

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

KÁRIS MARIA DE PINHO RODRIGUES

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE SINALIZAÇÃO NOTCH E DAS CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS IL-17 E IL-18 NA RESPOSTA AO TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biologia Parasitária**

Orientadora: Dra. Claude Pirmez

Rio de Janeiro
2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R696

Rodrigues, Káris Maria de Pinho.

A influência do sistema de sinalização Notch e das citocinas inflamatórias IL-17 e IL-18 na resposta ao tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. / Káris Maria de Pinho Rodrigues. – Rio de Janeiro, 2011.

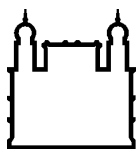
xiii, 76 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.

Bibliografia: f. 50-60

1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Sistema Notch. 3. IL-17. 4. IL-18. 5. Tratamento. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

KÁRIS MARIA DE PINHO RODRIGUES

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE SINALIZAÇÃO NOTCH E DAS CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS IL-17 E IL-18 NA RESPOSTA AO TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

ORIENTADORA: Dra. Claude Pirmez

Aprovada em 16 de Março de 2011.

EXAMINADORES:

Dra. Fátima Conceição-Silva – IOC/Fiocruz – Presidente da Banca examinadora

Maria Cristina Vidal Pessolani – IOC/Fiocruz

Luís Carlos Crocco Afonso – NUPEB/UFOP

Rio de Janeiro, 23 de Março de 2011

*Ao meu pai,
que se foi durante a realização desse trabalho e com
quem eu gostaria de ter conseguido trocar mais.*

Agradecimentos

. À Dra. Márcia Oliveira, minha querida amiga, são muitos agradecimentos, foi ela quem me abriu as portas do laboratório, sugeriu o tema a ser estudado e me apresentou minha orientadora, confiou na minha capacidade e, mais importante que tudo, foi minha maior parceira nessa jornada.

. À minha orientadora, Dra. Claude Pirmez, a quem admiro profundamente por sua capacidade profissional, sua trajetória e pela pessoa que é, agradeço pela contribuição preciosa ao meu trabalho e pela generosidade e disponibilidade em todos os momentos cruciais nos quais precisei de sua ajuda.

. A todos no laboratório, minha enorme gratidão. Mas preciso destacar algumas pessoas que tiveram participação especial: Rosimar Batista com sua paciência e disponibilidade para todas as horas, Rejane Oliveira que me acompanhou nas primeiras disciplinas e compartilhou comigo os primeiros experimentos, Ana Claudia Maretti-Mira, pessoa admirável, que foi essencial em tantos momentos e a Dra. Luiza Pereira que chegou já no final, mas contribuiu enormemente com seus questionamentos, análise crítica e carinho.

. À Dra Marise Mattos pela sua disponibilidade em discutir o trabalho e fornecer as informações sobre os pacientes.

. Ao Dr Manoel Paes Oliveira-Neto, por sua enorme contribuição no conhecimento sobre a leishmaniose e aos pacientes por ele atendidos, que tão generosamente contribuíram para ampliar o conhecimento sobre a doença que os afligiu.

. Ao Dr Leonardo Silva que não poupou esforços para o envio das amostras das lesões mucosas e que esteve sempre disponível todas as vezes em que precisei.

. À Dra Maria Angélica B. Cardoso pela orientação na plataforma de PCR em tempo real.

. À Dra Regina B. Moreira pelo apoio, permitindo que eu me licenciasse de minhas atividades como médica do HUCFF, sem o que a execução desse trabalho teria sido impossível.

. A todas as pessoas de outros laboratórios do pavilhão Leônidas Deane, que sempre me abriram as portas seja para dar uma orientação ou permitir o uso de algum equipamento.

. Ao Rodrigo Mexas e Heloísa Maria Diniz do laboratório de imagem da Fiocruz, pelo alto padrão do seu trabalho e pela contribuição imprescindível tanto na confecção das figuras do trabalho como da tese.

. A todos na pós-graduação em Biologia Parasitária, primeiramente pela oportunidade de aperfeiçoamento, mas também pela total disponibilidade em resolver qualquer dificuldade e prestar os esclarecimentos necessários.

. Finalmente ao meu companheiro, Mauro, que compreendeu minhas ausências, angústias e ansiedades, e me deu apoio incondicional.

*“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas
serem o que são”*

Aristóteles

*“A ciência pode classificar e nomear os órgãos de um
sabiá
mas não pode medir seus encantos.
A ciência não pode calcular quantos cavalos de força
existem
nos encantos de um sabiá.*

Quem acumula muita informação perde o condão de adivinhar: divinare.

Os sabiás divinam.”

Manoel de Barros

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1.1 – Receptores Notch e seus ligantes	08
Figura 1.2 – Modelo para os principais eventos da via de sinalização Notch	09
Figura 1.3 – O sistema Notch nas células do sangue periférico	10
Tabela 3.1 – Características clínicas e evolutivas dos pacientes estudados	14
Tabela 3.2 – Relação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica	16
Tabela 3.3 – Sequências dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real	21
Figura 4.1 – Imunohistoquímica de lesões cutâneas de LTA comparando a expressão de Notch 1 e DLL4 entre lesão de LTA e pele normal	24
Figura 4.2 – Gráficos comparando a expressão de Notch 1 e DLL1 em lesões de LTA com relação à resposta ao tratamento	25
Figura 4.3 – Gráfico comparando a expressão de Notch3 em lesões cutâneas e mucosas ..	25
Figura 4.4 – Gráfico comparando a expressão de DLL1 e DLL4 em lesões cutâneas e mucosas	25
Figura 4.5 – Imunohistoquímica evidenciando a marcação difusa do ligante Jagged1 na pele de uma lesão cutânea de LTA	26
Figura 4.6 – Gráfico comparando a expressão gênica de Notch1 em lesões cutâneas com relação à resposta ao tratamento	27
Figura 4.7 – Imunohistoquímica de lesões cutâneas de LTA comparando a expressão de IL-17 de acordo com a resposta ao tratamento	29
Figura 4.8 – Imunohistoquímica de lesões cutâneas de LTA comparando a expressão de IL-18 de acordo com a resposta ao tratamento	30
Figura 4.9 – Imunohistoquímica de lesões de LTA comparando a expressão de TGF- β em lesões cutâneas e mucosas	31
Figura 4.10 – Gráfico comparando a produção de IL-17 e TGF- β em PBMC de pacientes com LTA submetido à estímulo com antígeno de <i>Leishmania</i> sp em relação ao controle	32
Figura 4.11 – Gráfico comparando a produção de TGF- β em PBMC de pacientes com LTA submetido à estímulo com antígeno de <i>Leishmania</i> sp de acordo com a resposta ao tratamento e apresentação clínica	33
Figura 4.12 – Gráfico comparando a expressão gênica de IL-17 e IFN- γ em PBMC de pacientes com LTA submetido à estímulo com antígeno de <i>Leishmania</i> sp em relação ao controle	34

