pode indicar quadros imunopatológicos que a médio prazo poderiam servir como indicativos de atividade residual nas lesões. Assim, estudar num mesmo paciente a lesão ativa e a cicatriz e correlacionar os achados com o tipo e tempo de evolução das lesões, o tempo de cicatrização e a resposta à terapêutica, poderia trazer subsídios que permitissem entender os mecanismos de reativação e/ou resistência ao tratamento observado nesta patologia. Em adição, verificar e comparar o tipo e a intensidade da resposta imune celular tanto no compartimento periférico quanto no sítio das lesões em vários tempos no mesmo paciente e em grupos com características clínicas comuns, poderia auxiliar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, assim como uma nova dinâmica de acompanhamento dos casos de LTA.

O estudo sistemático e comparativo da resposta imune celular tanto *in vitro*, a partir de células de sangue periférico, quanto *in situ* poderia contribuir para o melhor conhecimento do desenvolvimento desta e de outras lesões tegumentares, levando à formulação de novas estratégias terapêuticas, profiláticas e prognósticas no campo da dermatologia infecciosa.

Dentro deste conceito, podemos incluir a LTA cuja variedade de apresentações clínicas e tipos de evolução parecem ser a resultante da associação do tipo de parasito envolvido e da resposta imune do indivíduo infectado. Em particular, alguns pontos relacionados ao aparecimento de lesões secundárias mucosas, a recidiva precoce em lesões cutâneas e a resistência ao tratamento específico permanecem não esclarecidos. Por exemplo, não é sabido se a disseminação parasitária é precoce ou tardia, se a persistência parasitária é fenômeno generalizado ou não; se a persistência parasitária é capaz de manter certo grau de imunidade e se esta imunidade é benéfica ou deletéria etc. Assim, aprofundar o conhecimento sobre o processo inflamatório envolvido na evolução de LTA pode propiciar a organização de um painel com características imunopatológicas preditivas ou não de determinadas formas de evolução. Estas

características poderiam então propiciar novas abordagens para a modulação da resposta imune do paciente em direção à cura das lesões e a prevenção de complicações precoces ou tardias.



## **OBJETIVOS**

### *Objetivo geral*

Entender alguns aspectos da dinâmica do processo inflamatório e de cicatrização na Leishmaniose Tegumentar Americana.

### *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos do estudo são:

1. Evidenciar modificações do processo inflamatório de acordo com o tempo de evolução e outros parâmetros clínicos;
2. Comparar características celulares e de arquitetura da lesão ativa e cicatriz em um mesmo paciente, correlacionando os achados com tipo de evolução, resposta à terapêutica e tempo de cicatrização;
3. Avaliar a resposta imunológica sistêmica após tempos determinados de cicatrização, utilizando o ensaio de linfoproliferação, e realizar a caracterização fenotípica das células respondedoras pela análise em citômetro de fluxo.

## CASUÍSTICA

Pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) confirmado pela evidenciação do parasito foram estudados em dois momentos (lesão ativa e cicatriz). As lesões ativas foram estudadas em conjunto e depois agrupadas de acordo com o tempo de evolução (recentes ou tardias). Quanto às cicatrizes, os pacientes foram organizados de acordo com o tempo de cicatrização (menor que 1 ano e maior que 3 anos). Além destas biópsias, foram coletadas amostras de pele sadia contralateral às cicatrizes em todos os pacientes que concordaram com o procedimento. A casuística foi composta de pacientes estudados em dois tempos: 1- com lesão ativa e 2- curados, que aceitaram participar do projeto após a leitura, compreensão e assinatura do “termo de consentimento livre e esclarecido” (anexos 1 e 2) (protocolos nº 014/2002 e 0016.0.009-02, no presente formato este estudo foi revalidado pelo CEP-IPEC com o número 0047.0.011.009-06). Foram formados 4 grupos, com 6 a 13 pacientes cada, a saber:

1. lesão cutânea ativa recente (evolução < 2 meses, n = 13),
2. lesão cutânea ativa tardia (evolução > 4 meses, n = 6),
3. cicatriz recente + pele sadia contra-lateral ( $\pm$  1 ano de cura clínica, n = 9),
4. cicatriz tardia + pele sadia contra-lateral (maior que 3 anos, n = 9).

Foi adotado como critério de exclusão do presente estudo, os extremos de idade (pacientes com menos de 15 anos e com mais de 70 anos), a concomitância de patologias/tratamentos imunossupressores, tamanho das lesões ativas (nas muito pequenas houve prioridade para os fragmentos destinados ao diagnóstico), alteração/ausência de níveis de compreensão necessários à assinatura do termo de consentimento. No caso particular de cicatrizes foram excluídas aquelas com localização em face e em áreas de difícil manuseio como mãos e pés.

## **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

A aprovação do projeto está inserida no protocolo 014/2002 coordenado pela Dra Fátima da Conceição-Silva. Não houve mudança de método ou questionamento que pudesse caracterizar uso de amostra para outros fins que o aprovado no projeto 014/2002. Os pacientes curados foram contatados e após esclarecimento e aceitação (protocolo número 0016.0.009-02 coordenado pelo Dr Armando Schubach) assinaram o termo de consentimento, sendo realizada então biópsia da área de cicatriz e de pele sadia contralateral. De acordo com a sugestão da Coordenação de Ensino o projeto foi submetido ao CEP-IPEC, tendo sido aprovado sob número de protocolo 0047.0.011.009-06.

## **METODOLOGIA**

### *1. Coleta de material biológico*

As biópsias de lesão ativa foram coletadas no momento do diagnóstico de pacientes atendidos no ambulatório de Leishmaniose Tegumentar Americana coordenado pelo Dr Armando Schubach, localizado no IPEC / FIOCRUZ e armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunoparasitologia, IOC - FIOCRUZ. As biópsias de cicatriz e pele sadia contralateral foram realizadas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (protocolo 0016.0.009-02). Dependendo do local e da extensão da lesão/cicatriz, fragmentos de diferentes tamanhos foram obtidos (punch descartável de 3 a 6 mm).

Além da biópsia, foram coletados 10 ml de sangue periférico heparinizado para a realização de ensaio de Resposta Proliferativa Linfocitária (RPL), perfil de citocinas por ELISA e caracterização fenotípica a partir da marcação com anticorpos monoclonais para análise em citômetro de fluxo.

### *2. Preparação dos fragmentos teciduais*

Biópsias com tamanho variável (punch 3 a 6mm) foram obtidas pelo médico responsável após assepsia, antisepsia e anestesia local com lidocaína 2%. Parte deste material foi destinado aos testes diagnósticos (culturas e histopatologia) e um fragmento foi utilizado para o estudo.

O tecido para estudo foi mergulhado em resina OCT (Tissue-Tek, Sakura), congelado à  $-70^{\circ}\text{C}$  e posteriormente armazenado à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para análise do material foram realizados cortes com 3  $\mu\text{m}$  de espessura utilizando-se para tal aparelho de criostato (Leica, Germany). Os cortes foram apostos em lâminas de microscopia (silanized slides, DakoCytomation, Carpinteria, Clostrup, Denmark) e fixados em acetona PA (Merck, Darmstadt, Germany). As lâminas fixadas podiam ser utilizadas imediatamente, ou então armazenadas à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

O procedimento foi o mesmo para fragmentos de lesões ativas, cicatrizes ou pele sadia.

### 3. Histopatologia

Fragmentos fixados em formalina foram corados por HE e examinados por microscopia óptica (Zeiss, Alemanha). Além da descrição topográfica, foram consideradas as alterações em epiderme (hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa, acantose, hiperqueratose) e derme (fibrose, neoformação vascular). A intensidade de infiltrado inflamatório foi analisada em uma escala variando de discreto, moderado, a intenso. Os resultados foram obtidos com o auxílio do médico patologista Leonardo Quintella (IPEC-FIOCRUZ).

### 4. Imunohistoquímica

Cortes com 3µm de espessura dos fragmentos congelados foram apostos em lâminas de microscopia (Silanized Slides, DakoCytomation), fixados em acetona PA (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) e hidratados em PBS pH 7.4. Foi feito o bloqueio de reações inespecíficas com soro de cabra normal (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, U.S.A.), e em seguida, incubação com os anticorpos primários anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD22 (linfócitos B), anti-CD1a (células de Langerhans), anti-DC (células dendríticas foliculares), anti-CD62E (E-selectina), anti-BC12, anti-KI67 (marcador de proliferação celular), anti-elastase neutrofilica, anti-CD68 (macrófago) (DakoCytomation); anti-NOS2 (óxido nítrico sintase do tipo 2) (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-CLA (cutaneous lymphocyte antigen), anti-Fas, anti-FasL (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, U.S.A.). Para a detecção de parasitos foi utilizado soro policlonal de coelho anti-*Leishmania braziliensis*, gentilmente cedido pela Dra Maria de Fátima Madeira (IPEC-FIOCRUZ). As etapas subseqüentes consistiram na incubação com anticorpo secundário biotilado (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, U.S.A) e complexo streptavidina-biotina peroxidase (Kit ABC DakoCytomation). O sistema substrato-cromógeno usado foi aminoethyl carbazole (Kit AEC) e a contracoloração foi feita com Hematoxilina de Mayer (Dako). A leitura das lâminas em microscópio óptico (Zeiss, Germany) se deu pela contagem percentual das células marcadas, utilizando-se como padrão a contagem de 500 células. Alternativamente, utilizou-se a contagem de células/mm<sup>2</sup> de tecido. A intensidade das

marcações de NOS2 e E-selectina foi determinada da seguinte forma: discreto (1 sítio positivo por campo 200x), moderado (2 a 3 sítios positivos por campo), intenso (3 a 4 sítios positivos por campo) e muito intenso (5 ou mais sítios positivos por campo).

Tabela 1. Marcadores estudados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluições</b>
Anti-CD3	Clone UCHT1. Reconhecimento de células T.	Dako	1:100
Anti-CD4	Clone MT310. Reconhecimento de linfócitos T auxiliares e indutores.	Dako	1:100
Anti-CD8	Clone DK25. Reconhecimento de linfócitos T supressores e citotóxicos.	Dako	1:100
Anti-CD22	Clone 4KB128. Reconhecimento de linfócitos B.	Dako	1:100
Anti-CD1a	Clone NA1/34. Reconhecimento de células de Langerhans e tímócitos corticais.	Dako	1:100
Anti-FDC	Clone CNA.42. Reconhecimento de células dendríticas foliculares, tímócitos corticais e raramente mastócitos.	Dako	1:100
Anti-CD68	Clone KP1. Reconhecimento de macrófagos teciduais, precursores mielóides e granulócitos de sangue periférico.	Dako	1:300
Anti-elastase neutrofílica	Clone NP57. Reconhecimento de neutrófilos teciduais.	Dako	1:200
Anti-NOS2	Clone 6. Reconhecimento da enzima óxido nítrico sintase induzida.	BD Transduction	1:100
Anti-E-selectina	Clone 1.2B6. Reconhecimento de E-selectina expressa em célula endotelial ativada.	Dako	1:100
Anti-CLA	Clone HECA-452. Reconhecimento do antígeno associado a linfócito cutâneo.	BD Pharmingen	1:100
Anti-Ki67	Clone Ki-S5. Reconhecimento da proteína nuclear Ki-67 presente em células em proliferação.	Dako	1:100
Anti-BCL2	Clone 124. Reconhecimento da oncoproteína BCL2 que apresenta função central na inibição da apoptose.	Dako	1:50
Anti-Fas	Clone DX2. Reconhecimento da molécula de superfície celular CD95, expressa em uma grande variedade de células normais e neoplásicas. Está envolvida nos eventos iniciais da apoptose.	BD Pharmingen	1:50
Anti-FasL	Clone G247-4. Reconhecimento do ligante para Fas, expresso em células T ativadas, células NK e sítios imunologicamente privilegiados.	BD Pharmingen	1:50

### 5. Produção de antígenos de *Leishmania* (Lb-Ag) e *Toxoplasma gondii* (Tx-Ag)

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1999/RVSB) foram cultivadas em meio Schneider's Drosophila Medium (Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina (Sigma, U.S.A.). Após expansão, a massa parasitária foi submetida a lavagens seriadas com PBS e ajustada para  $10^8$  parasitos/mL. Em seguida, foi feita a quebra por 10 ciclos de congelamento ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) / descongelamento ( $37^{\circ}\text{C}$ ), e sonicação em alta frequência (sonicador Lab-line Ultratip, Lab-Line instruments, Melrose Park, Illinois, U.S.A.). Os antígenos preparados foram alíquotados e mantidos congelados ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o momento do uso.

Parasitas da espécie *Toxoplasma gondii* (Tx-Ag) foram mantidos em passagens seriadas em cavidade peritoneal de camundongos Swiss-webster (clearance n° P0227/04). O líquido ascítico foi coletado no 4° dia de infecção. A massa parasitária foi preparada como descrito para o Lb-Ag.

### 6. Resposta proliferativa primária (RPL)

A amostra de sangue periférico foi submetida ao gradiente de Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) (Mendonça et al., 1986). Após isolamento e lavagens seriadas, as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (TPP, Switzweland), na concentração  $4 \times 10^5$  células por poço. As culturas foram feitas em triplicata na presença de Lb-Ag na concentração equivalente a  $10^6$  parasitos/poço. Os cultivos na presença de concanavalina A (ConA -  $4\mu\text{g}/\text{ml}$  - Sigma) e Tx-Ag  $10^6$  parasitos/poço (cepa RH) foram utilizados como controle do experimento. As placas foram incubadas em estufa  $37^{\circ}\text{C}$ , atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 5 dias. Nas últimas 8-20 horas do período de incubação foi adicionado  $0,5\mu\text{Ci}$  de Timidina triciada (Amersham LifeScience, UK) por poço da placa. A detecção da incorporação de Timidina triciada foi feita em aparelho contador de emissão radioativa tipo Beta (Packard, Canberra Company), e o índice de estimulação (SI) foi calculado dividindo-se



a média das contagens por minuto (cpm) dos poços em teste, pela média dos poços negativos (cultivados na ausência de antígenos). Foram considerados positivos  $SI \geq 2,5$ .

Poços adicionais com ou sem antígeno foram usados para obtenção de células e sobrenadantes para estudo.

### *7. Citometria de fluxo*

As células presentes nos poços adicionais das culturas, na presença do Lb-Ag, foram coletadas no 5º dia de cultivo e submetidas à centrifugação a 2000 RPM durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado para estocagem. As células do sedimento foram então lavadas com PBS-azida (PBS + 2% soro fetal bovino e 0,01g de azida sódica - Sigma) por duas vezes nas mesmas condições de centrifugação descritas anteriormente. As células foram incubadas na presença de anticorpos anti-CD4 – FITC, anti-CD8 – PE e anti-CD3 – PE – CY5 (Immunotech, France) durante 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação, foram lavadas novamente em PBS-azida e ressuspensas em PBS-formol 1%. As análises foram realizadas em aparelho FACS (Coulter BD) pelo pesquisador responsável, Dr Álvaro Bertho.

### *8. Análise estatística*

Os dados clínicos foram obtidos do prontuário de atendimento e discutidos com o médico responsável, mantendo-se a cláusula de sigilo (anexo 3).

Foi utilizado o programa SPSS para Windows versão 11 (SPSS Inc.). Foram realizados os testes não-paramétricos de Mean-Whitney e Willcoxon, para amostras não relacionadas e relacionadas, respectivamente. Também foi feita a análise de correlação por Postos de Spearman. Os dados são apresentados em distribuição como média  $\pm$  SEM. Os resultados não numéricos foram analisados em tabelas de contingência 2 x 2 através do teste exato de Fischer do programa INSTAT (Graphpad Software V2-04 Graphpad Instat TM).

## RESULTADOS

### *Caracterização do grupo*

Foram estudados 19 pacientes apresentando lesão cutânea de leishmaniose tegumentar americana, 6 do sexo feminino (31,6%) e 13 do sexo masculino (68,4%), com idade entre 18 e 69 anos (média  $41,95 \pm 3,39$ ). Os pacientes apresentavam de 1 a 6 lesões (média  $1,63 \pm 0,29$ ) localizadas com maior frequência em membros (superiores 12 lesões – 38,7%; e inferiores 8 lesões – 25,8%), mas também presentes em tronco (8 lesões – 25,8%) e face (3 lesões – 9,7%). A IDRM foi positiva em 94,12% dos casos com área de induração de 1,5 a 31mm. Em todos os 19 casos o diagnóstico foi confirmado por visualização do parasito (cultura, imprint e/ou histopatologia). Quanto à evolução da doença, 6 pacientes apresentavam mais que quatro meses de evolução, e os 13 restantes apresentavam menos que dois meses.

Dezoito dos 19 pacientes com lesão ativa foram também avaliados após a cicatrização e divididos em dois grupos de acordo com o tempo de cura das lesões: 1- cicatrizes recentes (1 ano de cura clínica; n = 9); 2- cicatrizes tardias (3 anos de cura clínica; n = 9). De cada um deles, foi também obtida amostra de pele sadia contralateral à localização da cicatriz (n = 18). Apenas 5 eram do sexo feminino (27,7%) e 13 do sexo masculino (72,3%). Uma paciente do sexo feminino, examinada na época de lesão ativa, não participou desta fase do estudo. As cicatrizes biopsiadas estavam localizadas em membros (superiores 44,44% e inferiores 38,89%) e tronco (16,67%).

A IDRM após a cura clínica foi realizada em 15 pacientes. Apenas 2 apresentaram IDRM < 5 mm (1 de cada grupo de estudo) sendo que, um destes pacientes não tinha registro de realização de IDRM quando em lesão em atividade e o segundo apresentava na época (2 meses de evolução) IDRM positiva de 7 mm. O restante apresentou diâmetro de induração variando de 8 a 40 mm (média  $21,17 \pm 2,9$ ). Não houve diferença de intensidade de IDRM se comparado àquela obtida quando em lesão em atividade ( $p = 0,666$ ), e nem entre 1 ano e 3 anos de cura clínica ( $p = 0,948$ ). Em nenhum dos casos de cicatriz estudados foi possível o isolamento de parasitos, assim como não houve a visualização de formas amastigotas através da histopatologia.

### *Histopatologia*

O estudo histológico das lesões em atividade foi realizado em todos os pacientes (tabela 2). O exame microscópico das lesões evidenciou presença de infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares. O infiltrado inflamatório mostrou-se intenso em 14 casos e discreto a moderado em 5 casos, não havendo correlação com tempo de evolução ( $p = 1,0$ ). Em geral havia a formação de esboços de granulomas (15 casos), mas em 4 casos o infiltrado apresentava-se difuso e multifocal. Era freqüente a presença de reações na epiderme como, acantose (6 biopsias), hiperqueratose (5 biopsias) e hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa (8 biopsias). Acantose e hiperqueratose eram alterações na maioria das vezes associadas podendo ser observadas em lesões com intensidade de infiltrado variáveis. Por outro lado, a hiperplasia escamosa pseudoepiteliomatosa só podia ser observada nas lesões com infiltrado intenso. Cinco dos 19 pacientes apresentavam ainda depósito fibrinóide (4 casos) e neoformação vascular (3 casos) na derme, também associadas às lesões com infiltrado intenso. Não houve correlação destas alterações com tempo de evolução ( $p = 1,0$ ;  $p = 0,27$  e  $p = 1,0$ ; respectivamente).

O estudo histológico das cicatrizes foi realizado em todos os pacientes. Em geral as cicatrizes mostraram ninhos de células em meio à intensa fibrose dérmica ou em torno de vasos sanguíneos e anexos cutâneos (glândulas, ductos glandulares e folículos pilosos). Estes grupos de células estavam mais concentrados em derme papilar e em média eram constituídos de  $49,02 \pm 4,90$  e  $38,87 \pm 3,49$  células nas cicatrizes com 1 ano e 3 anos de cura clínica, respectivamente. Em 3 casos foi possível observar infiltrado inflamatório discreto a moderado (tabela 3). Destes, 2 pacientes pertenciam ao grupo com 1 ano de cura clínica, e o terceiro apresentava 3 anos de cura. Não foi verificada diferença de intensidade de infiltrado do tipo inflamatório entre cicatrizes com 1 e 3 anos de cura clínica ( $p = 0,346$ ) e entre cicatrizes e suas respectivas peles sadias contralaterais, que não apresentaram diferenças apreciáveis no estudo histopatológico ( $p = 0,225$ ;  $p = 0,715$ ). Porém, observamos uma redução marcante de intensidade nas lesões cicatrizadas de 1 e 3 anos respectivamente, quando comparado ao infiltrado inflamatório presente nas lesões ativas ( $p = 0,021$ ;  $p = 0,028$ ) (tabela 3). O infiltrado

antes difuso e ocupando grande parte da derme, em cicatrizes foi reduzido a ninhos de células bem delimitados.

Tabela 2. Histopatologia das lesões de LTA de acordo com as características principais evidenciadas nos cortes corados por HE.

	<b>Lesão ativa</b>		
	<i>Infiltrado Inflamatório</i>		
	Discreto	Moderado	Intenso
Nº de pacientes	2	3	14
	<i>Organização do infiltrado inflamatório</i>		
	Difuso		Esboço de granuloma
Nº de pacientes	4		15
	<i>Reações em epiderme</i>		
	Acantose	Hiperqueratose	Hiperplasia escamosa pseudoeplieliomatosa
Nº de pacientes	6	5	8
	<i>Alterações em derme</i>		
	Depósito fibrinóide		Neoformação vascular
Nº de pacientes	4		3

Tabela 3. Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório presente nas lesões ativas, cicatrizes e peles sadias contralaterais.

	<b>Intensidade de infiltrado inflamatório</b>				
	<b>Média ± SEM</b>	<b>S/ alterações</b>	<b>Discreto</b>	<b>Moderado</b>	<b>Intenso</b>
<b>Lesão ativa</b>	1394,89 ± 206,68	0	2	3	14
<b>Cicatriz 1 ano</b>	254,52 ± 55,92	7	1	1	0
<b>Cicatriz 3 anos</b>	204,96 ± 81,08	8	1	0	0
<b>Peles sadias</b>	152,44 ± 24,36	19	0	0	0

## IMUNOHISTOQUÍMICA – LESÕES ATIVAS

Os resultados estão apresentados na tabela 4 e 5.

### 1. Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (figura 2)

Os macrófagos CD68<sup>+</sup> eram muito freqüentes (45,77% ± 1,44), e apresentavam uma distribuição homogênea por todo o infiltrado presente na derme. Era comum a observação de células positivamente marcadas na epiderme. Foi verificada correlação entre tempo de evolução e percentual de macrófagos ( $r = 0,638$ ;  $p = 0,004$ ;  $< 2\text{meses} = 43,57\% \pm 1,55$ ;  $> 4\text{meses} = 51,5\% \pm 1,23$ ). Não houve diferença no padrão de distribuição entre os dois grupos.

Os linfócitos T CD3<sup>+</sup> (54,85% ± 2,62) e suas subpopulações podiam ser encontrados na epiderme, principalmente nas camadas basais. Além da epiderme os linfócitos T eram detectados por toda a derme de forma difusa ou formando focos, além de serem vistos no interior de vasos e/ou justapostos ao endotélio. Não foi observada correlação com tempo de evolução, número de lesões ou teste de Montenegro (valores indicados no tópico caracterização do grupo). As células CD4<sup>+</sup> constituíam em média 40,65% ± 3,08 do infiltrado e apresentavam distribuição homogênea por toda a derme além de estarem presentes na epiderme subjacente. Foi verificado o aumento da concentração de células TCD4<sup>+</sup> de acordo com o tempo de evolução das lesões ( $< 2\text{meses} = 36,32\% \pm 3,42$ ;  $> 4\text{meses} = 49,32\% \pm 4,75$ ;  $p = 0,039$ ). Houve correlação positiva entre tempo de evolução e percentual de CD4<sup>+</sup> ( $r = 0,643$ ;  $p = 0,004$ ). Não foi observada correlação com os demais parâmetros.

As células CD8<sup>+</sup> constituíam em média 34,5% ± 2,04 e apresentavam distribuição heterogênea, com áreas de marcação mais freqüente do que outras, em meio ao infiltrado inflamatório presente em derme. Apesar de não significativa, foi observada uma tendência à redução da concentração de células TCD8<sup>+</sup> de acordo com o tempo de evolução ( $< 2\text{ meses} = 36,5 \pm 2,5$ ;  $> 4\text{ meses} = 30,2 \pm 3,3$   $p = 0,188$ ) (tabela 4). Não houve correlação com tempo de evolução e nem com os demais parâmetros.

A razão CD4/CD8 variou de 0,5 a 1,62 (média 0,97 ± 0,08) nas lesões com menos de 2 meses de evolução. Nas lesões com mais de 4 meses de evolução, esta razão variou de 1,34 a 2,20 (média 1,68 ± 0,13). A diferença entre estas razões foi significativa ( $p = 0,012$ ) (tabela 4).

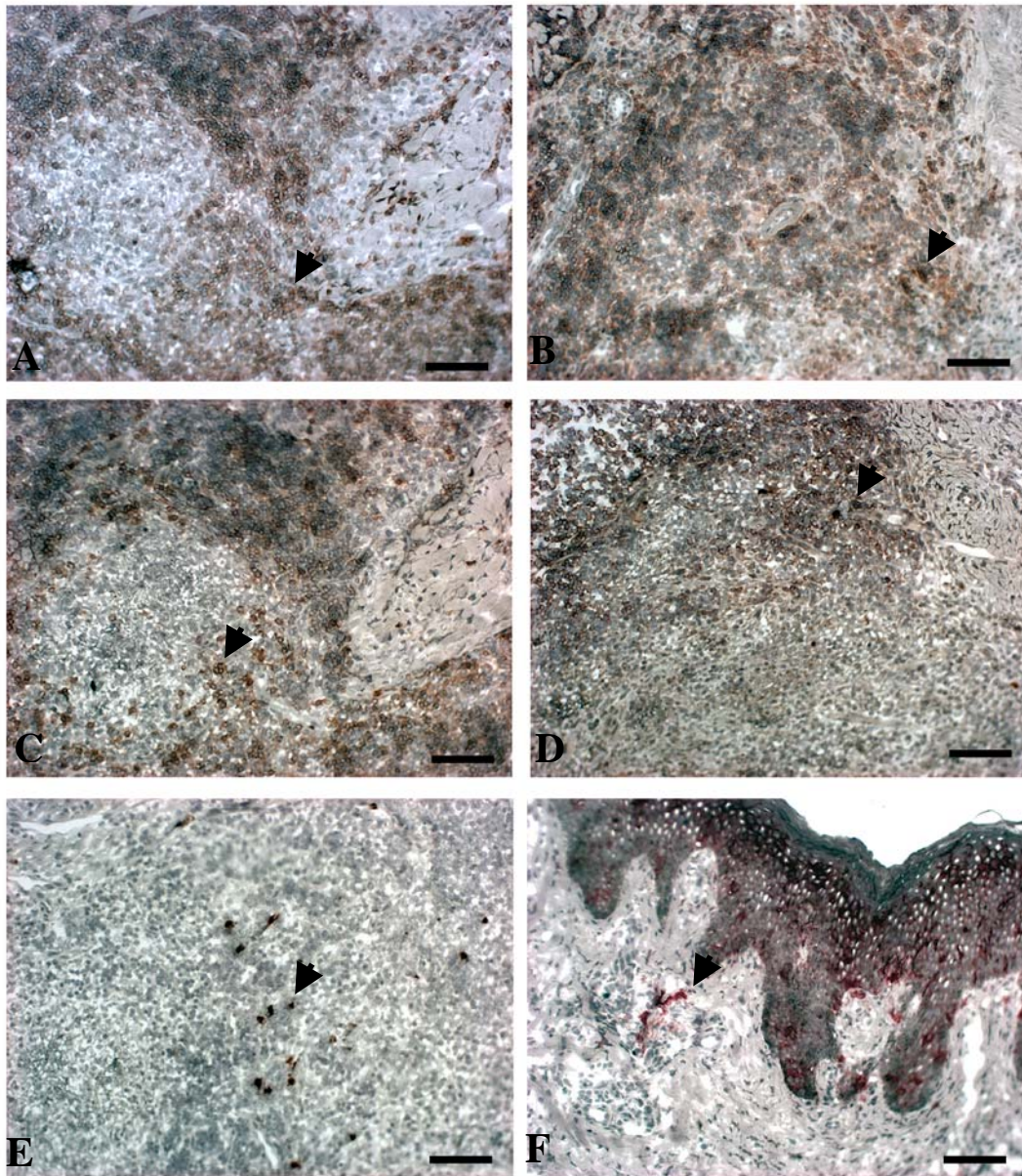


Figura 2. Lesão ativa: (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células T CD4<sup>+</sup>, (c) células T CD8<sup>+</sup>, (d) células B, (e) neutrófilos, (f) células de Langerhans. As células consideradas positivas apresentam coloração castanha-avermelhada de intensidade e distribuição variáveis, na dependência do marcador utilizado. O tecido foi contracorado com hematoxilina de Meyer que produz coloração azul-acastanhada. As setas exemplificam algumas das células positivas. Aumento 200x.

Nas lesões tardias observamos uma concentração dos focos inflamatórios em meio a extensas áreas de fibrose. Como havia a possibilidade do aumento da proporção CD4/CD8 ser devido a este tipo de distribuição, analisamos no mesmo tecido a proporção CD4/CD8 em dois focos distintos: um com maior quantidade de células inflamatórias e outro com menor quantidade. Tanto em lesões recentes quanto tardias, a razão CD4/CD8 observada em áreas focais ou difusas de infiltrado inflamatório foram semelhantes (lesões tardias: média CD4/CD8 = foco  $1,69 \pm 0,27$ , infiltrado  $1,68 \pm 0,13$ ; e lesões recentes: média CD4/CD8 = foco  $0,78 \pm 0,02$ , infiltrado  $0,97 \pm 0,08$ ).

A quantidade de células B CD22<sup>+</sup> variou de 0 a 46% (média  $13,8\% \pm 4,8$ ). Estas células apresentaram um padrão de distribuição heterogêneo formando grupos pequenos de células em meio ao infiltrado inflamatório. Não foi observada correlação com os parâmetros estudados, inclusive tempo de evolução.

Os neutrófilos apresentaram um padrão de distribuição heterogêneo variando de 1,3 a 37,7% (média  $15,3\% \pm 3,5$ ). Nos cortes com marcação mais freqüente, estas células mostraram-se presentes em áreas de intensa necrose em meio a depósito fibrinóide. Nos demais, os neutrófilos apresentavam-se isolados em meio ao infiltrado, algumas vezes apenas no interior de vaso. Foi observada também uma diferença na morfologia das células: nos cortes com menos neutrófilos, estes se encontravam bem compactados enquanto que naqueles com maior quantidade, este tipo celular mostrava-se com maior tamanho e conteúdo citoplasmático. Apesar de não haver diferença significativa, foi observado uma redução nos valores de neutrófilos de acordo com o tempo de evolução ( $< 2$  meses =  $18,5\% \pm 4,5$  ;  $> 4$  meses =  $7,9\% \pm 3,8$ ;  $p = 0,123$ ). Não foi observada correlação com os demais parâmetros estudados.

## 2. Distribuição e perfil quantitativo de células de Langerhans e células dendríticas foliculares (tabela 4 e figura 2).

Células de Langerhans CD1a<sup>+</sup> foram observadas na epiderme (média  $40,3 \pm 10,5 / \text{mm}^2$ ) formando, com suas projeções, uma rede. A derme também apresentava células positivas ( $6,1/\text{mm}^2 \pm 1,12$ ), limitada à derme papilar. Em algumas lesões, foi possível visualizar células positivas enfileiradas na epiderme e derme, assim como entre as células endoteliais e no interior de vasos. Já as células dendríticas foliculares estavam



ausentes em epiderme, e presentes por toda a derme ( $3,6\% \pm 0,99$ ;  $11,88/\text{mm}^2 \pm 2,92$ ), como células isoladas em meio ao infiltrado inflamatório, inclusive em derme reticular. Era possível visualizá-las, assim como as células  $\text{CD1a}^+$ , no interior de vasos. Estas células apresentavam-se mais arredondadas quando comparadas às células  $\text{CD1a}^+$ . Não houve correlação com os parâmetros estudados.

Tabela 4. Contagem percentual e por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios das lesões cutâneas de LTA em relação ao tempo de evolução

<b>Marcadores celulares</b>	<b>&lt; 2 meses (%) (cels/mm2)</b>	<b>&gt; 4 meses (%) (cels/mm2)</b>
MO *	43,56 ± 1,55 (769,38 ± 193,54)	51,5 ± 1,2 (828,25 ± 171,75)
CD3	53,63 ± 3,19 (610,3 ± 125,67)	57,08 ± 4,84 (750,87 ± 209,03)
CD4 **	36,32 ± 3,43 (522,6 ± 124,68)	49,32 ± 4,75 (796,75 ± 259,70)
CD8	36,48 ± 2,45 (528,21 ± 105,47)	30,18 ± 3,26 (419,91 ± 107,00)
CD4/CD8 ***	0,97 ± 0,08	1,68 ± 0,13
CD22	11,24 ± 7,14 (26,1 ± 15,53)	16,92 ± 6,93 (139,77 ± 88,98)
Neutrófilos	18,52 ± 4,48 (164,96 ± 46,39)	7,93 ± 3,78 (55,65 ± 18,83)
DC	4,11 ± 1,4 (13,00 ± 4,04)	2,3 ± 0,65 (9,87 ± 4,12)
CD1a	ND (5,7 ± 1,29)	ND (6,9 ± 2,4)
CLA	32,45 ± 3,6 289,77 ± 61,60	27,93 ± 3,49 198,08 ± 86,94
KI67	12,66 ± 1,6 (90,11 ± 14,06)	8,87 ± 1,73 (110,60 ± 35,84)
BC12	38,18 ± 2,94 (658,54 ± 211,00)	39,37 ± 10,14 (565,33 ± 255,74)
Fas	49,97 ± 5,4 (726,05 ± 170,69)	59,45 ± 9,01 (759,38 ± 240,63)
FasL	22,5 ± 2,84 (134,09 ± 49,38)	23,88 ± 2,49 (325,67 ± 140,1)

• \*p = 0,004 \*\*p = 0,039 \*\*\*p = 0,002

### 3. Marcadores de inflamação – (figura 3)

O percentual de células CLA<sup>+</sup> variou de 9,4 a 55,1% (média: 31,02% ± 2,69), apresentando uma distribuição heterogênea pelo infiltrado inflamatório presente em derme (tabela 4). No entanto, pôde-se freqüentemente observar células CLA<sup>+</sup> próximas ou na luz de vasos. Houve correlação positiva entre a expressão de CLA e células T CD3<sup>+</sup> (r = 0,638; p = 0,026), células T CD4<sup>+</sup> (r = 0,641; p = 0,014) e células T CD8<sup>+</sup> (r = 0,710; p = 0,003).

Foram encontrados 5,1 a 24% (média 11,5% ± 1,26) de células Ki67<sup>+</sup>, distribuídas de forma homogênea na derme por todo infiltrado inflamatório. A membrana basal apresentava positividade em todas as lesões, sendo que em algumas, esta marcação se estendia até camadas superiores da epiderme. Houve tendência de correlação entre a expressão de Ki67 e a concentração de CD4 (r = 0,537; p = 0,058). Não houve correlação com o tempo de evolução ou outros parâmetros.

Foi possível detectar a presença de NOS2 em todas as lesões com intensidade e distribuição variável (tabela 5), desde pequenos grupos de células (discreto) até distribuição difusa abrangendo todo ou grande parte do tecido (muito intenso). Houve correlação positiva entre intensidade de NOS2 e quantidade de células T CD3<sup>+</sup> (or= 20,000; p = 0,03). Não houve correlação com tempo de evolução (tabela 5) ou outros parâmetros.