Figura 4.13 – Gráfico comparando a expressão de IL-4 em PBMC de pacientes com lesões cutâneas de mucosas de LTA	34
Figura 4.14 – Gráfico comparando a expressão gênica de DLL4 em PBMC de pacientes com LTA submetido à estímulo com antígeno de <i>Leishmania</i> sp em relação ao controle	35
Figura 4.15 – Gráfico comparando a expressão gênica de Notch3 em PBMC de pacientes com lesões mucosas de LTA submetido à estímulo com antígeno de <i>Leishmania</i> sp em relação ao controle	35
Figura 4.16 – Gráfico comparando a expressão gênica de Tbet em PBMC de pacientes com lesões cutâneas de acordo com a resposta ao tratamento	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANK – Anquirina

APC – Célula apresentadora de antígeno (“antigen presenting cell”)

cDNA – DNA complementar ao RNA

CR – Domínio rico em cisteína

CSL – Fator de transcrição que regula a transcrição dos genes alvos do receptor Notch (“CBF1/RBP-J/Suppressor of Hairless/LAG-1”)

CT – Valor no qual a fluorescência da amostra é detectada acima do nível de ruído de fundo da reação (“cycle threshold”)

DMSO – Dimetil sulfoxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DSL – Domínio amino-terminal dos ligantes do sistema Notch

DTT- Dithiothreitol

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (“Ethylenediamine tetraacetic acid”)

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ELISA – Ensaio imunoenzimático (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)

FoxP3 – Marcador molecular de células T regulatórias (“forkhead box P3”)

GATA3 – Fator de transcrição específico de células T

HCL – Ácido clorídrico

IDMR – Intradermoreação de Montenegro

IFN- γ - Interferon-gama

IL-1 – Interleucina 1

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

IL-18 – Interleucina 18

IL-23 – Interleucina 23

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

LC ou LCL – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LIN – Domínios ricos em cisteína que previnem ativação do receptor Notch independente da ação dos ligantes

LM ou ML – Leishmaniose mucosa
LPS – Lipopolissacarídeos
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
MS – Ministério da Saúde
NICD ou ICN – Fragmento intracelular do receptor Notch (“Notch intra-celular domain”,
intra-celular Notch)
NKT – Linfócitos “natural killer”
NNN – Meio de cultura para *Leishmania* sp (Novi-MacNeal-Nicolle)
Ns – Célula não estimulada
Oligo-dT – Fita de 20 resíduos de ácido deoxitimídico
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (“Peripheral blood mononuclear cell”)
PBS – Tampão fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)
PEST – Sequência rica em prolina, glutamato, serina e treonina dos receptores Notch
RNA – Ácido ribonucléico
RPMI – Meio de cultura para células (Roswell Park Memorial Institute)
RT – Transcriptase reversa
St – Célula estimulada
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TAD – Domínio de transativação do receptor Notch
TBE – Tampão Tris-borato-EDTA
Tbet – Fator de transcrição T “box” expresso em células T
TBS – Tampão de Tris
TCR - Receptores de células T (“T cell receptors”)
TE – Tampão com Tris + EDTA
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
Th1 – T helper 1 (T auxiliador tipo 1)
Th2 – T helper 2 (T auxiliador tipo 2)
Th17 – T helper 17 (T auxiliador tipo 17)
TNF- α – Fator de necrose tumoral
Treg – T regulatório

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. METODOLOGIA	12
3.1 Casuística	12
3.2 Imunohistoquímica indireta	14
3.3 Análise das imagens	16
3.4 Preparação do antígeno total de <i>L.(V.)braziliensis</i>	17
3.5 Ensaio de proliferação celular	18
3.6 Elisa	18
3.7 Isolamento de RNA total	19
3.8 Síntese do cDNA	19
3.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	19
3.10 Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO 1	61
ANEXO 2	63
ANEXO 3	64
ANEXO 4	68
ANEXO 5	72
CÓPIA DO ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO BJD	77