Células endoteliais expressando E-selectina (CD62-E) foram observadas em todas as lesões estudadas. A distribuição dos vasos sangüíneos positivos e a intensidade de marcação variaram como demonstrado na tabela 5. Na figura 4 observa-se a distribuição heterogênea de vasos ativados: foi possível observar em um mesmo campo vasos ativados e não ativados em proximidade. Não houve correlação com intensidade de infiltrado, tempo de evolução ou intensidade dos tipos celulares estudados (tabela 3).

As células BCl-2<sup>+</sup> apresentaram distribuição heterogênea, variando de 6,7 a 68,4% (média 38,6 ± 3,6%). Houve correlação positiva entre as expressões de BCl-2 e Ki67 (r = 0,900; p = 0,037), células T CD3<sup>+</sup> (r = 0,532; p = 0,028), células T CD4<sup>+</sup> (r = 0,546; p = 0,019) e células T CD8 (r = 0,898; p = 0,001). Não foram observadas diferenças significativas de acordo com o tempo de evolução e nem correlação com os outros parâmetros.

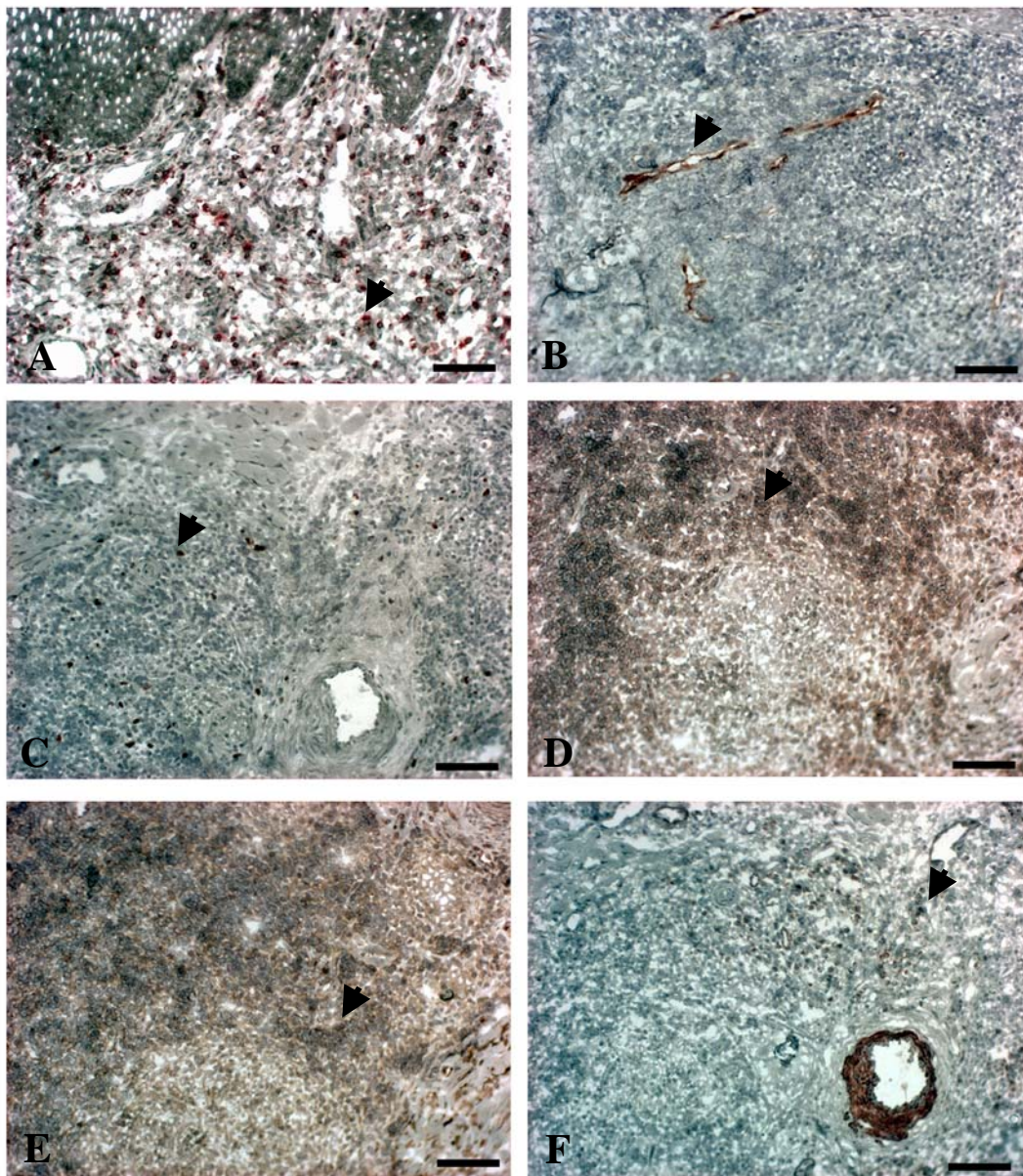


Figura 3. Lesão ativa: (a) células  $CLA^+$ , (b) E-selectina, (c) células  $Ki67^+$ , (d) células  $Bcl-2^+$ , (e) células  $Fas^+$ , (f) células  $FasL^+$ . As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 200x.

Tabela 5. intensidade de NOS2 + e E-selectina de acordo com o tempo de evolução das lesões cutâneas de LTA

<b>Tempo de evolução</b>		<b>Quantidade de pacientes para cada intensidade</b>			
		<b>x/4</b>			
		Discreto (+/4)	Moderado (++/4)	Intenso (+++/4)	Muito intenso (++++/4)
NOS2	< 2 meses	1	4	3	5
	> 4 meses	1	0	5	1
E- selectina	< 2 meses	3	3	1	6
	> 4 meses	1	1	2	2

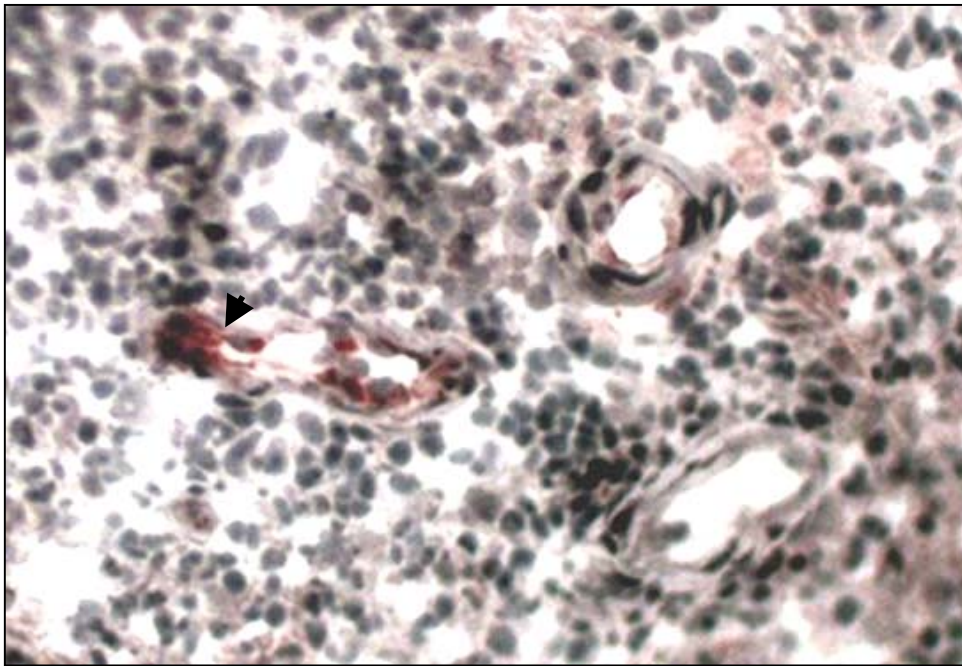


Figura 4. Detecção em lesão ativa de endotélio expressando E-selectina. As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 400x.

Foram observadas células expressando o ligante para Fas (FasL<sup>+</sup>) com distribuição heterogênea (figura 3-F), em meio ao infiltrado inflamatório, e principalmente formando pequenos agrupamentos variando de 15 a 36,3% (média 24,05% ± 2,4) das células da lesão. Já a molécula Fas apresentava distribuição homogênea pelo infiltrado, variando o percentual de células positivas de 11,8 a 78,4% (média 52,5% ± 4,6). Houve correlação entre a expressão de Fas e células T CD4<sup>+</sup> (r= 0,932 p= 0,0001), células T CD8<sup>+</sup> (r= 0,747 p= 0,013) e células Ki67<sup>+</sup> (r= 0,792 p= 0,006). Não foi observada correlação com nenhum dos outros parâmetros estudados. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa, foi observado um aumento do número de células expressando o ligante para Fas de acordo com o tempo de evolução (< 2 meses = 134,09 ± 49,4; > 4 meses = 325,67 ± 140,1; p = 0,386).

#### 4. Detecção de parasitos

Foi possível detectar parasitos em 10 dos 19 pacientes estudados. Nos 9 pacientes em que o parasito não foi visualizado pela imunohistoquímica, a infecção foi confirmada por isolamento em cultivo. Os parasitos podiam ser encontrados no meio extracelular ou no citoplasma de células infectadas presentes no infiltrado inflamatório em derme, e menos freqüente em células na epiderme. Havia uma distribuição heterogênea com áreas de concentração de parasitos. A quantidade de parasitos variou de 0 a 70,6 /mm<sup>2</sup> (média 8.43 ± 5.59). Houve correlação negativa com tempo de evolução (r = - 0,709, p = 0,007) e associação entre a alta expressão de NOS2 e a baixa quantidade de parasitos detectados (or = 0,042; p = 0,05), como ilustrado pela figura 5 onde é feita a comparação visual da quantidade de macrófagos, expressão de NOS2 e quantidade de parasitas em lesões com diferentes tempos de evolução.

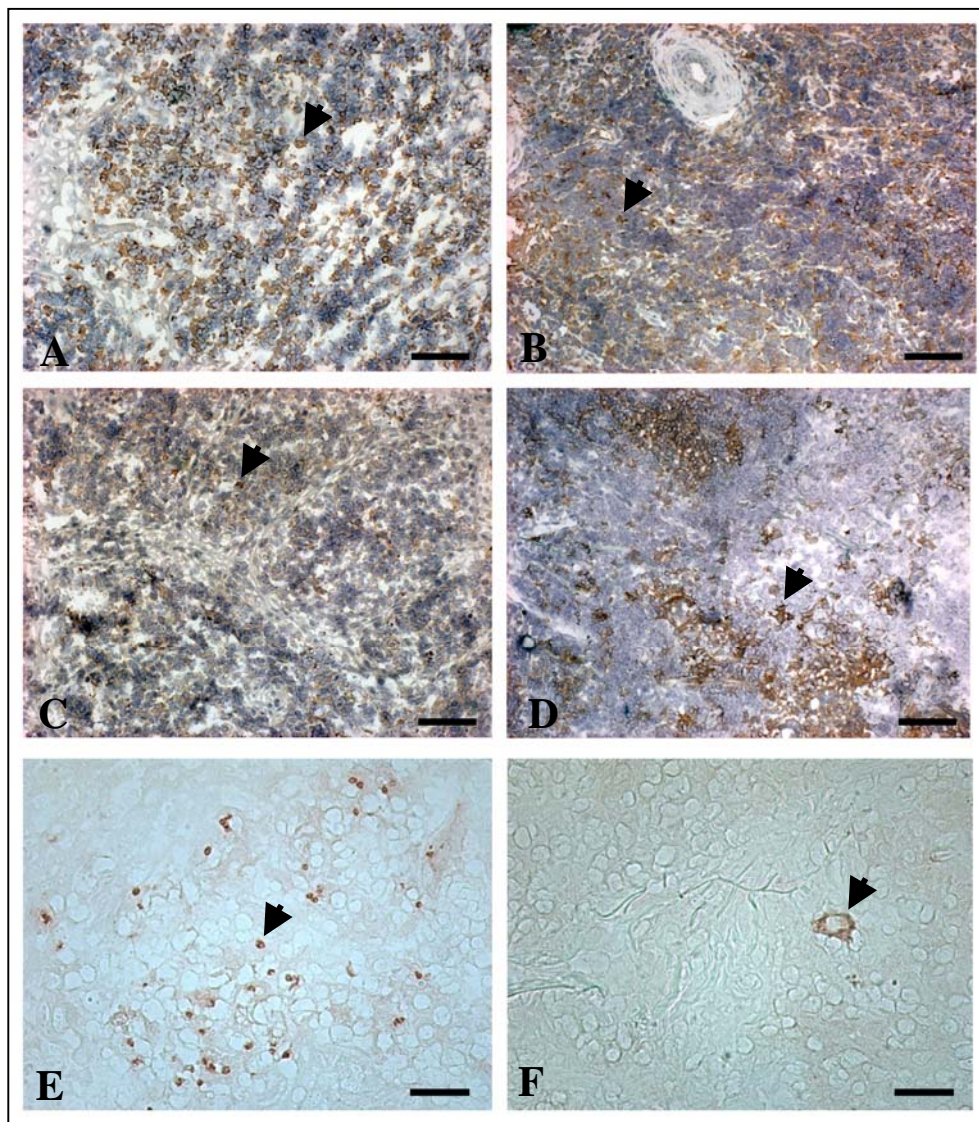


Figura 5. Detecção de macrófagos (A - B); expressão de NOS2 (C - D); parasitas (E - F), preparado como descrito em materiais e métodos. < 2 meses (A, C e E); > 4 meses (B, D e F). As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 200x (A - D / barra de aumento = 50  $\mu$ m) e 400x (E - F / barra de aumento = 25  $\mu$ m).



## *IMUNOHISTOQUÍMICA - CICATRIZES*

Os resultados estão apresentados na tabela 6, em contagem percentual sobre o número de células (nos ninhos de concentração celular em meio a áreas de fibrose) ou em mm<sup>2</sup> de área de tecido total. Os dados comparativos de lesões ativas e cicatrizes apresentando diferença significativa serão demonstrados adiante e nas figuras 10 a 13.

### 1. Macrófagos, linfócitos e neutrófilos (figura 6)

Os macrófagos CD68<sup>+</sup> podiam ser observados nos grupos de células apresentando em média 34,80 ± 4,32% nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica, e 42,98 ± 3,24% naquelas com 3 anos. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (p = 0,185). Quando comparado às lesões em atividade, houve uma redução de 5,9 vezes na intensidade de macrófagos por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 8,7 vezes naquelas com 3 anos de cura. Apesar da tendência a menor intensidade, as diferenças não foram estatisticamente significantes (p = 0,180 e p = 0,655; respectivamente).

Os linfócitos TCD3<sup>+</sup> e suas subpopulações, assim como os macrófagos eram os principais tipos celulares encontrados nos ninhos de células. Raramente essas populações podiam ser encontradas em epiderme, diferente das lesões ativas onde esta invasão era achado freqüente. As cicatrizes com 1 ano de cura clínica apresentaram percentual de CD3<sup>+</sup> variando de 37 a 58,7% (média 45,12% ± 2,6), enquanto aquelas com 3 anos de cura clínica variaram de 30 a 56,1% (média 44,01% ± 4,14). Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (p = 0,874). Quando comparado às lesões em atividade, houve uma redução de 8 vezes na intensidade de células CD3<sup>+</sup> por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 6,9 vezes naquelas com 3 anos de cura, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes (p = 0,144 e p = 0,180; respectivamente).

As células TCD4<sup>+</sup> constituíam em média 33,19% ± 3,38 nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica. Já as cicatrizes com 3 anos de cura clínica apresentaram CD4<sup>+</sup> em média 31,83% ± 2,74. Não houve diferença significativa entre os dois grupos (p = 0,791) (figura 7). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma

redução de 18,4 vezes na intensidade de células CD4<sup>+</sup> por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 13,7 vezes naquelas com 3 anos de cura. Apesar da tendência a menor intensidade, as diferenças não foram estatisticamente significantes ( $p = 0,144$  e  $p = 0,180$ ; respectivamente).

As células TCD8<sup>+</sup> constituíam em média  $24,09\% \pm 4,07$  nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica, e as cicatrizes com 3 anos de cura clínica apresentaram CD8<sup>+</sup> em média  $22,74\% \pm 3,68$ . Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,965$ ). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 10,36 vezes na intensidade de células CD8<sup>+</sup> por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 24,0 vezes naquelas com 3 anos de cura, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes ( $p = 0,080$  e  $p = 0,180$ ; respectivamente).

A quantidade de células B CD22<sup>+</sup> variou de 0 a 14,4% (média  $4,4\% \pm 3,42$ ) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica, e 0 a 10,40% (média  $3,07\% \pm 1,61$ ) naquelas com 3 anos de cura clínica. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,683$ ).

Os neutrófilos apresentaram baixa frequência, variando de 0 a 5,9% (média  $1,83\% \pm 0,88$ ) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e de 0 a 12 % (média  $2,83\% \pm 1,9$ ) naquelas com 3 anos de cura. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,868$ ). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 76,0 vezes na intensidade de neutrófilos por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 105,6 vezes naquelas com 3 anos de cura. Apesar de haver diferentes concentrações médias, devido à variação intrínseca dentro do grupo, a análise estatística demonstrou semelhança de distribuição entre os grupos ( $p = 0,109$  e  $p = 0,180$ ; respectivamente).