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença que se caracteriza pela presença de lesões cutâneas (LCL) e, em um número pequeno de pacientes, pelo desenvolvimento de lesão mucosa (ML). A evolução clínica e a resposta ao tratamento dependem de múltiplos fatores, incluindo o equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2, influenciando no controle parasitário e na extensão da lesão. Nesse equilíbrio complexo é possível que outras citocinas inflamatórias como IL-17 e IL-18, bem como fatores que influenciem na diferenciação de queratinócitos e nos processos inflamatórios da pele, como o sistema Notch, também possam se relacionar ao prognóstico das lesões. IL-18 é uma potente citocina indutora de IFN- γ , já tendo sido observado efeito protetor em doenças por protozoários. IL-17 é produzida por uma linhagem de células T descritas mais recentemente, que são consideradas essenciais em processos inflamatórios de vários tecidos e em doenças auto-imunes. O sistema de sinalização Notch é composto por um grupo de proteínas transmembrana que regulam processos decisórios em diversos tecidos, tanto no período embrionário como na vida adulta, incluindo a diferenciação de queratinócitos e de linfócitos T, na dependência do ligante envolvido em sua ativação (Delta-like – DLL1/DLL4 ou Jagged 1 e 2). Estudamos a expressão das proteínas do sistema Notch e das citocinas IL-17 e IL-18 em lesões e sangue de pacientes com LTA causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, comparando os níveis de expressão de acordo com o tempo de evolução das lesões, diâmetro da reação de Montenegro e resposta ao tratamento. As lesões cutâneas de LTA apresentam maior expressão de receptores Notch que a pele normal. Particularmente nos indivíduos que evoluíram com má resposta ao tratamento, também observamos maior expressão de DLL1 e das citocinas inflamatórias IL-17 e IL-18, sugerindo que o aumento desses fatores possa estar associado com reação inflamatória mais intensa e retardo na resolução das lesões. Nas lesões mucosas foi observada maior expressão do receptor Notch3 e dos ligantes Delta-like (DLL1 e DLL4). O sistema Notch está associado à homeostase da pele regulando a diferenciação de queratinócitos e a cicatrização. Nas células do sistema imune, quando linfócitos T CD4+ expressando Notch são ativados por células apresentadoras de antígenos expressando ligantes Delta-like, uma resposta Th1 ou Th17 é gerada. Nesse sentido, o papel do sistema Notch nas lesões de LTA pode ser associado tanto à homeostase do tecido cutâneo quanto ao sistema imune ou a ambos, além de poder estar correlacionado ao aumento de IL-17 observado no mesmo grupo de pacientes. A alta expressão de receptores Notch, ligantes Delta-like e das citocinas inflamatórias IL-17 e IL-18 sugere que o aumento desses fatores pode indicar pacientes para os quais esteja indicado um esquema terapêutico mais agressivo, ou pelo menos, um acompanhamento mais rigoroso.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a disease characterized by ulcerated skin lesions (LCL) and, in a small percentage of patients, by the development of mucosal leishmaniasis (ML). Clinical resolution and therapeutic outcome depend on many factors, including the balance between Th1 and Th2 cytokines to control parasite multiplication and the lesion extension. In this complex balance it is possible that other cytokines known by their role in inflammatory processes, such as IL-17 or IL-18, as well as factors controlling keratinocyte differentiation and inflammatory process in the skin, like Notch system, could also be involved in the disease outcome. IL-18 is a potent INF- γ inducer that has been associated with protection in other protozoal diseases. IL-17 is produced by a recently described T-cell subset considered as key-cells for the development of tissue inflammation and autoimmunity. Notch system is a group of transmembrane proteins that regulates cell fate decisions during development and adulthood in many tissues, including keratinocyte differentiation and, in the immune system, are closely related with T-cells lineage commitment, depending on its activation by specific groups of ligands (Delta-like or Jagged). We evaluate whether the expression of IL-17, IL-18 and the Notch system proteins in lesions and blood of patients with ATL, caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, is related to illness duration, Montenegro skin test or therapeutic response. ATL lesions have increased expression of Notch receptors and, particularly in those with poor response to therapy, we have also observed an increased expression of DLL1 and inflammatory cytokines IL-17 and IL-18, suggesting that the rise of these factors could be associated with increased inflammation and with a delay in the lesion resolution. Mucosal lesions demonstrated an increase in the Notch receptor (Notch3) associated with Delta-like ligands (DLL1 e DLL4). The Notch system is engaged in skin homeostasis regulating keratinocyte differentiation and cicatrisation. In the immune system when T CD4⁺ cells expressing Notch receptors are activated by antigen presenting cells expressing Delta-like ligands, a Th1 or Th17 response is generated. Accordingly to that, the role of Notch system in the ATL lesions can be associated with skin homeostasis, with the immune system, or both. The rise in IL-17 observed in the same group can also be correlated. The high expression of Notch receptors, Delta-like ligands and the pro-inflammatory cytokines IL-17 e IL-18 suggests that the rise of these factors could indicate patients possibly requiring a more aggressive therapeutic approach or at least a more thorough and rigorous follow-up.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida através da picada de insetos de diferentes espécies da família Phlebotominae. A doença tem distribuição mundial, sendo descrita na Ásia Central desde o primeiro século DC. Atualmente é encontrada em 88 países do mundo, com 350 milhões de pessoas submetidas ao risco de adquirir a doença. A estimativa da Organização Mundial de Saúde é de que a incidência anual da doença varie entre 1 e 2 milhões de casos novos ao ano com 70.000 óbitos (WHO, 2010).

Existem várias espécies de *Leishmania*, das quais pelo menos 13 estão associadas à doença humana (Grimaldi *et al.*, 1989; Lainson *et al.*, 1994). As espécies de *Leishmania* são divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987) e se apresentam sob duas formas evolutivas: amastigotas e promastigotas. As primeiras localizam-se nos vacúolos parasitóforos de células fagocitárias dos vertebrados, principalmente macrófagos, enquanto as promastigotas são formas flagelares que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor, correspondendo às formas infectantes para o homem (Degraeve *et al.*, 1994; Yurchenko *et al.*, 1999).

A ocorrência de diferentes formas clínicas está ligada a fatores relacionados às espécies e cepas de *Leishmania*, ao tipo e hábitos do vetor envolvido, tamanho do inóculo, bem como a fatores ligados à resposta imune do hospedeiro, que resultam em uma complexa interação parasito-hospedeiro. Na dependência desses fatores, podemos observar manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas ulceradas que se desenvolvem no local da picada do vetor (leishmaniose cutânea), lesões cutâneas nodulares múltiplas (leishmaniose cutânea difusa), lesões mucosas (leishmaniose mucosa e cutâneo-mucosa), culminando com formas de acometimento visceral (leishmaniose visceral ou calazar), responsáveis pela maioria dos óbitos relacionados a leishmaniose (Reithinger *et al.*, 2007). A maioria dos casos se apresenta na forma cutânea que ocorre em mais de 70 países, dentre os quais Afeganistão, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria, que concentram 90% dos casos (Desjeux *et al.*, 2004). Essa forma clínica raramente evolui de forma fatal, o que, associado ao fato de sua ocorrência predominar em países e indivíduos mais pobres, contribui para que a leishmaniose cutânea figure entre o grupo das doenças negligenciadas (Reithinger *et al.*, 2007).

No continente americano a leishmaniose cutânea é considerada autóctone, havendo relatos compatíveis desde a era pré-colombiana (Oliveira-Neto *et al.*, 2000), sendo atualmente endêmica em 24 países situados desde o México até o Norte da Argentina (Lainson, 1983; Grimaldi *et al.*, 1989). As principais formas de apresentação da Leishmaniose Tegumentar

Americana (LTA) são a leishmaniose cutânea (LC ou LCL), leishmaniose mucosa (LM ou ML) e leishmaniose cutânea difusa (LCD).

No Brasil, os parasitas que mais frequentemente produzem lesão tegumentar são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. No entanto, a espécie mais amplamente distribuída é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, encontrada em todas as zonas endêmicas do país (Lainson & Shaw, 1987). Os primeiros casos autóctones do Novo Mundo foram registrados em 1909, em São Paulo (Carini & Paranhos, 1909; Lindenberg, 1909). Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres que acometia, ocasionalmente e de forma acidental, pessoas em contato com florestas, a LTA expandiu-se para zonas rurais praticamente desmatadas e regiões peri-urbanas. Essa ocorrência é associada ao fato de que, após fixar residência, o homem mantém o hábito de frequentar as áreas de floresta adjacentes, bem como à adaptação do vetor ao peridomicílio, facilitando a transmissão da *Leishmania* para animais domésticos que poderiam atuar como reservatórios (Falqueto, 1986; Pirmez *et al.*, 1988). Ocorrem também, a despeito do perfil endêmico, surtos, muitas vezes de proporções limitadas, ou casos esporádicos, quase sempre obedecendo características de sazonalidade (Lainson, 1983; Lainson & Shaw, 1987; Grimaldi *et al.*, 1989).

Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se que, ao longo do tempo, houve, além do aumento do número de casos, a expansão geográfica da doença. No início da década de 80 foram registrados casos em 20 unidades federadas (UF), mas a partir de 2001 a doença passou a ocorrer em todos os estados, concentrando-se principalmente nas regiões Norte e Nordeste, que contribuem com 71% das notificações (40 e 31% respectivamente). As regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul contam com 16%, 10% e 3% respectivamente do total de casos. Os maiores coeficientes de detecção ocorrem na região Norte (99,8/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (41,8/100.000 habitantes) e Nordeste (26,5/100.000 habitantes). Entre os anos 1980 e 2009 foram notificados 693.798 novos casos, com coeficientes de detecção que oscilaram entre 3,8 a 22,9 por 100.000 habitantes ao longo desse período. Até o ano de 1995 é clara a tendência ao crescimento desse coeficiente, chegando ao nível mais elevado já atingido (22,9 por 100.000 habitantes). Desde então ocorre uma pequena e irregular tendência a redução, chegando a 11,4/100.000 habitantes em 2009 (Sinan/SVS/MS 2010).

A LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* caracteriza-se clinicamente pela produção de lesões cutâneas de vários tipos que normalmente se localizam em áreas descobertas e iniciam-se como pápulas eritematosas, podendo associar-se a adenite satélite (Sousa *et al.*, 1995). O

curso pode ser abortivo ou progredir para lesões ulceradas de tamanho variável, com bordos bem delimitados e indolores (Pessoa & Barreto 1948). Mais comumente ocorre uma lesão única que surge no local da picada do inseto vetor após um período de incubação que normalmente varia de um a três meses, mas pode chegar a um ano, cujo exame histopatológico revela alterações na derme, epiderme ou ambas (Ridley *et al.*, 1980; Ridley, 1980). As alterações histopatológicas incluem hiperqueratose, parakeratose, degeneração das células basais, atrofia ou acantose e ocasionais abscessos intraepidérmicos (Grevelink *et al.*, 1996). Algumas vezes se observa nas lesões ulceradas áreas de necrose difusa associada a infecção bacteriana secundária, podendo haver degeneração da camada basal, acompanhada de infiltrado composto predominantemente por linfócitos e macrófagos, frequentemente esboçando ou formando granulomas, em sua maioria de desorganizados (DeMagalhães *et al.*, 1982; DeMagalhães *et al.*, 1986). Em menos de 5% dos casos, há o desenvolvimento de lesão metastática em mucosa oro-nasal que ocorre, na maioria dos casos até 5 anos após a cicatrização (Marsden, 1986; Davies *et al.*, 2000), mas também pode ser concomitante à lesão cutânea (Boaventura *et al.*, 2006). Inicia-se com inflamação e intumescimento da mucosa nasal, seguida de ulceração que costuma progredir em extensão e profundidade, determinando a destruição das cartilagens e dos ossos do nariz, da região palatina ou do maxilar facial. Eventualmente acomete também a faringe e a laringe. Nas formas mais avançadas da doença, há destruição total do nariz, que costuma progredir sobre as áreas vizinhas do maxilar facial, mutilando o semblante do indivíduo (Marsden & Nonata, 1975; Marsden, 1986; Rey, 2001). As lesões mucosas nunca cicatrizam espontaneamente e estão sujeitas a infecções secundárias que podem evoluir de forma fatal (Marsden, 1986).

As úlceras cutâneas tendem à regressão espontânea em alguns meses, o que pode ser abreviado através de terapêutica adequada, fato que também contribui para reduzir os riscos de evolução para a forma mucosa (Reithinger *et al.*, 2007). No local da lesão se forma uma cicatriz estrelar e retrátil (Marsden, 1985; Costa *et al.*, 1987), geralmente atrófica, lisa e brilhante, permanecendo inativa, na maioria das vezes, pelo resto da vida, apesar de apresentarem, à histopatologia, um discreto infiltrado inflamatório residual, de localização predominantemente perivascular (Pirmez *et al.*, 1990). Mais raramente, pode haver uma reativação dessa cicatriz, provavelmente associada à persistência do parasita no tecido cicatricial, gerando uma recidiva da lesão cutânea, ou metástase para a mucosa (Schubach *et al.*, 1998).

O medicamento utilizado para tratamento no Brasil é o antimoníato de meglumina (Glucantime® - Rhodia Farma/Sanofi-aventis), que desde sua introdução persiste como

primeira escolha para tratamento da LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* (Blum & Hatz, 2009). No entanto, essa opção exige acompanhamento criterioso dos doentes, principalmente idosos, gestantes e pacientes com doenças cardíacas e hepáticas subjacentes, em decorrência do risco de ocorrerem efeitos colaterais, que variam de 30% a 71,4% (De Oliveira-Neto *et al.*, 2000) (Blum, 2004), dificultando sua utilização em áreas remotas, onde com frequência a doença ocorre. Com objetivo de diminuir a exposição do paciente a esses efeitos, estudos com baixas doses de Glucantime® (Oliveira-Neto *et al.*, 1997; Oliveira-Neto *et al.*, 2000), bem como aplicação intra-lesional de antimoniais (Oliveira-Neto *et al.*, 1997), realizados no Rio de Janeiro, obtiveram alto índice de cura clínica, que variam de 77,3% a 84% (Oliveira-Neto, 1998). No entanto, o resultado observado não pode ser generalizado, uma vez que a sensibilidade dos parasitas às drogas varia de acordo com a localização geográfica. Particularmente, as cepas de *L.(V.)braziliensis* do Rio de Janeiro têm demonstrado boa sensibilidade a esse medicamento (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007), mas esses dados não necessariamente expressam o perfil de sensibilidade de outras cepas e, principalmente no caso da aplicação intra-lesional, mais estudos são necessários para que seja comprovado que efetivamente não há comprometimento no impacto sobre a progressão para lesão mucosa, demonstrado com as doses usuais (Reithinger *et al.*, 2007; David & Craft, 2009). Outras opções terapêuticas, como anfotericina B ou isotionato de pentamidina, necessitam de estudos que justifiquem seu uso como alternativa aos antimoniais, na medida em que também apresentam efeitos colaterais comparáveis ou mais graves, são complexos na administração e têm custo elevado. Outros medicamentos que poderiam ser promissores, na medida em que simplificariam a terapia por serem administrados por via oral, como a miltefosina, os derivados imidazólicos e a azitromicina, têm demonstrado resultados desanimadores com relação ao tratamento de infecções causadas por *L.(V.) braziliensis* (Blum & Hatz, 2009).