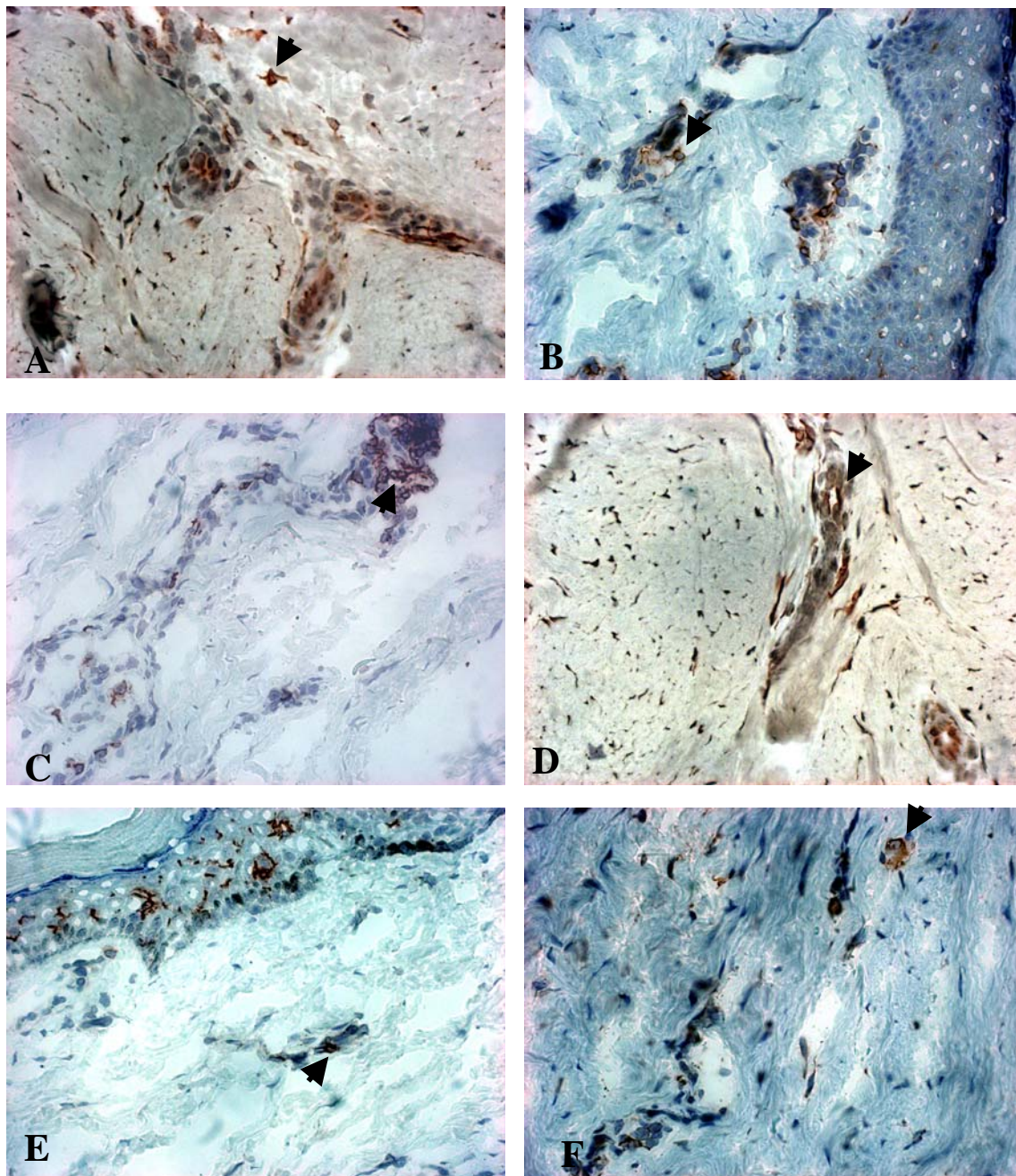


Figura 6. Cicatriz: (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células T CD4<sup>+</sup>, (c) células T CD8<sup>+</sup>, (d) macrófagos, (e) células de Langerhans, (f) células dendríticas foliculares. As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 400x.

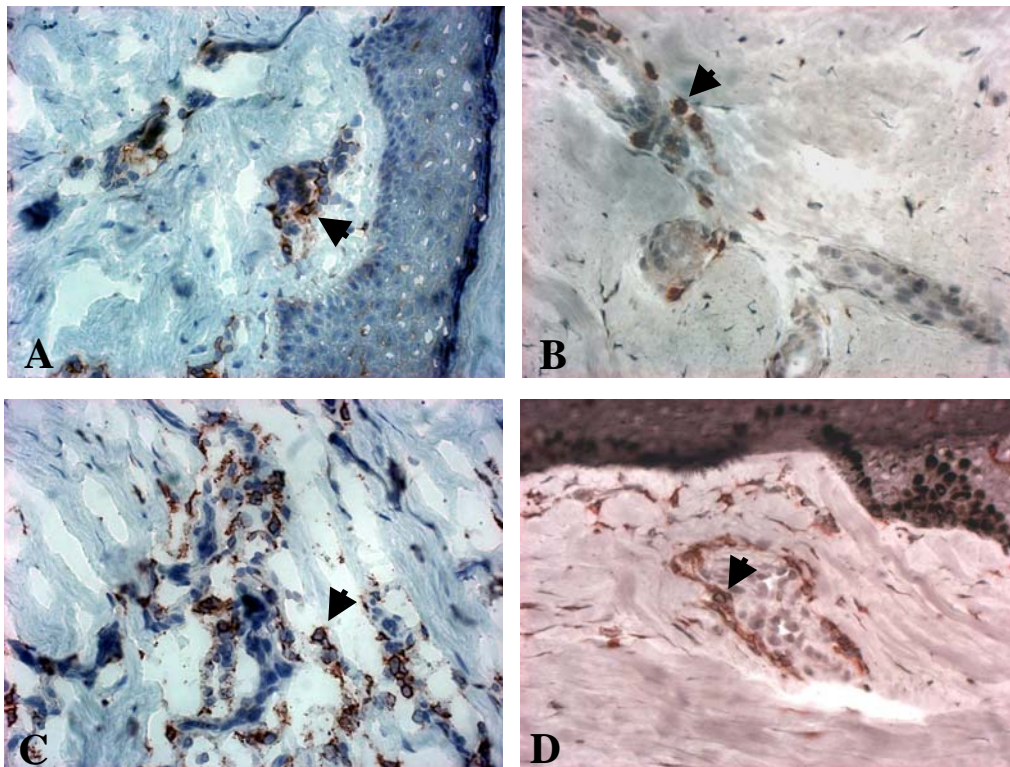


Figura 7. Detecção através de imunohistoquímica de células CD4+ (A - B); expressão de CLA (C - D); preparado como descrito em materiais e métodos. Cicatriz 1 ano de cura clínica (A, C); Cicatriz 3 anos (B, D). As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 400x.

Tabela 6. Contagem percentual e por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios das lesões cutâneas de LTA e nas cicatrizes com 1 e 3 anos de cura clínica.

<b>Marcador</b>	<b>Lesão Ativa</b>	<b>Cicatriz 1 ano</b>	<b>Cicatriz 3 anos</b>
CD3	54,85 ± 2,62	45,12 ± 2,6	44,01 ± 4,14
	636,40 ± 113,39	79,38 ± 20,12	91,77 ± 25,31
CD4	40,65 ± 3,08	33,19 ± 3,38	31,83 ± 2,74
	582,64 ± 123,06	31,66 ± 8,6	42,55 ± 11,95
CD8	34,5 ± 2,04	24,09 ± 4,07	22,74 ± 3,68
	460,66 ± 76,23	44,46 ± 11,09	19,17 ± 1,94
CD22	13,8 ± 4,8	4,4 ± 3,42	3,07 ± 1,61
	74,81 ± 41,56	ND	ND
CD1a	ND	ND	ND
	6,1 ± 1,12	1,15 ± 0,64	1,20 ± 0,32
DC	3,6 ± 0,99	7,41 ± 2,53	6,48 ± 2,36
	11,88 ± 2,92	23,96 ± 13,5	10,37 ± 3,12
CLA	31,02 ± 2,69	24,06 ± 3,7	27,16 ± 3,43
	273,79 ± 53,34	36,53 ± 8,55	72,93 ± 24,53
BCI2	38,6 ± 3,6	15,85 ± 4,48	26,92 ± 4,2
	617,11 ± 153,41	16,80 ± 8,63	47,7 ± 37
Ki67	11,5 ± 1,26	3,52 ± 1,72	2,63 ± 1,13
	97,08 ± 15,7	1,55 ± 0,79	0,6 ± 0,4
FasL	24,05 ± 2,4	18,17 ± 6,7	14,83 ± 5,49
	160,75 ± 46,78	ND	ND
Fas	52,5% ± 4,6	40,06 ± 2,31	48,22 ± 5,1
	739,38 ± 132,14	92,48 ± 17,6	103,10 ± 11,60
MO	45,77 ± 1,44	34,80 ± 4,32	42,98 ± 3,24
	(769,92 ± 141,34)	(107,40 ± 25,45)	(73,00 ± 16,55)
NEU	15,3 ± 3,5	1,83 ± 0,88	2,83 ± 1,90
	114,07 ± 35,29	1,50 ± 0,75	1,08 ± 0,64

ND – não determinado

Vide dados comparativos nas figuras 10 a 13.

## 2. Distribuição e perfil quantitativo de células de Langerhans (figura 6)

As células CD1a<sup>+</sup> podiam ser encontradas em grande quantidade em epiderme em todos os casos estudados, e em menor quantidade em derme papilar. A proximidade a vasos sanguíneos também pôde ser constatada. Na derme, a intensidade de células CD1a<sup>+</sup> variou de 0 a 5,5 /mm<sup>2</sup> (média 1,15 ± 0,64) e de 0 a 2,7 /mm<sup>2</sup> (média 1,2 ± 0,32) nas cicatrizes com 1 e 3 anos de cura clínica, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (p = 0,258). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 5,2 vezes na intensidade de CD1a<sup>+</sup> por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 5,0 vezes naquelas com 3 anos de cura. Não foi observada diferença significativa para as cicatrizes com 1 ano de cura clínica (p = 0,069), porém foi observado para aquelas com 3 anos (p = 0,046).

## 3. Marcadores de inflamação (figura 8)

As células CLA<sup>+</sup> variaram de 7 a 36,30% (média 24,06% ± 3,7) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica, e 8,3 a 38,90% (média 27,16% ± 3,4) naquelas com 3 anos. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (p = 0,636). Foi possível observar a co-localização entre a presença de endotélio ativado e células expressando CLA (figura 8). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 7,5 vezes na intensidade de CLA<sup>+</sup> por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 3,8 vezes naquelas com 3 anos de cura. Foi observada diferença significativa para as cicatrizes com 1 ano de cura clínica (p = 0,028), porém não foi observado para aquelas com 3 anos (p = 0,180).

A expressão de Ki67 variou de 0 a 14,9% (média 3,52% ± 1,72) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica, estando ausentes em 5 casos. Nas cicatrizes com 3 anos de cura clínica foram encontradas de 0 a 10,5% (média 2,63% ± 1,13), estando ausentes em 4 casos. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (p = 0,887). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 62,6 vezes na intensidade de Ki67 por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 161,8 vezes naquelas com 3 anos de cura, porém não foi observada diferença significativa (p = 0,053 e p = 0,068; respectivamente).

A expressão de NOS2 foi de baixa intensidade em todos os casos (discreto a moderado), estando ausente em 4 deles. Destes, 3 eram provenientes de pacientes com 3 anos de cura clínica. Foi observada redução significativa da intensidade de expressão de NOS2 nas cicatrizes com 3 anos de cura clínica quando comparado ao grupo com 1 ano ( $p = 0,03$ ).

Foi observada baixa expressão de E-selectina, variando de discreto a moderado. Os vasos ativados podiam ser encontrados no centro dos grupos de células presentes em derme em meio à intensa fibrose (figura 9). Não houve diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,546$ ).

A expressão de BCL-2 variou de 0 a 35,8% (média  $15,85\% \pm 4,48$ ) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica. Já nas cicatrizes com 3 anos houve variação de 12,6 a 45% (média  $26,92\% \pm 4,2$ ). Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos ( $p = 0,124$ ). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 36,7 vezes na intensidade de BCL-2 por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 12,9 vezes naquelas com 3 anos de cura, porém não foi observada diferença significativa ( $p = 0,655$  e  $p = 0,880$ ; respectivamente).

A expressão do ligante para Fas variou de 0 a 50,9% (média  $18,17\% \pm 6,7$ ) e 0 a 48,1% (média  $14,83\% \pm 5,49$ ) nas cicatrizes com 1 ano e 3 anos de cura clínica, respectivamente. Já a expressão do receptor Fas variou de 30,1 a 49,1% (média  $40,06\% \pm 2,31$ ) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica. Nas cicatrizes com 3 anos, Fas<sup>+</sup> variou de 24,3 a 69,7% (média  $48,22\% \pm 5,1$ ). Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos tanto para FasL ( $p = 0,481$ ) quanto para Fas ( $p = 0,171$ ). Quando comparado às lesões em atividade, evidenciou-se uma redução de 8 vezes na intensidade de Fas por área de tecido nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica e 7,2 vezes naquelas com 3 anos de cura, porém não foi observada diferença significativa ( $p = 0,655$  e  $p = 0,180$ ).

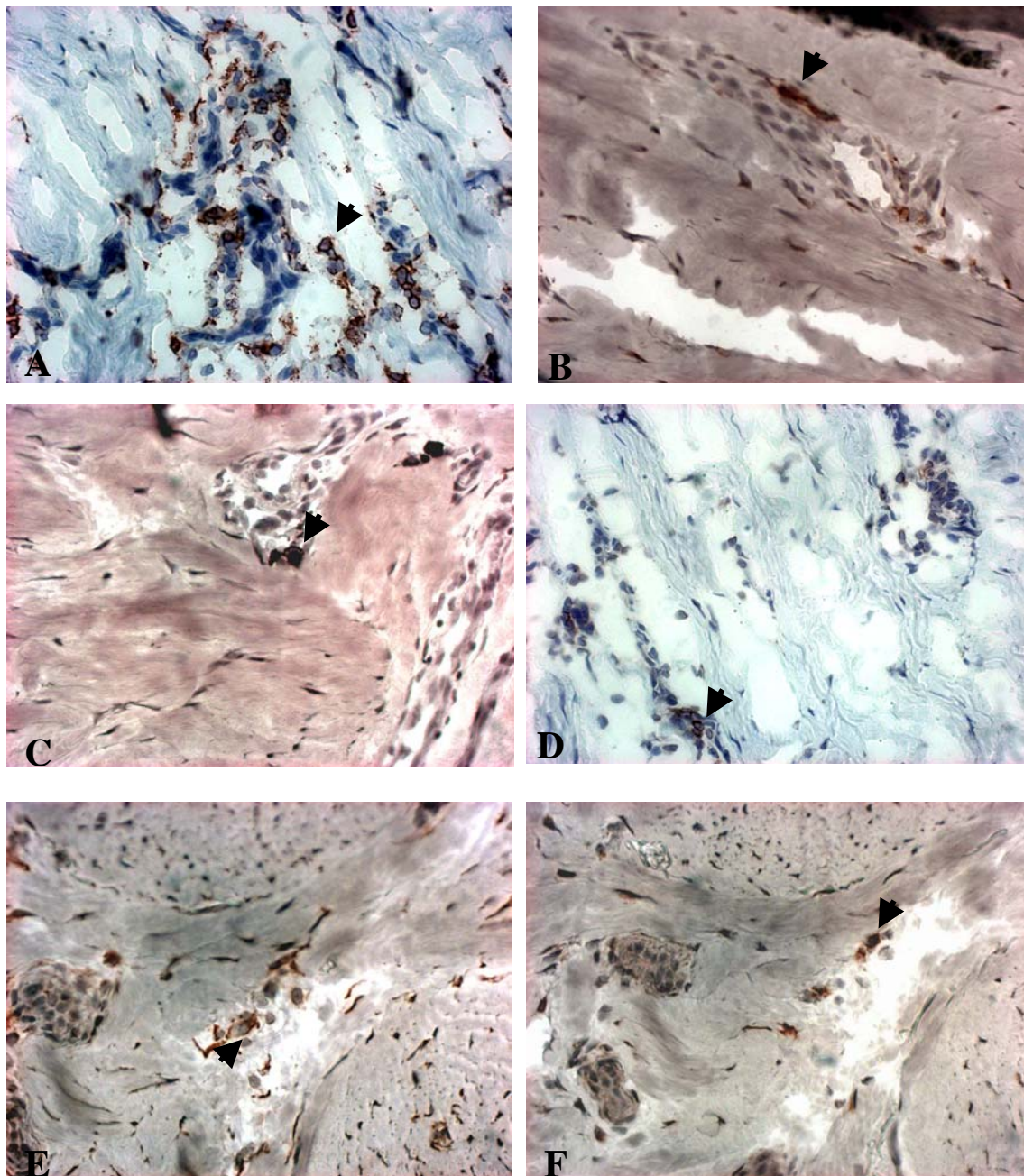


Figura 8. Cicatriz: **(a e b)** células  $CLA^+$ , **(c)** neutrófilos, **(d)** células  $BCL-2^+$ , **(e)** células  $Fas^+$ , **(f)** células  $FasL^+$ . As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 400x.