Associado ao impacto da terapêutica específica, a participação dos fenômenos imunológicos contribuindo para resolução, cronicidade ou agravamento das lesões tem sido amplamente estudada. A análise da expressão de citocinas *in situ* por meio de PCR em lesões produzidas por *L.(V.) braziliensis* revelou que, em lesões cutâneas e em fragmentos de tecido obtidos de reação de Montenegro predomina IFN- γ , enquanto nas formas mucosas há uma mistura de citocinas Th1 e Th2 com o predomínio de IL-4, cuja expressão foi irrelevante nas lesões cutâneas (Pirmez *et al.*, 1993; Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993). Os autores sugeriram então que o curso clínico da infecção pela *L.(V.) braziliensis* no hospedeiro humano poderia estar associado com padrões locais específicos de citocinas, onde o predomínio de um padrão de resposta Th1, representado por IFN- γ , levaria à destruição do parasito e consequente resolução da úlcera cutânea. Na mucosa, o aumento exacerbado da resposta tipo 1, associado

a presença de IL-4 impedindo a resolução da lesão, resultaria na típica cronicidade desta forma clínica (Pirmez *et al.*, 1993). Esse padrão de resposta Th2 também foi observado em células periféricas de pacientes com LM (Bacellar *et al.*, 2002).

Além desses dados, estudos demonstraram que lesões cutâneas iniciais causadas pela infecção com a *L. (V.) braziliensis* têm maiores níveis de produção de TGF- β . Provavelmente este fator de crescimento é produzido por macrófagos recentemente infectados e está diretamente relacionado com o estabelecimento da infecção nos estágios iniciais da doença (Barral *et al.*, 1995).

A descoberta de citocinas regulatórias foi seguida pela demonstração de que a produção de IL-10 na fase inicial da infecção, à semelhança do observado para TGF- β , teria um papel importante no estabelecimento das lesões, favorecendo a multiplicação parasitária ao inibir a resposta do tipo 1 (Rocha *et al.*, 1999). Por outro lado, Antonelli *et al.* (2004) demonstraram que células T CD4⁺ específicas para antígeno solúvel de *Leishmania* sp produzem tanto IFN- γ e TNF- α quanto IL-10. Nesse estudo foi observado que a frequência de células antígeno-específicas produtoras de IFN- γ é tanto maior quanto maior for a frequência de células produtoras de TNF- α , sendo ambas importantes para o processo de resolução da lesão, e que a frequência de células produtoras de IFN- γ também se correlaciona positivamente com a frequência de células produtoras de IL-10, sugerindo um papel de regulação intrínseco da resposta do tipo 1. Esse mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a alta frequência de células produtoras de citocinas do tipo 1 (IFN- γ e TNF- α) correlaciona-se com o tamanho das lesões, sugerindo que estas citocinas estão contribuindo para a injúria tecidual, a despeito da produção concomitante de IL-10. Ressalte-se, no entanto, que aproximadamente 90% dos pacientes cutâneos curam suas lesões iniciais durante o curso do tratamento, sugerindo que o desenvolvimento de resposta imune modulatória, apesar de tardia, é eficiente (Antonelli *et al.*, 2005).

Mais recentemente foi observada a correlação da expressão *in situ* de algumas citocinas com a resposta dos pacientes à terapia antimonial, demonstrando-se que em lesões de pacientes que evoluíram com pior resposta ao tratamento há uma maior expressão de IFN γ , bem como IL-10 e TGF- β (Maretti-Mira *et al.*, 2010), mais uma vez associando tanto o aumento de resposta inflamatória quanto o predomínio de citocinas regulatórias com pior evolução.

Outras citocinas com potencial inflamatório podem estar implicadas no processo de inflamação ou resolução no caso da LTA. IL-18, por exemplo, pertence à família de IL-1,

sendo chamada inicialmente de indutora de IFN- γ (Dinarello, 1999). Na pele é produzida por queratinócitos, além de células de Langerhans e células dendríticas localizadas na epiderme, com potencial para indução de mediadores inflamatórios, regulando a atividade citotóxica de células NK e linfócitos T (Wittmann *et al.*, 2009). Estudos em infecções causadas por *Leishmania major* (Wei *et al.*, 1999) e *Leishmania donovani* (Murray *et al.*, 2006) têm associado IL-18 à produção de IFN- γ e TNF- α a partir da estimulação de linfócitos Th1, com finalidade de ativar os macrófagos parasitados e influenciando na susceptibilidade à infecção (Wei *et al.*, 1999). Não há estudos avaliando o papel dessa citocina na LTA até o momento.

Mais recentemente, foi descrita uma terceira linhagem de linfócitos T CD4+ chamados Th17, que se caracterizam pela produção de IL-17 (Lee *et al.*, 2009). Essas células são consideradas potentes indutores de resposta inflamatória e vêm sendo implicadas na patogênese de doenças auto-imunes. Com relação a processos infecciosos, as células Th17 parecem ter ação efetora significativa na defesa contra agentes como *Candida albicans* e bactérias extra-celulares (Korn *et al.*, 2009). No entanto, estudos mais recentes têm apontado para sua participação também em doenças por protozoários (Miyazaki *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2009; Lopez-Kostka *et al.*, 2009). Estudos em pacientes com LTA detectaram a presença de IL-17 em lesões cutâneas e mucosas (Bacellar *et al.*, 2009; Boaventura *et al.*, 2010), sem ter sido realizada correlação com a evolução clínica.

Apesar de o papel das citocinas ser crucial e indubitável, a redundância observada na atuação dos diferentes grupos de citocinas, associada às variações intrínsecas em hospedeiros e parasitas, faz com que a compreensão exata do mecanismo pelo qual ocorre o controle da infecção ainda esteja por ser desvendado. Dessa forma, é possível que outros tipos celulares, bem como outras moléculas, além de linfócitos T e citocinas, estejam envolvidos. Nesse sentido, podemos destacar o sistema de sinalização Notch, cujo nome tem origem em estudos genéticos detectando mutações que determinaram a ocorrência de uma chanfradura (*notch* em inglês) na asa de espécimes de *Drosophila melanogaster* (Morgan, 1917), que corresponde a um sistema de comunicação celular ancestral, presente em organismos metazoários (Gordon *et al.*, 2008).

Esse sistema é composto por um grupo de proteínas transmembrana, cuja expressão é bastante conservada entre as espécies, e que é responsável pela regulação de vários processos decisórios celulares. Essas proteínas se dividem em receptores e ligantes, formando os pares que dão início ao processo de ativação. Em mamíferos são descritos 4 receptores Notch, Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4 e 5 ligantes, da via clássica de ativação, Jagged1, Jagged2, Delta-like1 (DLL-1), Delta-like3 (DLL-3) e Delta-like4 (DLL-4) (Osborne & Minter, 2007;

Radtke *et al.*, 2010) (Fig1.1). Como resultado da ligação entre o receptor e um dos ligantes ocorre clivagem do receptor na porção próxima à membrana, em um processo dependente de γ -secretase, e o fragmento intra-celular (NICD – “Notch intra-celular domain”) se desloca para o núcleo, onde se liga a um complexo de ativação de transcrição de forma a induzir a expressão do gene alvo (Gordon *et al.*, 2008) (Fig1.2).

Esse sistema é fundamental nos processos decisórios que levam ao desenvolvimento e diferenciação celular na embriogênese e, após o nascimento, regula a homeostase de vários tecidos, incluindo o sistema imune e a pele (ArtavanisTsakonas *et al.*, 1999; Baldi *et al.*, 2004; Osborne & Miele, 1999; Osborne & Minter, 2007; Radtke *et al.*, 2010).

Na epiderme já foi demonstrada a presença dos quatro receptores Notch, bem como dos ligantes Jagged1, Jagged2 e DLL-1 (Nickoloff *et al.*, 2002; Watt *et al.*, 2008), que estão envolvidos com o processo de diferenciação de queratinócitos e homeostase das estruturas anexiais (Watt *et al.*, 2008).

No sistema imune, Notch1 é essencial para a diferenciação de células do timo na linhagem de células T e, uma vez que as células estão na periferia, o sinal mediado pelos receptores Notch influencia na ativação, proliferação e produção de citocinas nessas células (Osborne & Minter, 2007; Radtke *et al.*, 2010). A diferenciação de células T CD4+ “naive” nas diferentes linhagens de células T auxiliares (“helper”) é regulada primeiramente pelos sinais co-estimulatórios dos receptores de células T (TCR) e pelas citocinas presentes no meio, havendo também participação do sistema Notch. A atuação desse sistema é essencial para a diferenciação na linhagem Th2 (Tu *et al.*, 2005; Radtke *et al.*, 2010), podendo influenciar também a resposta Th1, nesse caso de maneira não exclusiva, na medida em que o bloqueio do receptor Notch não é suficiente para inibir a diferenciação desse grupo celular (Tacchini-Cottier *et al.*, 2004). O caminho a ser tomado pela célula “naive” depende do ligante envolvido na ativação do receptor Notch: a expressão de ligantes do grupo Delta-like por células apresentadores de antígeno (APC) promove uma resposta Th1 mediada pelo fator de transcrição T-bet, podendo ainda inibir a diferenciação Th2 (Osborne & Minter, 2007; Radtke 2010) (Fig1.3). Essa via também já foi associada à diferenciação de células Th17 (Elyaman *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2009). Por outro lado, a presença de ligantes Jagged na superfície de APCs induz a resposta Th2, mediada por IL-4 e o fator de transcrição Gata3 (Osborne & Minter, 2007; Amsen *et al.*, 2007), e pode também estimular a diferenciação de células regulatórias (Treg) *in vitro*, possivelmente através de TGF- β e FoxP3 (Samon *et al.*, 2008) (Fig1.3).

Considerando a importância desse sistema tanto na homeostase do tecido cutâneo, bem

como ao destino das células do sistema imune, é possível que durante a LTA haja participação dessas proteínas nos processos de inflamação e resolução das lesões que determinam o prognóstico da doença.

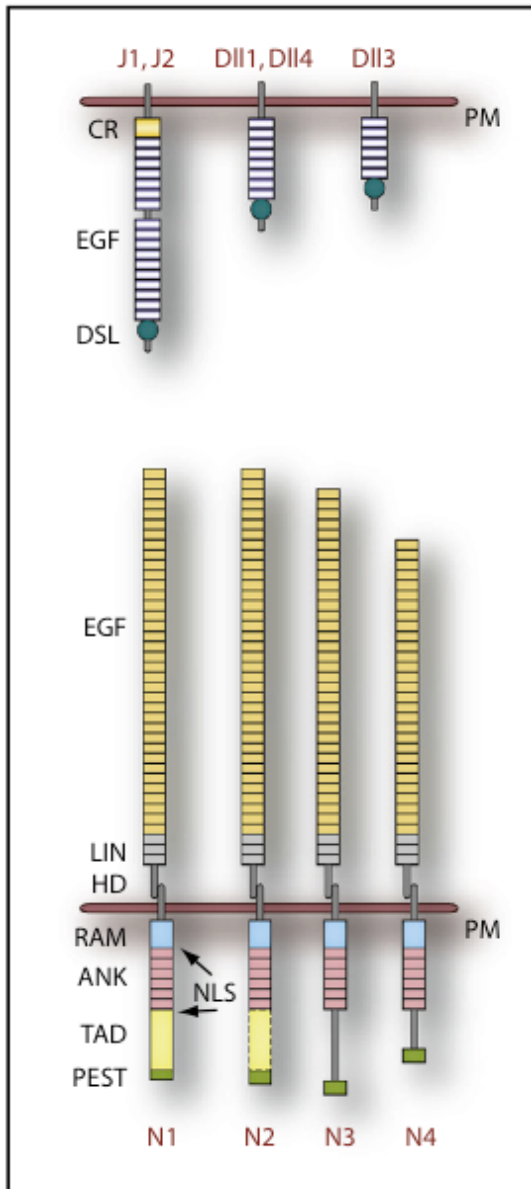


Fig. 1.1: Receptores Notch (N1,N2, N3 e N4) e seus ligantes (J1, J2, DII1, DII4 e DII3). Os ligante possuem um domínio amino terminal bastante conservado, chamado DSL, envolvido na ligação com o receptor, seguido de repetições do fator de crescimento epidérmico (EGF). Os ligantes Jagged (J1 e J2) contêm um domínio rico em cisteína (CR) na porção terminal das repetições de EGF, próximo a membrana citoplasmática (PM). A porção extra-celular dos receptores contém as repetições de EGF (36 em N1 e N2, 34 em N3 e 29 em N4), seguidos de três domínios ricos em cisteína (LIN), que previnem a ativação independente dos ligantes, e um domínio de heterodimerização (HD). O componente intra-citoplasmático contém um domínio RAM (molécula proximal associada ao fator de transcrição RBP-J), seguido de seis repetições de anquirina (ANK) que se ligam ao fator de transcrição CSL, dois sinais de localização nuclear (NLS), um domínio de transativação (TAD, presente em N1 e N2) e uma sequência PEST (domínio rico em prolina, glutamato, serina e treonina) envolvido na regulação da estabilidade protéica. **Fonte:** Radtke, F. *et al.* Notch signaling in the immune system. *Immunity*, 2010.