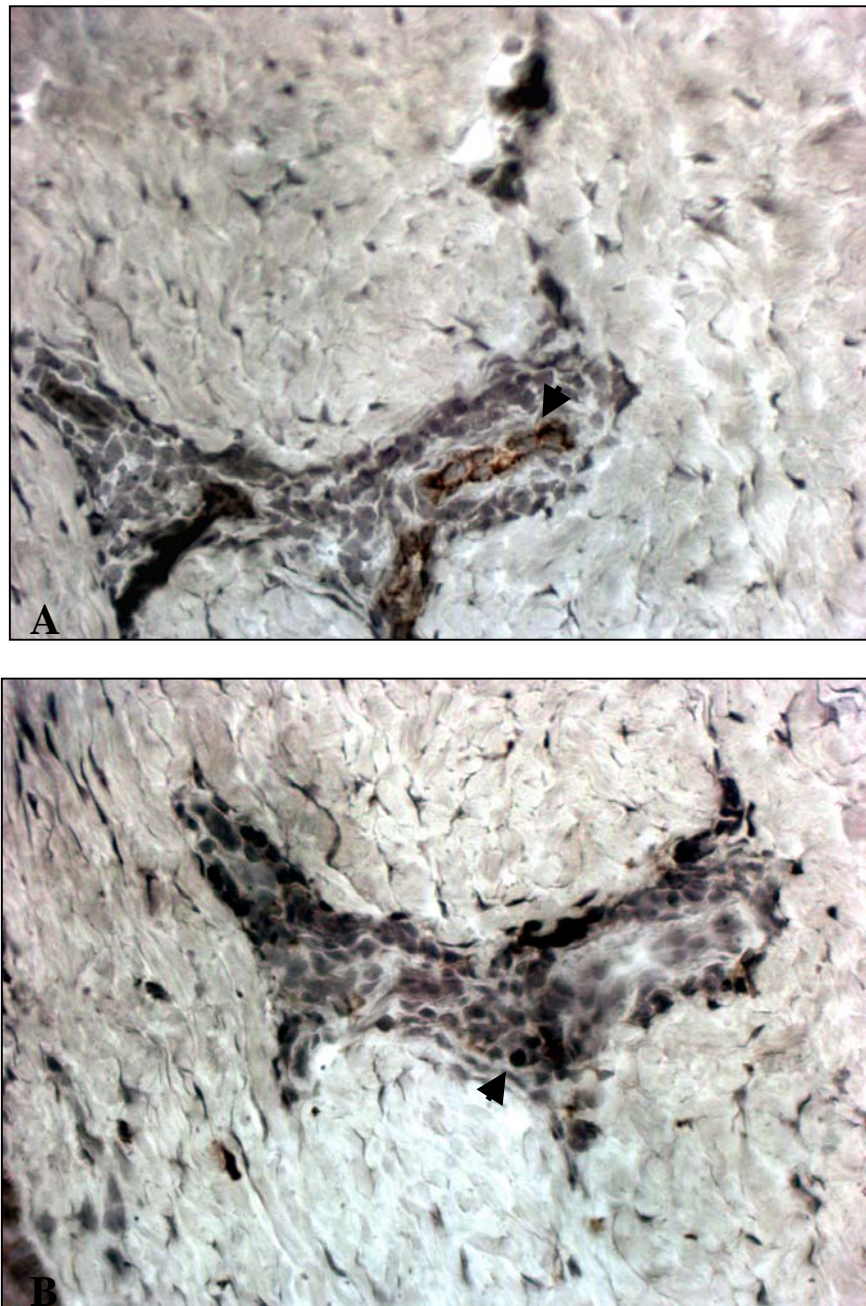


Figura 9. Detecção através de imunohistoquímica, em cicatriz, de endotélio expressando E-selectina (A); expressão de CLA (B); preparado como descrito em materiais e métodos. As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 200x.

#### 4. Detecção de parasitos

Não foram detectados parasitos íntegros nas cicatrizes e suas respectivas peles sadias contralaterais. Algumas imagens, em cicatrizes, sugeriam a presença de restos parasitários e granulações em citoplasma.

*Evidenciação de diferenças significativas na análise comparativa lesões em atividade versus cicatrizes – (figuras 10, 11, 12 e 13).*

Ao comparar os dados obtidos em lesões em atividade com aqueles obtidos nas cicatrizadas, foi observada redução significativa do percentual de neutrófilos ( $p = 0,043$ ) (figura 11), e dos seguintes marcadores de atividade: NOS2 ( $p = 0,023$ ), E-selectina ( $p = 0,024$ ), Ki67 ( $p = 0,028$ ), BCl-2 ( $p = 0,036$ ) e Fas ( $p = 0,028$ ) nas cicatrizes com 1 ano de cura clínica. Esta redução foi mais pronunciada nas cicatrizes com 3 anos de cura clínica para NOS2 ( $p = 0,006$ ), e-selectina ( $p = 0,026$ ), Ki67 ( $p = 0,011$ ) e BCl2 ( $p = 0,021$ ) (figura 12).

Além disso, nas cicatrizes mais antigas ainda pôde ser observada redução do percentual de linfócitos TCD3 ( $p = 0,043$ ), CD4 ( $p = 0,015$ ), CD8 ( $p = 0,011$ ) (figura 11) e células de Langerhans (CD1a<sup>+</sup>) ( $p = 0,046$ ) (figura 12).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa, evidenciou-se a redução de intensidade por área de tecido para todos os marcadores, com exceção das células dendríticas foliculares (Tabela 6 e figura 10), como descrito no tópico de análise imunohistoquímica das cicatrizes.

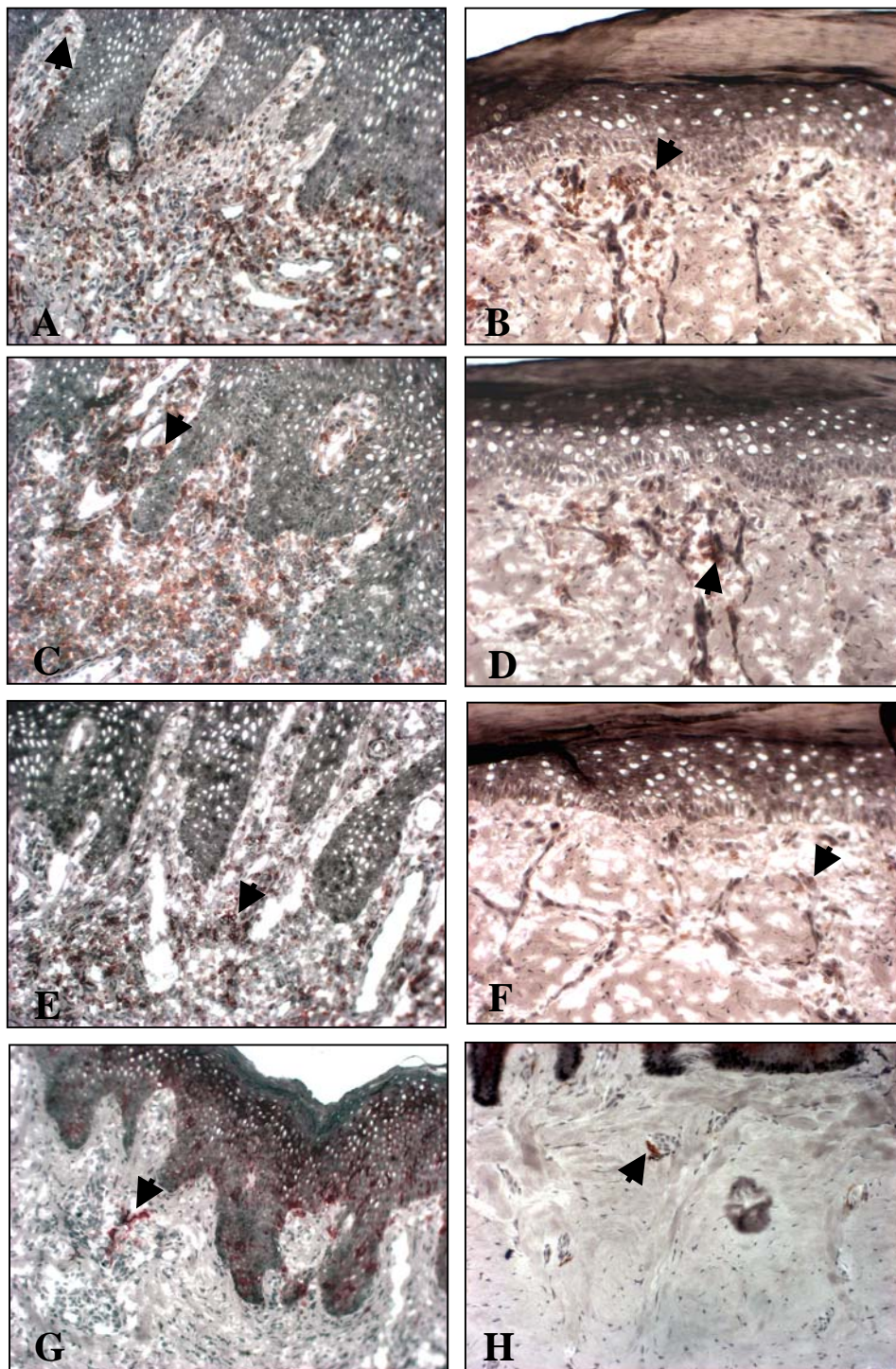


Figura 10. Detecção através de imunohistoquímica de células  $CD3^+$  (A - B);  $CD4^+$  (C - D);  $CD8^+$  (E - F);  $CD1a^+$  (G - H), preparado como descrito em materiais e métodos. Lesão ativa (A, C, E e G); cicatriz (B, D, F e H). As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 200x.

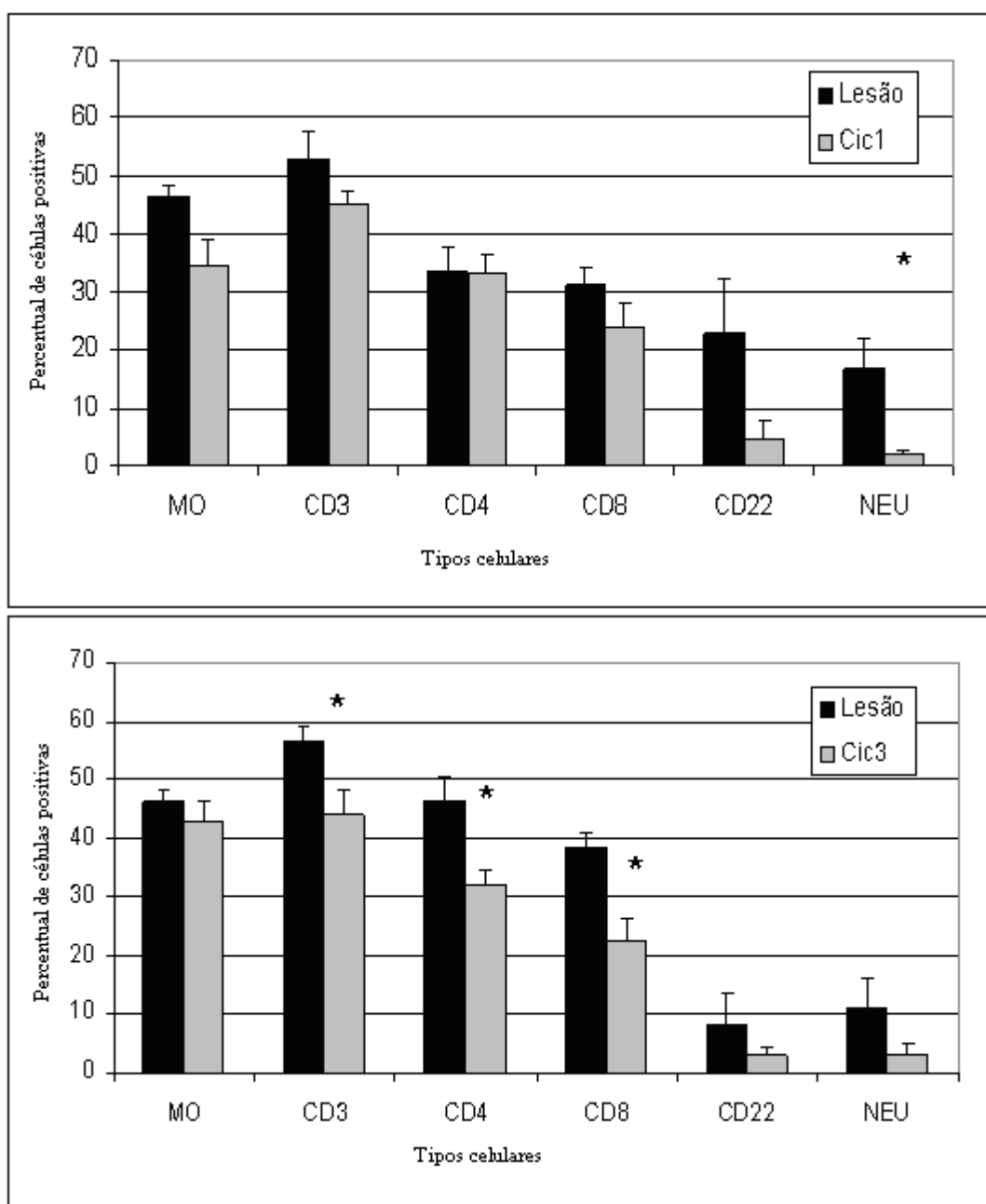


Figura 11. Análise comparativa da distribuição fenotípica em (a) lesão ativa *versus* cicatriz 1 ano de cura clínica e (b) lesão ativa *versus* cicatriz 3 anos de cura clínica.

\*  $p < 0,05$ . MO – macrófagos, NEU – neutrófilos, cic1 – cicatriz 1 ano, cic3 – cicatriz 3 anos.

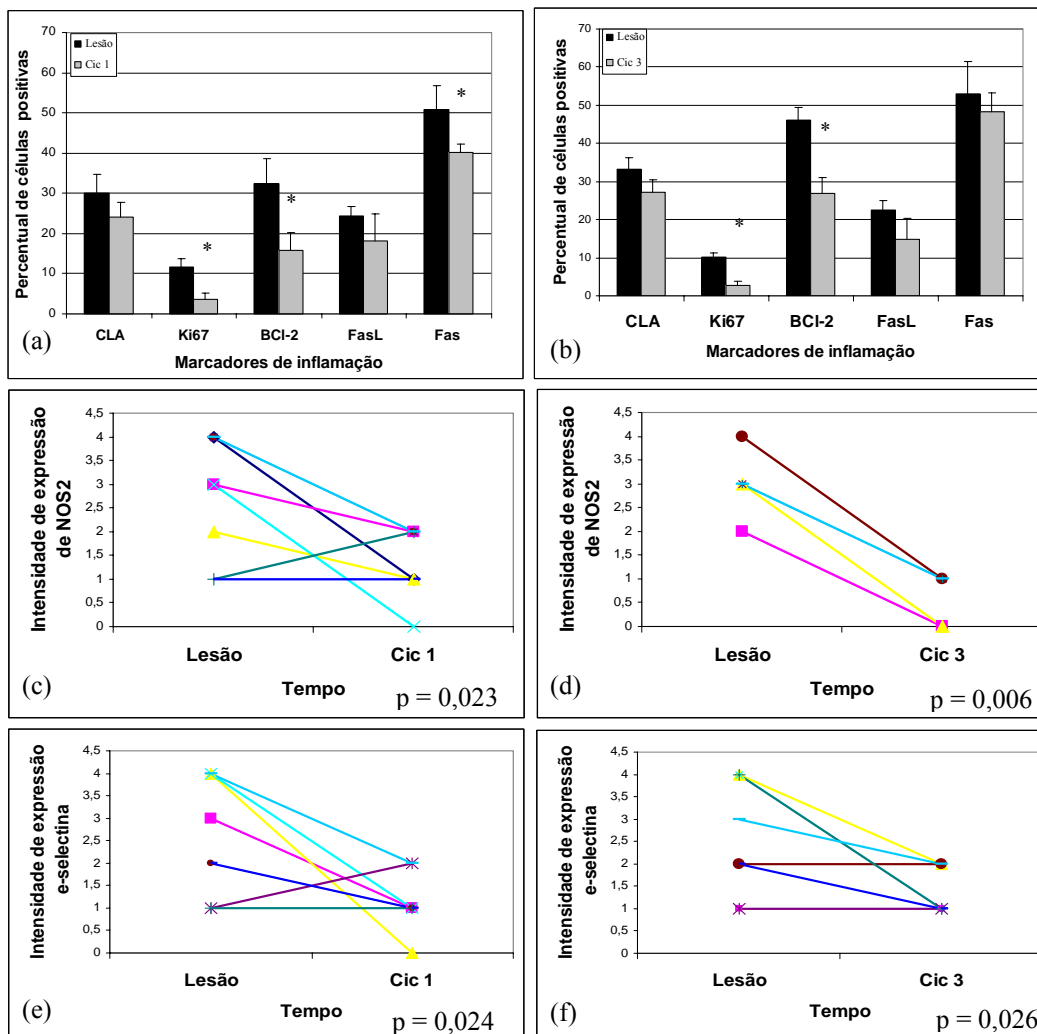


Figura 12. Análise comparativa de atividade inflamatória em lesão ativa *versus* cicatriz. (a) Comparação dos marcadores de direcionamento para a pele (CLA), proliferação celular (Ki67) e apoptose (Fas/FasL) com cicatrizes 1 ano e (b) 3 anos de cura clínica. (c) Expressão de NOS2 em lesão ativa *versus* cicatriz 1 ano e (d) 3 anos. (e) Expressão de E-selectina em lesão ativa *versus* cicatriz 1 ano e (f) 3 anos. Cada linha representa 1 paciente. \*  $p < 0,05$ .

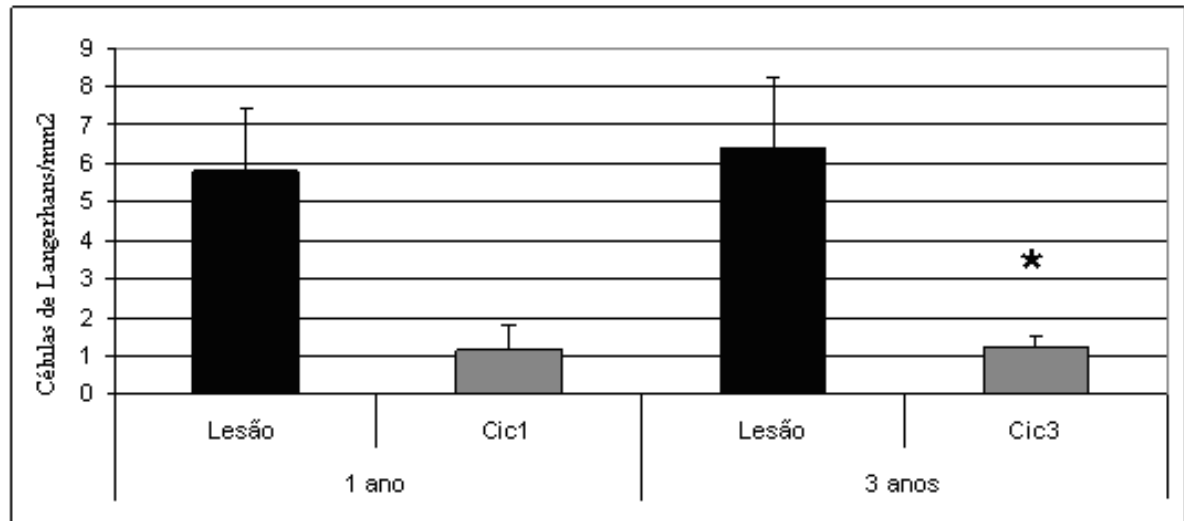


Figura 13. Análise comparativa da intensidade de células de Langerhans em derme em lesão ativa *versus* (a) cicatriz com 1 ano de cura e (b) com 3 anos de cura clínica. \*p = 0,046.