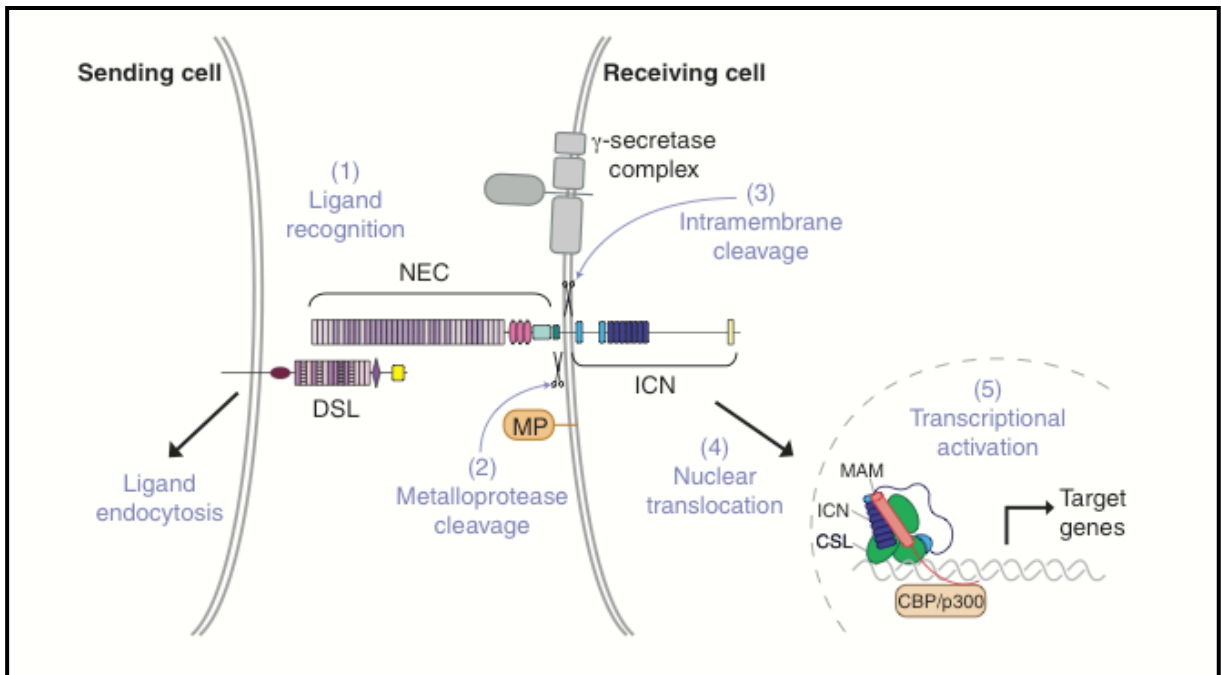


Fig 1.2 Modelo para os principais eventos da via de sinalização Notch. Sinais enviados pelo ligante (1) levam à clivagem via metaloprotease (2). Essa etapa leva à clivagem intracelular via γ -secretase (3) e liberação do fragmento intra-celular do receptor (ICN) que se desloca até o núcleo (4) onde se junta ao complexo de ativação transcripcional, induzindo a transcrição dos genes alvos (5). **Fonte:** Gordon, W R, *et al.* The molecular logic of Notch signaling a structural and biochemical perspective. *Journal of cell science*, 2008.