*Análise comparativa cicatrizes versus peles sadias contralaterais – (tabela 7 e figura 14)*

A análise comparativa entre cicatrizes e suas respectivas peles contralaterais mostrou, em geral, uma menor intensidade dos tipos celulares e marcadores inflamatórios nas peles sadias, porém esta diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

As cicatrizes com 3 anos de cura clínica apresentavam localização das populações celulares semelhante às peles sadias, tendo seus tipos celulares formando as unidades perivasculares dérmicas, e concentrados nas proximidades aos anexos cutâneos como folículos pilosos e ductos glandulares como demonstrado através da figura 7 (B e D) em cicatriz e figura 13 em pele sadia . Ainda na figura 13 é possível observar a presença de células CD1a<sup>+</sup> em epiderme e a expressão de E-selectina em endotélio.

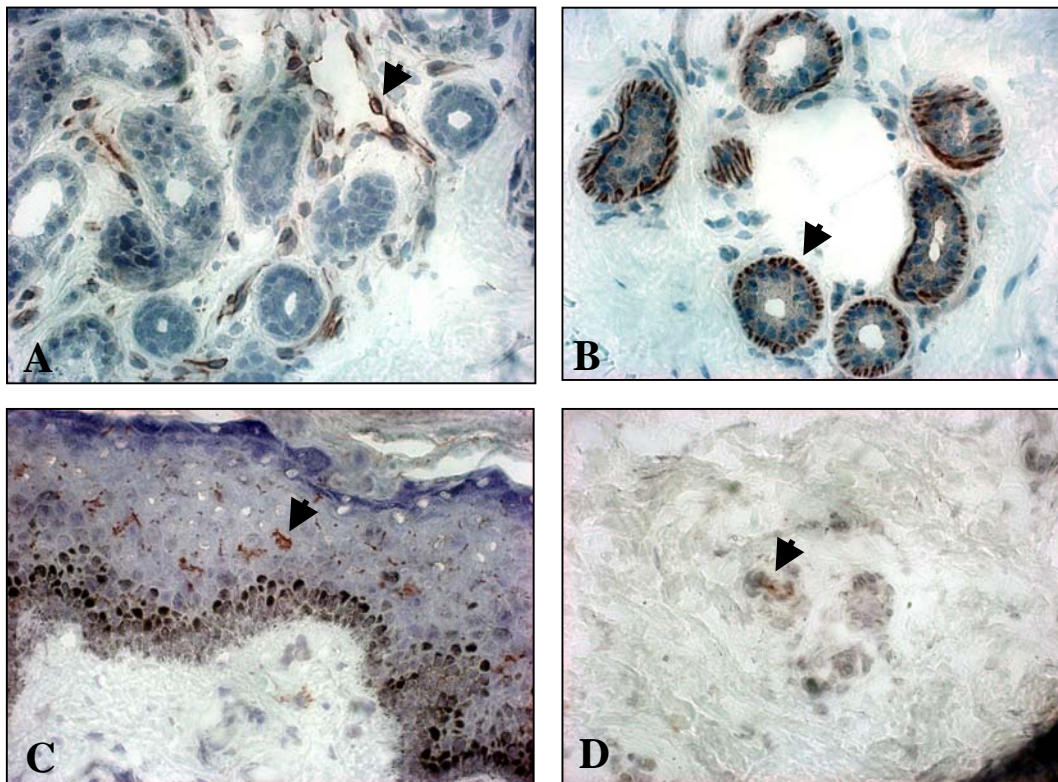


Figura 14. Detecção em pele sadia contralateral de células Fas<sup>+</sup> (A); FasL<sup>+</sup> (B); CD1a<sup>+</sup> (C); E-selectina (D), preparado como descrito em materiais e métodos. As colorações são as mesmas descritas para a figura 1. As setas exemplificam as células positivas. Aumento 400x.



Tabela 7. Contagem percentual e por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios das cicatrizes com 1 e 3 anos de cura clínica, e respectivas peles sadias.

Marcador	1 ano		3 anos	
	<i>Cicatriz</i>	<i>Pele sadia</i>	<i>Cicatriz</i>	<i>Pele sadia</i>
CD3	45,12 ± 2,6	26,5 ± 6,02	44,01 ± 4,14	ND
	79,38 ± 20,12	17,25 ± 10,25	91,77 ± 25,31	ND
CD4	33,19 ± 3,38	23,55 ± 3,37	31,83 ± 2,74	23,48 ± 3,83
	31,66 ± 8,6	26,04 ± 9,32	42,55 ± 11,95	24,88 ± 8,37
CD8	24,09 ± 4,07	17,99 ± 3,92	22,74 ± 3,68	19,35 ± 3,49
	44,46 ± 11,09	24,50 ± 16,47	19,17 ± 1,94	39,38 ± 13,41
CD1a	ND	ND	ND	ND
	1,15 ± 0,64	1,4 ± 0,65	1,20 ± 0,32	4,50 ± 1,76
DC	7,41 ± 2,53	5,1 ± 1,31	6,48 ± 2,36	14,13 ± 3,54
	23,96 ± 13,5	10,40 ± 3,54	10,37 ± 3,12	7,55 ± 0,92
CLA	24,06 ± 3,7	35,28 ± 5,73	27,16 ± 3,43	33,53 ± 2,29
	36,53 ± 8,55	45,88 ± 20,87	72,93 ± 24,53	52,50 ± 12,18
BC12	15,85 ± 4,48	20,86 ± 6,20	26,92 ± 4,2	21,43 ± 3,98
	16,80 ± 8,63	9,25 ± 7,59	47,7 ± 37	13,00 ± 2,61
Ki67	3,52 ± 1,72	1,88 ± 0,77	2,63 ± 1,13	1,72 ± 0,93
	1,55 ± 0,79	0,75 ± 0,48	0,6 ± 0,4	0,60 ± 0,24
FasL	18,17 ± 6,7	10,33 ± 5,21	14,83 ± 5,49	7,72 ± 3,87
	ND	1,20 ± 1,20	ND	5,25 ± 3,54
Fas	40,06 ± 2,31	51,10 ± 14,88	48,22 ± 5,1	57,78 ± 8,83
	92,48 ± 17,6	14,00 ± 7,00	103,10 ± 11,6	53,67 ± 15,34
MO	34,80 ± 4,32	35,80 ± 8,09	42,98 ± 3,24	29,98 ± 4,87
	107,40 ± 25,45	33,57 ± 15,89	73 ± 16,55	34,68 ± 12,10
NEU	1,83 ± 0,88	8,05 ± 8,05	2,83 ± 1,90	0
	1,50 ± 0,75	2,25 ± 1,97	1,08 ± 0,64	0

ND – não determinado

A comparação entre os dados obtidos no estudo dos tecidos cicatriciais e das peles sadias não demonstraram diferenças significativas na concentração de células ( $p > 0,05$ ).

### *Resposta proliferativa primária*

A LPR foi realizada nos diferentes tempos (lesão em atividade, cicatriz 1 ano e cicatriz 3 anos de cura clínica). Apenas 1 paciente com lesão em atividade apresentou resposta negativa ( $SI < 2,5$ ), o restante variou de 2,5 a 33,4 (média  $9,53 \pm 3,98$ ). O paciente não respondedor precisou de mais séries de glucantime que o habitual e também doses intralesionais. Além disso, suas lesões levaram 4 meses para cicatrizar, tempo superior à média ( $1,4 \pm 0,24$  meses).

Todos os pacientes com 1 ano de cura clínica apresentaram respostas positivas ao Lb-Ag variando de 3 a 22 (média  $13,4 \pm 3,94$ ). Dos pacientes com 3 anos de cura clínica apenas 1 apresentou resposta negativa ( $SI = 2$ ) e o restante variou de 3,4 a 30 (média  $12,57 \pm 2,93$ ). O paciente não respondedor apresentou cura espontânea e não foi submetido ao tratamento com glucantime, e quando em lesão em atividade obteve um  $SI = 4,4$ . Não foram encontradas diferenças significativas entre estes dois grupos ( $p = 0,413$ ), assim como entre lesão em atividade e cicatrizes dos dois grupos ( $p = 0,299$  e  $p = 0,222$ ) (figura 15). Não foi possível fazer análise pareada destes resultados devido ao número de pacientes avaliados durante a atividade da doença.

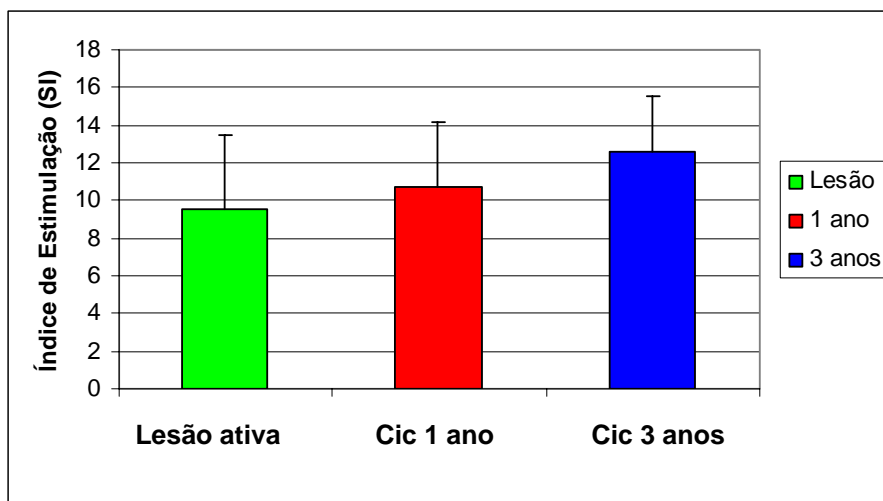


Figura 15. Resposta proliferativa primária de PBMC estimuladas com Lb-Ag.

Cic= cicatriz

### *Caracterização fenotípica das células respondedoras in vitro ao Lb-Ag*

Foi realizada a caracterização fenotípica das células que proliferaram quando estimuladas *in vitro* ao Lb-Ag nos diferentes tempos (lesão ativa, cicatriz 1 ano e 3 anos). Durante a atividade da doença, o percentual de CD3<sup>+</sup> variou de 44,7 a 87,1% (média 70,07 ± 5,2%), %CD4<sup>+</sup> variou de 36,5 a 77,4% (média 52,47 ± 5,6%) e %CD8<sup>+</sup> de 6,7 a 23,3% (média 15,87 ± 2,61%).

Os pacientes com 1 ano de cura clínica apresentaram percentual de CD3<sup>+</sup> variando de 17,4 a 91,8% (média 67,6 ± 8,1%), %CD4<sup>+</sup> variou de 15,3 a 50,6% (média 40,94 ± 3,9%) e %CD8<sup>+</sup> de 2,6 a 44,5% (média 27,7 ± 4,54%). Não houve diferença significativa quando com parado às lesões ativas. Não foi possível fazer as análises pareadas.

Já os pacientes com 3 anos de cura clínica apresentaram percentuais de CD3<sup>+</sup> variando de 54,6 a 87,9% (média 72,6 ± 3,8%), %CD4<sup>+</sup> variando de 38,2 a 62,2% (média 49,6 ± 2,7%) e %CD8 de 18,8 a 40,7% (média 26,4 ± 2,09%). Não houve diferença quando comparado às cicatrizes com 1 ano de cura clínica, porém houve um aumento significativo do %CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,005$ ) quando comparado às lesões em atividade.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisado o infiltrado inflamatório em lesões cutâneas ulceradas de LTA apresentando diferentes tempos de evolução, a constituição celular de cicatrizes com 1 e 3 anos após a cura clínica, e a resposta proliferativa primária destes pacientes.

As lesões de LTA em atividade mostraram consideráveis infiltrados inflamatórios, constituídos principalmente por células T e macrófagos. Os macrófagos são as células hospedeiras das formas amastigotas de *Leishmania*. No entanto, uma vez ativadas são capazes de eliminar o parasito através de seus mecanismos microbicidas. A eliminação de amastigotas por macrófagos murinos e humanos depende principalmente de mecanismos oxidativos, como intermediários reativos de oxigênio (ROI) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI), em particular NO, cuja produção é estimulada pela ativação da enzima NOS2 (Bradoniso et al., 2001). Neste trabalho observamos a expressão de NOS2 tanto em lesões recentes quanto tardias, estando sua intensidade diretamente correlacionada com a quantidade de células T CD3<sup>+</sup>. Esta associação sugere a importância dos linfócitos na ativação de macrófagos e produção de NO. Também foi possível detectar uma associação entre a alta expressão de NOS2 e baixa quantidade de parasitos indicando a importância de NOS2 na eliminação das formas amastigotas do sítio de lesão. A ausência de correlação entre NOS2 e macrófagos sugere que muitas destas células poderiam não estar ativadas ao estado parasiticida. Muitos macrófagos parasitados não são bem-sucedidos em destruir os parasitos devido a mecanismos de escape como a degradação de moléculas MHC-II, prejudicando assim a apresentação de antígenos e ativação de células T helper (Lang et al., 1994; De Souza-Leão et al., 1995). Apesar disto, estes macrófagos são ainda capazes de liberar citocinas e quimiocinas que atraem mais macrófagos para o sítio de lesão. Como a diminuição da carga parasitária foi verificada em lesões tardias, estes resultados podem sugerir que nas lesões mais antigas estes macrófagos possam ser utilizados no processo de eliminação por apoptose das células inflamatórias desnecessárias, como já anteriormente descrito (Fadok et al., 1998; Orteu et al., 1998). Nestes casos, os macrófagos tendem a permanecer inativados auxiliando assim no controle e redução do processo inflamatório, necessário ao início da cicatrização das

lesões (Fujiwara & Kobayashi, 2005). O achado de maior concentração de áreas de fibrose, assim como a tendência de aumento de células expressando FasL nas lesões antigas parece corroborar esta hipótese.

Já foi demonstrado a importância de células TCD4<sup>+</sup>FasL<sup>+</sup> no controle do infiltrado inflamatório facilitando o estabelecimento do processo de cicatrização (Conceição-Silva et al., 1998). Por outro lado, células TCD8<sup>+</sup> têm sido descritas como importantes para o desenvolvimento da LTA tanto no modelo murino (Conceição-Silva et al., 1994) quanto em pacientes (Da-Cruz et al., 1994; Brodiskyn et al., 1997). Devido à predominância de intensidade e distribuição, os resultados do presente trabalho sugerem que nas lesões recentes, a resposta imunológica local se faz através da ação conjunta das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em igual intensidade, pois mesmo havendo áreas de concentração diferentes, CD8<sup>+</sup> era ou mais abundante ou equivalente à concentração de CD4<sup>+</sup>. Nas lesões tardias, a densidade do infiltrado inflamatório não era homogênea, mas tanto nas áreas menos densas quanto nas de maior concentração de células era verificado uma constante superioridade de células CD4<sup>+</sup> em relação às CD8<sup>+</sup>, assim como o aumento da razão CD4/CD8, pois a concentração de CD8<sup>+</sup> tendeu a diminuir. Machado e cols (2002) estudando a citotoxicidade *in situ* na LTA, observaram uma notável presença de células TCD8<sup>+</sup> e células ativadas, e sugeriram que este tipo celular estaria envolvido na eliminação do parasito e desenvolvimento da úlcera. Assim, lesões cuja carga parasitária estivesse em declínio poderiam prescindir do acúmulo exagerado de células TCD8<sup>+</sup>. Neste estudo, as células TCD8<sup>+</sup> apresentaram a tendência a maiores quantidades nas lesões recentes, onde também eram observados os maiores números de parasitos, portanto, o efeito citotóxico destas células TCD8<sup>+</sup> parece perder importância nas lesões com maior tempo de evolução, quando o número de parasitos começa a ser controlado.

Lima et al. (1994) encontraram percentual *in situ* equivalente de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e não observaram diferenças entre lesões tardias e recentes, porém estes autores consideraram como limite 1,5 meses e no presente trabalho consideramos como lesões tardias aquelas com mais de 4 meses de evolução. Isaza et al. (1996) estudando lesões de LTA em pacientes infectados por *L. panamensis*, observaram relação CD4/CD8 de  $0,80 \pm 0,06$ , em pacientes com menos de 2 meses de evolução, resultado este semelhante ao obtido no presente trabalho. Por outro lado, em relação à função de

células TCD8<sup>+</sup>, Da-Cruz et al. (1994) estudando células recuperadas do sangue periférico compararam as proporções de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> - *Leishmania* específicas antes e depois do tratamento, e observaram uma redução significativa da razão CD4/CD8. Sugeriram, então, que o aumento dos níveis de células TCD8<sup>+</sup> e a produção de IFN- $\gamma$  poderiam ser importantes para a cura das lesões e também para proteção imunológica. Esta aparente contradição com os resultados aqui apresentados pode ser explicada pelos diferentes sítios de estudo (resposta imune celular periférica X infiltrado inflamatório *in situ*). Além disto, como as lesões tardias foram estudadas ainda na fase de atividade, antes do início do tratamento específico, não se pode descartar que as lesões em franco processo de cicatrização apresentariam o aumento, mesmo que transitório de células TCD8<sup>+</sup>. Corroborando esta hipótese, o estudo *in vitro* (RPL) destes mostrou um aumento significativo de células CD8<sup>+</sup> respondedoras que não se relacionava aos achados *in situ*.

Um fator indicativo de atividade das lesões foi o encontro consistente de neutrófilos de permeio aos linfócitos nos sítios de lesão. A constatação da intensa positividade de elastase neutrofílica em áreas de necrose em algumas lesões e o achado de lesões apresentando infecções bacterianas secundárias (dados não demonstrados) não permite a correlação direta com a atividade leishmanicida local. Trabalhos anteriores têm demonstrado a importância de neutrófilos no início da infecção por *Leishmania* sp demonstrando que camundongos depletados de polimorfonucleares neutrófilos apresentavam maiores cargas parasitárias (Lima et al., 1998). Por outro lado, a literatura tem pontuado a importância da associação de patógenos na apresentação clínica e evolução de lesões tegumentares pela associação de infecções secundárias por bactérias e fungos intensificando a injúria da pele (Taskapan et al., 2000). Desta forma, mesmo se os neutrófilos estivessem presentes nas lesões devido a outros patógenos, sua atividade poderia contribuir para a intensidade do processo inflamatório e manutenção das lesões em atividade.

Nas lesões em atividade as células de Langerhans CD1a<sup>+</sup> foram observadas distribuídas na epiderme formando, lado a lado e com suas projeções, uma rede de células. É descrito na literatura que uma das funções deste tipo celular é capturar e transportar os antígenos protéicos para os linfonodos (Moll et al., 1995). Algumas destas células formavam grupos alinhados, sendo ainda observados em determinadas

áreas da derme grupos próximos a vasos CD62E positivos (dados não demonstrados). Segundo Koch et al. (2006) pouca informação existe sobre os sinais que controlam a migração das células de Langerhans do sangue para a epiderme. Assume-se que não há uma origem única para as células de Langerhans e que as condições locais na epiderme direcionam o seu desenvolvimento. Sob trauma ou inflamação da epiderme, os queratinócitos produzem quimiocinas, como por exemplo MIP-3 $\alpha$  (Dien-Nosjan et al., 2000), atraindo precursores destas células para a região. As alterações histológicas observadas na epiderme sugerem uma proliferação importante e uma intensa participação de queratinócitos na atividade das lesões, o que poderia sugerir uma participação de queratinócitos na produção de citocinas e quimiocinas que atuariam não só sobre células de Langerhans, mas sobre o infiltrado inflamatório como um todo. Apesar da sugestão visual de atividade de migração em direção aos vasos, nossos dados não permitem esta afirmação e outras análises devem ser realizadas de modo a caracterizar esta movimentação.

As células CLA<sup>+</sup> também eram encontradas com grande frequência no interior de vasos e aderidas ao endotélio nas lesões ativas. A importância desta molécula nos processos de migração e localização celular na pele já foi demonstrado (Elhassan et al., 1994). Os linfócitos T sensibilizados no linfonodo regional, através da ação das células apresentadoras de antígenos, passam a expressar moléculas de superfície (CLA, LFA-1) que os direcionam para o sítio de lesão. Essa migração é possibilitada pela expressão de CD62E e ICAM-1 pelo endotélio das vênulas ativadas pelas citocinas inflamatórias. Nas lesões estudadas as expressões de CD62E e CLA<sup>+</sup> apresentaram intensidade variável e não apresentaram correlação com o tempo de evolução. Estes resultados corroboram a indicação de lesões em atividade mesmo após tempos de evolução superiores a 4 meses.

O percentual médio de positividade para Ki67 mostra que parte das células estava em proliferação no sítio da lesão o que pode contribuir para o aumento local da população de células. Foi encontrada uma correlação positiva de Ki67 com a quantidade de células TCD4<sup>+</sup> (p = 0,058), o que sugere que estas seriam as células em proliferação, e a possível explicação para o acúmulo destas células e aumento da razão CD4/CD8 de acordo com o tempo de evolução. Em adição, a correlação positiva entre a expressão de KI67<sup>+</sup> e BC12<sup>+</sup> corroboram o ambiente de proliferação celular e proteção da apoptose.

As etapas de proliferação e resolução do processo inflamatório foram elegantemente demonstradas por Orteu et al. (1998) principalmente baseados na expressão de BCL-2 e FasL respectivamente. Juntos estes dados mais uma vez demonstram a atividade inflamatória nas lesões e indica, junto com a correlação negativa para FasL, que o processo inflamatório ainda se encontrava em fase proliferativa.

Foi detectada intensa expressão de Fas. Esta molécula, quando ativada pela via FasL-Fas desencadeia uma cascata enzimática levando à morte celular por apoptose. Neste estudo não foi possível observar uma diferença significativa nas quantidades de células FasL<sup>+</sup> em relação ao tempo de evolução. Já foi demonstrado no modelo animal a importância da via Fas-FasL no controle do processo inflamatório. Conceição-Silva et al. (1998) estudando camundongos deficientes de Fas ou FasL demonstraram ser necessária a presença destas moléculas para o controle do processo inflamatório e cicatrização das lesões *in vivo*. É possível que lesões em franco processo de cicatrização pudessem apresentar maior acúmulo de células FasL<sup>+</sup>. Corroborando esta hipótese, não foi observada diferença no percentual de células em proliferação de acordo com o tempo de evolução, que associado à positividade de CD62E sugerem que a atividade na lesão continuava intensa mesmo nas lesões com maior tempo de evolução.

Neste estudo, foram ainda avaliadas as características histopatológicas e respostas imunológicas celulares sistêmica e local de 18 pacientes com cicatrizes de LTA, e as respectivas lesões em atividade.

Foi observada a manutenção da intensidade de resposta celular *in vitro* mesmo após 3 anos de cura clínica. Da-Cruz et al. (2002) sugeriram que esta resposta poderia ser relevante para imunoproteção contra reinfecção, e poderia ser utilizada como parâmetro para determinação de prognóstico. Também verificamos uma predominância de células CD8<sup>+</sup> entre aquelas recuperadas após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* sp nos pacientes com 3 anos de cura clínica quando comparadas às respostas do mesmo grupo durante a fase de doença ativa.

Ao compararmos lesões e cicatrizes de cada paciente, observamos a redução significativa de intensidade de infiltrado inflamatório nos tecidos cicatrizados. Constatou-se a manutenção de um infiltrado inflamatório nas cicatrizes, porém delimitado e reduzido a grupos de células. Não foi possível associar os achados histopatológicos das cicatrizes com a idade de cura clínica, não havendo diferença de



intensidade de infiltrado entre cicatrizes recentes e tardias, mas uma tendência de redução naquelas mais antigas. Mendonça et al. (2004) observaram dado semelhante, além de características histopatológicas similares às cicatrizes no presente estudo.

As cicatrizes de 1 ano apresentavam intensa substituição da reação inflamatória por tecido cicatricial. No entanto, em alguns locais ainda era possível a verificação de aglomerados de células. A concentração das populações de células presentes nestes locais se manteve semelhante às observadas em lesões em atividade, apesar da redução marcante de intensidade de infiltrado inflamatório por área de tecido. Amato et al. (2003a) estudando lesões mucosas, cicatrizadas após 6 meses do término do tratamento, observaram a manutenção da intensidade de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> assim como antígenos parasitários. Sugeriram, então, que a persistência de antígenos parasitários poderia estar relacionada à manutenção de resposta inflamatória local e ativação continuada destas células.

No presente estudo, somente aos 3 anos de cura clínica, os linfócitos T e suas subpopulações tiveram suas concentrações reduzidas significativamente. A exceção foi a intensidade de macrófagos, que se manteve em patamar semelhante às lesões em atividade, apesar da distribuição mais restrita, já que as áreas de fibrose dominavam o tecido.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm papel relevante para o controle da carga parasitária na leishmaniose (Belkaid et al., 2002). No presente estudo, a manutenção do percentual de células CD8<sup>+</sup> em cicatrizes com 1 ano de cura clínica poderia ser consequência da presença de antígenos parasitários ao longo do período de observação. Assim, estas células seriam necessárias aos mecanismos de controle da infecção. Isto se tornaria menos relevante aos 3 anos de cura clínica, quando o equilíbrio parasita-hospedeiro já estaria estabelecido.

A redução da atividade inflamatória, caracterizada por diminuição da expressão de NOS2, E-selectina, células Ki67<sup>+</sup>, BCL-2<sup>+</sup> e Fas<sup>+</sup> foi constatada nas cicatrizes recentes. Nas cicatrizes tardias esta redução foi ainda mais intensa. Apesar disto, a expressão de indutores de apoptose se manteve sugerindo que apesar da cura clínica da lesão, o processo de cicatrização seria, microscopicamente, um fenômeno lento. A possibilidade de reativação durante este período poderia ocorrer em decorrência da exacerbação desta atividade inflamatória remanescente. Amato et al. (2003b) estudando

lesões de pacientes com leishmaniose mucosa antes e após o tratamento observaram a redução significativa de TNF- $\alpha$ , porém evidenciaram a persistência desta citocina *in situ* após a cura das lesões, o que poderia estar relacionado à manutenção de um “background” imunopatológico favorável às reativações muito freqüentes nesta forma da doença.

A intensidade de células de Langerhans em derme, após 1 ano de cura clínica, se manteve em patamar semelhante às lesões em atividade. Gray (2002), em revisão, discute que as células de memória têm vida relativamente curta e necessitam de estimulação antigênica continuada. Os antígenos persistiriam ao longo de muitos meses e, possivelmente, anos pelas células do sistema imune, como, por exemplo, sob a forma de imunocomplexos na superfície de células dendríticas foliculares. A manutenção da intensidade de células de Langerhans nas cicatrizes recentes poderia sugerir ainda a necessidade de movimentação destas células mesmo após 1 ano de cura clínica. Aos 3 anos de cura clínica observou-se a redução significativa da intensidade de células de Langerhans em derme, pois é provável que esta movimentação se torne menos necessária pela ausência de antígenos.

As fases da cicatrização da Leishmaniose Tegumentar Americana parecem se sobrepor. Greenhalgh (1998) discutiu que para a resolução da fase inflamatória, é necessária a eliminação do estímulo antigênico inicial. Uma vez que o parasito possa persistir nas lesões curadas (Ramirez & Guevara, 1997; Schubach et al., 1998a; Schubach et al., 1998b; Bogdan & Rollinghoff, 1999; Gray et al., 2002; Schubach et al., 2001; Spath et al., 2003; Mendonça et al., 2004) a presença do antígeno tornaria este processo desordenado, e disso seria decorrente a observação no presente trabalho de infiltrado inflamatório, mesmo discreto em meio à intensa fibrose cicatricial. Mendonça et al. (2004) concluíram que a cura clínica nem sempre coincide com a cura histológica. O achado de manutenção da atividade inflamatória nas lesões cicatrizadas e a sua redução gradativa com o tempo de cicatrização corroboram esta conclusão.

Evidências sugerem que o parasito seja capaz de disseminar através da circulação sanguínea, podendo ser detectado na circulação periférica mesmo após anos de cura clínica. Lugo-Yarbuh et al. (2003) observaram parasitos e antígenos parasitários na luz de vasos ou adsorvidos ao endotélio das lesões ativas de LTA. Vergel et al. (2006) identificaram parasitos na pele normal e em monócitos de sangue periférico de

pacientes mesmo após o tratamento. Junto com a aquisição da infecção pelos insetos vetores no bordo de lesão, estes dados suportam a possibilidade de transmissão antroponótica na leishmaniose tegumentar americana. Além disso, a pele é considerada parte do sistema imune e é constantemente exposta a agentes potencialmente capazes de gerar resposta imune. A observação das UPDs e linfócitos intraepiteliais trazem evidências da permanente vigilância destas células imunes na pele. Desta forma, não foi possível observar diferenças significativas entre as cicatrizes e suas respectivas peles sadias. Por outro lado, existe a possibilidade de a pele como um todo ser afetada pela doença, e somente o estudo de pele sadia de pacientes não acometidos pela infecção e de áreas não endêmicas poderia elucidar esta questão.

Para outras doenças (toxoplasmose, tuberculose, etc.) já foram determinados alguns dos fatores que controlam o processo inflamatório e estabelecem o equilíbrio parasito-hospedeiro (Murray, 1999; Luder et al., 2001; Luder e Gross, 2005). Nesses casos, onde a persistência parasitária ocorre, a resposta imune torna-se fundamental para o controle da replicação parasitária e no quadro de imunodeficiência, como na coinfeção com HIV poderia haver a reativação da doença (Kubar et al., 1998; Czechowicz et al., 1999). Já foi determinado que a evolução da leishmaniose cutânea depende do balanço de resposta TH1/TH2, onde uma resposta do tipo 1 predominante levaria à resistência e cura, enquanto uma resposta predominantemente do tipo 2 levaria à suscetibilidade e doença progressiva (Uzonna e Bretscher, 2001; outros). A reativação de pacientes com leishmaniose tegumentar americana tem sido relatada (Oliveira-Neto et al., 1998; Calvopina et al., 2004) e o estudo imunológico destas lesões recidivantes poderia contribuir para o entendimento das possíveis alterações que estariam ocorrendo no sítio de lesão destes pacientes, assim como demonstrado no modelo murino de infecção experimental (Stenger et al., 1996; Mendez et al., 2004).

## CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados aqui apresentados demonstram que:

1- nas lesões cutâneas de LTA o processo inflamatório é intenso e pode se estender por vários meses com características de atividade semelhantes;

2- a expressão de NOS2 está diretamente relacionada à intensidade de células TCD3<sup>+</sup> e não de macrófagos, e a associação entre a alta expressão desta enzima e a baixa quantidade de parasitos sugere a importância da NOS2 na eliminação das formas amastigotas no sítio de lesão;

3- neutrófilos podem participar do processo inflamatório mesmo em fases mais tardias da infecção;

4- o aumento relativo de células CD4<sup>+</sup> associado ao início dos processos de fibrose pode indicar uma participação destas no controle do processo inflamatório;

5- com o passar do tempo, o infiltrado inflamatório vai se tornando focal permitindo a cicatrização, de início pontual;

6- a dinâmica do processo inflamatório nas formas cutâneas da LTA mantém um padrão de distribuição celular ao longo do período de atividade que se modifica lentamente mesmo após a aparente cicatrização das lesões;

7- a presença de locais de concentração de células envolvidas na resposta imune nas cicatrizes de 3 anos mostrou uma redução acentuada de marcadores de atividade como NOS2, Ki67 e BCl-2 sugerindo que após este tempo o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro *in situ* começa a ser estabelecido;

8- se o estabelecimento do equilíbrio parasito-hospedeiro ocorre de forma gradativa, mesmo após a evidenciação de cura clínica da lesão ativa, existiria a possibilidade de

quebra deste equilíbrio nos momentos de imunossupressão, conseqüentemente levando a reativação da doença. Estudos focados em lesões recidivantes ajudariam a elucidar esta questão.

9 - a observação de aumento de blastos CD8<sup>+</sup> reativos ao Lb-Ag no sangue periférico, em contraste com a redução deste tipo celular no foco de lesão após a cura clínica, mostra a importância da “compartimentalização” da resposta imune e sugere que exista uma dinâmica diferenciada nestes dois locais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Revinter, 4ª edição, 2003.

Ahmed AA, Nordlind K, Schultzberg M, Lidén S. Interleukin-1 alpha-and beta-, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. *Acta Dermatol Venerol*. 1994; 74: 435-440.

Amato VS, Andrade Jr HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Tropica*. 2003a; 85: 39-49.

Amato VS, Andrade HF, Amato Neto V, Duarte MI. Short report: persistence of tumor necrosis factor-alpha in situ after lesion healing in mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68(5):527-8.

Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, Ribeiro de Jesus A, Grimaldi GJr, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am. J Trop Med Hyg*. 1992; 47: 587-92.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 256-9.

Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(6):401-9.

Belkaid Y, Stebut EV, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8<sup>+</sup> T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002; 168: 3992-4000.

Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. J Med Biol Res. 2000; 33: 317-325.

Bittencourt AL e Barral-Neto M. Leishmaniasis. In: Doer W, Sifert G, Vehlinger E. Trop. Pathol. 2. ed. Germany: Springer-Verlag, 1995. v. 8, cap. 14, p. 597-644.

Bogdan C & Rollinghoff M. How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages?. Parasitol Today. 1999; 15(1): 22-28.

Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. J Exp Med. 2001; 191(12): 2121-2129.

Bos JD & Kapsemberg ML. The skin immune system: Progress in cutaneous biology. Immunol Today. 1993; 14 : 75-78.

Botelho ACC, Tafuri WL, Genaro O, Mayrink W. Histopathology of human leishmaniasis before and after treatment. Ver Soc Bras Med Trop. 1998; 31:11.

Bradonizio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D, Mitolo V. Nitric oxide production by *Leishmania* – infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. Parassitologia 2001; 43(1): 1-6.

Brasil. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana / elaborado por Jackson Mauricio Lopes Costa et al. 5ª ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2000; 62 p.

Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Cavalho E, Barral-Neto M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophage from mucosal leishmaniasis. J Immunol. 1997; 159: 4467-4473.

Calvopina M, Uezato H, Gómez EA, Korenaga M, Nonaka S, Hashiguchi Y. Leishmaniasis recidiva cútis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int J Dermatol.* 2004; 45: 116-120.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 1985; 135: 4144-48.

Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous Leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1983; 27: 176-86.

Castes M, Agnelli A, Rondon AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous Leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1984; 57: 279-86.

Christoph T, Müller-Röver S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Rückert R, Paus R. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol.* 2000; 142: 862-873.

Conceição-Silva F, Dorea RCC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1990; 79:221.

Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for especific major histocompatibility complex class I in restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 2813-2817.

Conceição-Silva F, Hahne M, Schöter M, Louis JÁ, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95), pathway of citotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28 : 237-245.



Czechowicz RT, Millard TP, Smith HR, Ashton RE, Lucas SB, Hay RJ. Reactivation of cutaneous leishmaniasis after surgery. *Brit J Dermatol.* 1999; 141: 1113-1116.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*- Reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62(6): 2614-2618.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro P, Azeredo-Coutinho B, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diag Lab Immunol.* 2002; 9(2): 251-256.

De Souza-Leão S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.* 1995; 108(Pt 10): 3219-31.

Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp Dermatol.* 2002; 11: 34-41.

Díaz NL, Arveláez FA, Zerpa O, Tapia FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(1):114-7.

Dien-Nosjan MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schimitt D, Zlotnik A, Caux C. Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting langerhans cell precursors. *J Exp Med.* 2000; 192(5): 705-717.

van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol.* 2004; 57(7):675-81.

Elhassan AM, Gaafar A, Theander TG. Antigen-presenting cells in human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. Clin Exp Immunol. 1994; 99: 445-453.

Esterre P, Dedet JP, Frenay C, Chevallier M, Grimaud JÁ. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, iohistochemical and ultrastructural study. Virchows Archiv A Pathol Anat. 1992; 421: 239-247.

Facchetti F, Vermi W, Fiorentini S, Chilosi M, Caruso A, Duse M, Notarangelo LD, Badolato R. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. Am J Pathol. 1999;154(1):145-52.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. J Clin Invest. 1998; 101: 890-898.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005; 37(11):719-27.

Fujiwara N & Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005; 4(3): 281-6.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Guimarães LH, de Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. Scand J Immunol. 2006; 63: 70-78.

Gesztesí JL, Amorim-Dias MA, RicodSouza A, Almeida SR, Lopes JD, Mariano M. Subcutaneous infection of mice with *Paracoccidioides brasiliensis* induces a peculiar pattern inflammatory and immune response. Mycopathol. 1999; 145: 14.

Gray D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nature reviews immunol.* 2002; 2: 61-65.

Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 1019-1030.

Grimaldi G, Tesh RB, Mcm-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41: 687-725.

Guan D, Ohshima T, Kondo T. Immunohistochemical study on Fas and Fas Ligand in skin wound healing. *The Histochem Journal.* 2000; 32: 85-91.

Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am.* 2003; 83(3): 483-507.

Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 2000; 13(2): 6-11.

Isaza DM, Restrepo M, Restrepo R, Caceres-Dittmar G, Tapia FJ. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (4): 365-369.

Isaza DM, Restrepo M, Restrepo R, Caceres-Dittmar G, Tapia FJ. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (4): 365-369.

Kanan MW, Ryan TJ. Endonasal localization of blood borne viable and non viable particulate matter. *British J Dermatol.* 1975; 92: 663-73.

Kaplan I, Anavi Y, Manor R, Sulkes J, Calderon S. The use of molecular markers as an aid in the diagnosis of glandular odontogenic cyst. *Oral Oncol.* 2005; 41(9):895-902.

Katou F, Ohtani H, Saaristo A, Nagura H, Motegi K. Immunological activation of dermal Langerhans cells in contact with lymphocytes in a model of human inflamed skin. *Am J Pathol.* 2000;156(2):519-27

Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin. Inf. Dis.* 1999; 29: 231-23

Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, Sal P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *J Cutan Pathol.* 1999; 26: 130-136.

Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DNJ. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113: 438.

Koch S, Kohl K, Klein E, Bubnoff Dv, Bieber T. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 163-8

Kubar J, Marty P, Lelievre A, Quaranta J, Staccini P, Caroli-Bosc C, Fichoux YL. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte counts. *AIDS* 1998; 12: 2147-2153.

Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(3):211-22.

Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. *Rev Inst Med Trop S. Paulo.* 1998; 40: 125.

Lang T, Hellio R, Kaye PM, Antoine JC. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci.* 1994; 107(Pt8): 2137-50.

Lessin SR, Benoit BM, Li G, Moskovits AJ, Zweiman B. Quantitative Analysis of T cell receptor beta variable-gene usage in cutaneous late-phase reactions: implications for T lymphocyte recruitment in cutaneous inflammation. *Clin Diag Lab Immunol.* 1999; 6: 85-88.

Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF- $\beta$  treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol.* 1999; 162: 974-979.

Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* Characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50 (6): 743-747.

Lima GMAC, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EMAF, Kiffer MMF, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunol Let.* 1998; 64: 145-151.

Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rver.* 1996; 9 : 532.

Luder CGK, Gross U, Lopes MF. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends parasitol.* 2001; 17(10): 480-486.

Luder CG, Gross U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005; 289: 219-37.

Lugo-Yarbuh A, Valera M, Alarcón M, Moreno E, Premoli-Percoco G, Colasante C. [Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in vascular endothelium lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis]. *Invest Clin*. 2003; 44(1):61-76.

Lunger THA, Schwarz TH. Skin immune system (SIS). Bos JD – Editor, CRC press. 1990; pp. 257-291.

Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol*. 2002; 12(5): 449-51.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80: 859-76.

Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. *JEM*. 2004; 200(2): 201-210.

Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? *J Infect Dis*. 2004; 189: 1018-23.

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 1997;100(9):2146-52

Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Ueymura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma-delta T cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature*. 1989; 339 : 544.

Moll H, Flohé S, Röllinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 693-699.

Murphy JW, Wu-Hsieh BA, Singer-Vermes LM, Ferrante A, Moser S, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG, Kowanko IC, Rathjen DA, Martin AJ, Bucy RP, Chen Q. Cytokines in the host response to mycotic agents. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32 (suppl 1) 203.

Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol.* 1999; 7(9): 366-72.

Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH, Nilsen R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand J Immunol.* 2001; 54(6):630-9.

Mustafa T, Mogga SJ, Mfinanga SG, Mørkve O, Sviland L. Significance of Fas and Fas ligand in tuberculous lymphadenitis. *Immunology.* 2005; 114(2):255-62.

Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1998; 160(11):5448-54.

Oishn M, Maeda K, Suguyama S. Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous carcinoma cell. *Arch Dermatol Res.* 1996; 286: 396.

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CSF, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 1998; 37(11): 846-849.

Ormerod AD, Copeland P, Hay I, Husain A, Ewen SW. The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin. *J Invest Dermatol.* 1999;113(3):392-7

Orteu CH, Poulter LW, Rustin MHA, Sabin CA, Salmon M, Akbar NA. The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. *J Immunol.* 1998; 161: 1619-1629.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol.* 2004; 15(9):1319-29.

Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in american cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol.* 1990; 145 : 3100-3104.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1390.

Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Khouri M, Barral-Netto M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop.* 1991; 48(3):185-93.

Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2002; 70(8):4638-42.

Ramirez JL & Guevara P. Persistent Infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92(3): 333-338.

Rey L. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Editora Guanabara Koogan SA: 2ª edição. 1991.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. Macrophage



interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2004; 172(7):4454-62.

Santamaria-Babí LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol.* 2004; 14(1):13-8.

Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol.* 1992; 168(2):161-2.

Schubach A, Marzochi MCA, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira ALC, Pacheco RS, Momen H, Conceição-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antomonal therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg.* 1998a ; 58 (6): 824-827.

Schubach A, Haddad F, Neto MPO, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi Jr G, Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patiens. *J Infec Dis.* 1998b; 178: 911-4.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJS, Haddad F, Perez MA, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, Marzochi MCA, Marzochi KBF, Costa SCG. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(7): 987-996.

Späth GF, Lye LF, Segawa H, Sacks DL, Turco SJ, Beverley SM. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science.* 2003; 301(5637):1241-3.

Stenger S, Donhauser N, Thüring H, Röllinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1996; 183: 1501-1514.

Stevens DA, Domer JE, Ashman RB, Blackstock R, Brummer E. Immunomodulation in mycosis. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32 (1) : 253.

Streelein JW. Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin. *Lancet.* 1978; 337: 211-214.

Streelein JW. Skin-associated lymphoid tissue (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol.* 1983; 80: 125-165.

Streelein JW. Skin immune system (SIS). Bos JD – Editor, CRC press. pp: 25-48. 1990.

Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA. 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.* 2000; 165(5):2628-36.

Taskapan MO & Kumar P. Role of staphylococcal superantigens in atopic dermatitis: from colonization to inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 84(1): 3-10.

Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T. In vivo evidence for close association of CLA expression and E-selectin binding by T cells in the inflamed skin. *J Dermatol Sci.* 2004; 36(1):63-5.

Uzzona JE, Bretscher PA. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 3175-3184.

Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M, Walker J, Travi BL, Saravia NG. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis.* 2006; 194(4):503-11.

Venuprasad K, Chattopadhyay S, Saha B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Hum Immunol.* 2003; 64(1):38-43.

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.* 2004; 173(11):6521-5.

Zenewicz LA, Skinner JA, Goldfine H, Shen H. *Listeria monocytogenes* virulence proteins induce surface expression of Fas ligand on T lymphocytes. *Mol Microbiol.* 2004; 51(5):1483-92.

Zeppone-Carlos I, Sgarbi DBG, Placeres MCP. Host organism defense by a peptidepolysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathol.* 1999; 144 :9.

## ANEXOS

### 1. Termo de consentimento livre e esclarecido – lesões ativas

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO LEISHMANIOSE**

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

**Título do Projeto:** “:” Influência da resposta imune *in situ* na evolução de doenças infecto-parasitárias caracterizadas pela presença de reação granulomatosa crônica. Haverá correlação entre a evolução das lesões de esporotricose, leishmaniose, tuberculose, hanseníase e paracoccidiodomicose e o fenômeno inflamatório localizado” (protocolo 014/ 2001)

**coordenador:** Fátima da Conceição Silva MD, PhD

Nome do Voluntário:

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

Pelo responsável fui informado de que:

- 1- Este documento procura fornecer informações sobre a Leishmaniose e o que será realizado, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. Poderei recusar-me a participar da pesquisa ou, mesmo, dela me afastar em qualquer tempo, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento, e que o acompanhamento clínico, o tratamento e o controle de cura em nada serão

modificados pela minha desistência. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos.

- 2- Os investigadores se obrigam a não revelar minha identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como, poderão interromper minha participação, a qualquer tempo, por razões técnico/ médicas quando, então, me serão fornecidos aconselhamentos e orientação.
- 3- Antes de assinar este Termo, devo me informar plenamente sobre o mesmo, não hesitando em fazer perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

A- O problema de saúde objeto da investigação:

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

B- Objetivo da investigação:

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

C- Exames, procedimentos e tratamento que serão utilizados:

Nesta investigação está previsto o estudo da resposta imunológica dos voluntários provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose. Os voluntários farão um teste na pele (injeção de 0,1 ml), chamado teste de Montenegro, para auxiliar no diagnóstico da doença. Será coletado sangue da veia (20 ml) antes e após o tratamento com antimonial. Este sangue servirá para fazer alguns exames de esclarecimento diagnóstico e também para a pesquisa. Além disso, será retirado um fragmento de biópsia de lesão que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasito, e para o estudo científico. Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para confirmar que estou com Leishmaniose. Em alguns casos, e mediante meu consentimento formal para este procedimento, poderá ser coletada uma segunda biópsia, guardando os cuidados necessários e mediante aviso e esclarecimento prévio.

D- Benefícios:

O estudo da resposta imune em pacientes com leishmaniose tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores imunológicos na evolução da doença. No

entanto, mais estudos são necessários para que possamos tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção da Leishmaniose. Estes conhecimentos poderão fornecer importantes contribuições para se prever a evolução desta enfermidade nos indivíduos doentes e, para que possamos estabelecer uma futura vacina para a leishmaniose.

E- Inconvenientes:

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

F- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:

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

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

local e data: \_\_\_\_\_

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

assinatura: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha:

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do investigador /

médico responsável: \_\_\_\_\_

assinatura: \_\_\_\_\_

## 2. Termo de consentimento livre e esclarecido – cicatriz

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido<sup>1</sup>**

**INSTITUIÇÃO:** INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS (IPEC) – FIOCRUZ

**COORDENADOR DA PESQUISA:** ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

**ENDEREÇO:** AV. BRASIL 4365 - MANGUINHOS - RIO DE JANEIRO - RJ - CEP 21045-900

**TELEFONES:** (0xx21) 2598-4260 / 2598-4263 / 2598-4266 FAX (0xx21) 2590-9988

**NOME DO PROJETO DE PESQUISA:** AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO LESÕES ATIVAS E CICATRIZADAS

**NOME DO VOLUNTÁRIO:** \_\_\_\_\_

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por parasitos chamados leishmanias e que acomete seres humanos e animais. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, micoses, tuberculose, sífilis, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e, depois de curadas, pode não ser possível diferenciar as cicatrizes através dos exames [utilizados de rotina atualmente](#).

---

<sup>1</sup> 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Paciente

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: quais pacientes irão permanecer curados após o tratamento e quais irão reabrir suas cicatrizes ou desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? outras doenças têm sido confundidas e tratadas como LTA? qual o papel dos seres humanos doentes ou aparentemente curados na transmissão da doença?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC, com o objetivo de avaliar o estado clínico e os exames de laboratório de indivíduos com LTA, em diferentes períodos de evolução, assim como o aspecto microscópico e a presença de leishmanias no sangue e nas lesões de pele ativas ou cicatrizadas comparando-as com amostras de pele sadia e com outras doenças.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte do IPEC. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para avaliar a evolução da sua doença e que este material seja utilizado neste estudo. Também será necessária a sua autorização para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo e para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.



Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você vier apresentar referentes ao estudo, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para o Dr. Armando de Oliveira Schubach ou Dra. Mariza Salgueiro nos telefones acima. Caso você apresente qualquer problema clínico relacionado ao estudo e que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

#### **Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:**

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia

local, de um pequeno fragmento de pele doente (lesão ativa ou cicatrizada) ou de pele sadia, para realização de exames para identificar células e outros componentes do organismo, assim como a possível presença de leishmanias.

Quando indicados, outros exames poderão ser realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de ser confundidas com a LTA e para avaliar a resposta do organismo contra as leishmanias: um teste cutâneo (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para LTA na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista cerca de 2 dias após a injeção); e exames de sangue (quantidade equivalente a 2 colheres de sopa).

#### **Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:**

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, o teste na pele poderá, apresentar uma reação forte com inflamação do local, mais raramente, formação de bolhas e de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto o teste na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

Eventualmente, no local da biópsia, poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. [Mais raramente a cicatriz poderá reabrir](#). Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos [ou de repetir o tratamento para LTA](#).

#### **Formas de ressarcimento:**

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço Social do IPEC para pacientes externos.

#### **Benefícios esperados:**

Espera-se que os exames realizados indiquem que, neste momento, você esteja curado ou necessite de nova investigação ou tratamento. Entretanto, as consultas de retorno regulares por vários anos após o tratamento são indicadas para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

---

Nome paciente:	Data
----------------	------

---

Nome médico:	Data
--------------	------

---

Nome testemunha <sup>2</sup> :	Data
--------------------------------	------

---

Nome testemunha <sup>2</sup> :	Data
--------------------------------	------

---

<sup>2</sup> Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

### 3. Termo de compromisso e responsabilidade

#### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA, coordenadora e FERNANDA NAZARÉ MORGADO, aluna do projeto de pesquisa intitulado “ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR IN SITU E IN VITRO DE PACIENTES COM LESÃO ATIVA OU CICATRIZ DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.”, comprometo manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

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

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

Rio de Janeiro, 15/04/2005.

---

Fátima Conceição Silva

---

Fernanda Nazaré Morgado

## 4. Carta de aprovação CEP-IPEC/FIOCRUZ.



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo 0047.0.011.009-06

1. Identificação:

**Título do Projeto:** "Análise da resposta imune celular *in situ* e *in vitro* de pacientes com lesão ativa ou cicatriz de Leishmaniose Tegumentar Americana".

**Pesquisador Responsável:** Fátima Conceição-Silva (IOC).

**Instituição Responsável:** Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ.

**Data de Apresentação ao CEP:** 11/07/2006.

2. Sumário:

Este estudo tem como objetivos: a) verificar a correlação lesão ativa / cicatriz em um mesmo paciente, correlacionando os achados com tipo de evolução, resposta à terapêutica e tempo de cicatrização; b) avaliar a resposta imunológica sistêmica após tempos determinados de cicatrização, utilizando o ensaio de linfoproliferação, e realizar a caracterização fenotípica das células respondedoras pela análise em citômetro de fluxo. A casuística será composta de pacientes com lesão ativa ou curados; serão formados 4 grupos, com 10 a 15 pacientes, a saber: lesão cutânea ativa recente (evolução < 3 meses), lesão cutânea ativa tardia (maior que 4 meses de evolução), cicatriz recente ( $\pm 1$  ano de cura clínica), cicatriz tardia (maior que 3 anos). Sempre que possível será feito o estudo longitudinal do mesmo paciente. O número de casos (n) a ser incluído em cada grupo foi determinado de forma conveniente, e é comumente utilizado em projetos com esta característica, devido à natureza dos espécimes clínicos, cuja aquisição é dificultada. Será desenvolvido numa colaboração entre o Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ e o Ambulatório de Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC/FIOCRUZ.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. O projeto conta com suporte financeiro do IOC/FIOCRUZ (parte experimental), IPEC/FIOCRUZ (atendimento ambulatorial e rotina diagnóstica) e CNPq - MS.

4. Diligências:

Não houve.

5. Parecer: **APROVADO**. Este projeto envolve normas do projeto 0016.0.009-02, coordenado pelo Dr. Armando Schubach, aprovado neste Comitê em 04/11/2002 e, também, proposto e aprovado no projeto 014/2002, coordenado pela Dra. Fátima da Conceição Silva, neste CEP em 27/08/2001.

Data: 21 de julho de 2006.

Assinatura do Coordenador:

*Léa Camillo-Coura*  
 Dr.<sup>a</sup> Léa Camillo-Coura  
 Coordenadora do Comitê  
 de Ética em Pesquisa  
 IPEC/FIOCRUZ