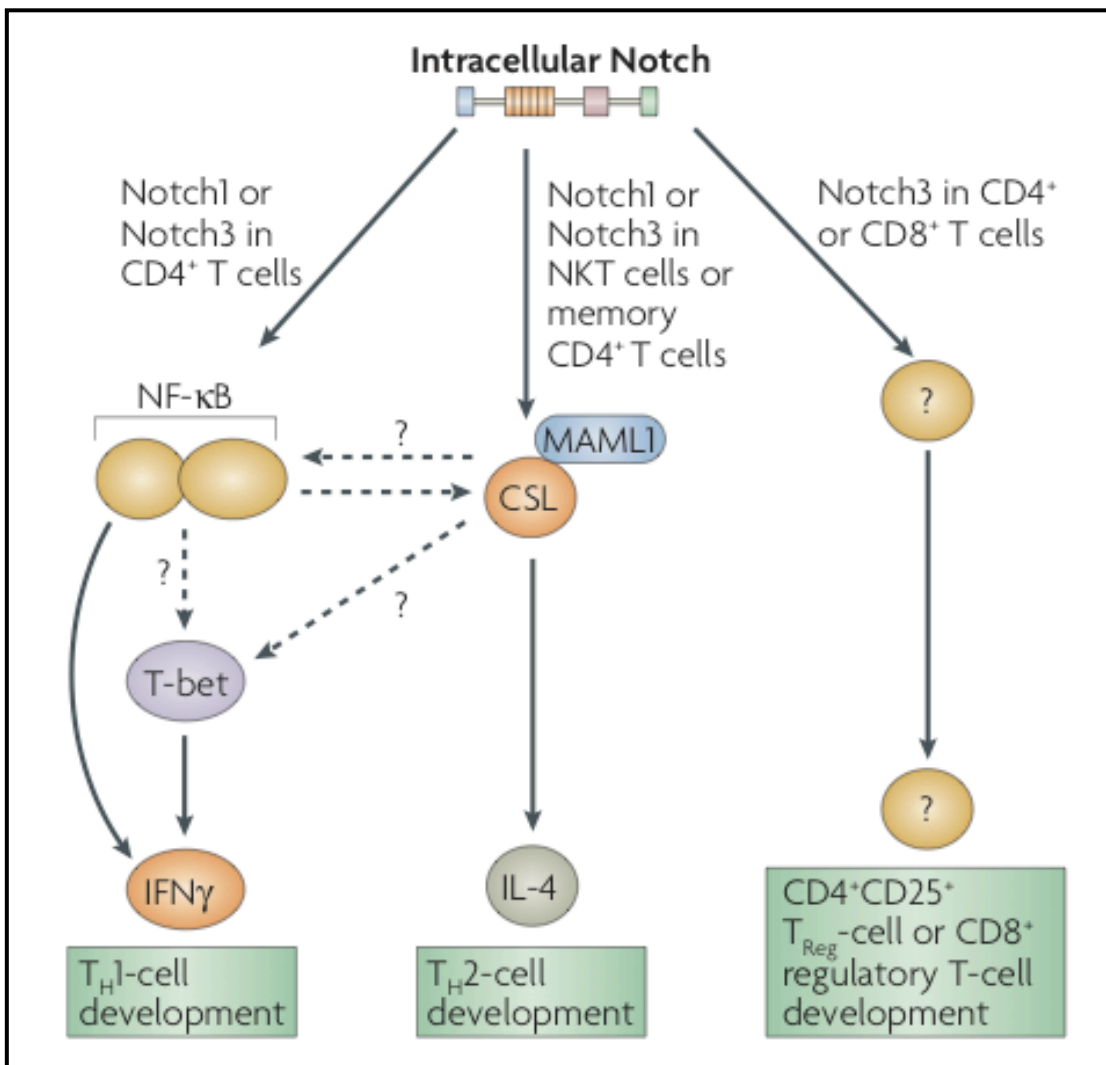


Fig 1.3: O sistema Notch nas células T do sangue periférico: esse esquema se baseia em dados apresentados por vários laboratórios. Setas sólidas evidenciam processos já confirmados cientificamente, enquanto as setas pontilhadas correspondem a vias ainda em estudo. A ativação do receptor Notch leva à ativação do fator nuclear κ B (NK- κ B), o qual leva à diferenciação Th1, associado a genes que codificam T-bet e IFN- γ . Por outro lado, a ativação do receptor Notch regulando a resposta Th2 é mediada através da via clássica CSL (CBF1-suppressor of hairless-Lag1)-MAML1 (Mastermind-like 1). Desta forma, tanto o receptor Notch quanto a proteína CSL são essenciais para a produção de IL-4 por linfócitos *natural killer* (NKT) e por linfócitos de memória TCD4+. Há a possibilidade de envolvimento no desenvolvimento de células T regulatórias (T-reg). **Fonte:** Osborne, BA & Minter, LM. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nature reviews. Immunology*, v. 7, n. 1, 2007.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar fatores que possam servir como marcadores do processo resolutivo das lesões de LTA.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1. Avaliar a expressão das proteínas que compõe o sistema de sinalização Notch (receptores Notch1, Notch2, Notch3, Notch4 e seus ligantes DLL1, DLL4 e Jagged1) e das citocinas IL-17, IL-18, IL-23 e TGF- β nas lesões cutâneas e mucosas de pacientes com LTA

2.1.2. Avaliar a expressão gênica de T-bet e Gata3 em lesões de pacientes com LTA .

2.1.3. Detectar os níveis de IL-17, IL-23 e TGF- β produzidos por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com LTA estimuladas com antígeno total de *L. (V.) braziliensis*.

2.1.4. Avaliar a expressão gênica dos marcadores do sistema Notch, das citocinas previamente citadas, incluindo IL-4 e INF- γ , e de T-bet e Gata3 em PBMC de pacientes com LTA após estimulação com antígeno total de *L. (V.) braziliensis*.

2.1.5. Comparar os resultados acima de acordo com tempo de evolução das lesões, diâmetro da reação de Montenegro e resposta ao tratamento.

3. METODOLOGIA

3.1. Casuística

Um total de 73 casos de LTA foi selecionado a partir do arquivo de pacientes do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC- Fiocruz/RJ). Os pacientes eram provenientes de áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro e foram atendidos no ambulatório de Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) — FIOCRUZ/RJ, pelos doutores Manoel Paes de Oliveira Neto e Marise Mattos. Durante a consulta de investigação foi colhido material biológico para diagnóstico (sangue em frascos heparinizados ou com EDTA, e amostra de tecido da lesão). Após a confirmação do diagnóstico, foi instituído tratamento com animonial pentavalente (Glucantime® - Rhodia Farma/Sanofi-aventis). Os pacientes com lesões cutâneas receberam doses que variaram de 5 a 20 mg/Kg e alguns receberam tratamento intra-lesional, mas não houve diferença estatística entre a dose média total utilizada entre os diferentes grupos comparados. Os pacientes com lesões mucosas receberam 20mg/kg de glucantime em ciclos que duraram em média 60 dias, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (SVS/MS, 2007).

Os fragmentos de tecido foram obtidos da borda da úlcera leishmaniótica por biópsia, sob condições de esterilidade e anestesia local para uma rotina diagnóstica. Cada amostra colhida foi dividida em três partes: uma foi colocada em tubo de 1,5 mL (Eppendorf®-Hamburg-Germany) e imediatamente congelada e armazenada a -20° C para posterior utilização na técnica de PCR; a segunda parte foi usada para impressão em lâmina e no estudo histopatológico em cortes parafinados de tecido e o último fragmento foi incluído em resina (Tissue-Tek O.C.T. compound - Miles Inc., Elkhart, EUA) e estocado em nitrogênio líquido, em alguns casos uma parte do fragmento também foi cultivada em meio NNN.

Para este trabalho, foram incluídos apenas pacientes com diagnóstico parasitológico para LTA comprovado por pelo menos um dos métodos utilizados na rotina: impressão em lâmina, histopatologia, cultura em meio NNN ou PCR. Como controle das lesões cutâneas foram estudados fragmentos de pele normal congelados obtidos de cirurgias eletivas e estéticas (n=8). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz, sob o protocolo 389/07.

A seleção das amostras de tecido e sangue deu-se de acordo com a apresentação clínica, o tempo de evolução da doença e a resposta ao tratamento preconizado, de acordo com os seguintes critérios:

1. Apresentação clínica: leishmaniose cutânea (n=60) e leishmaniose mucosa (n=13);

2. Tempo de evolução: lesões com tempo de evolução menor ou igual a três meses foram definidas como recentes ou de curta duração (n= 41) e lesões com tempo de evolução igual ou superior a 5 meses como tardias ou de longa duração (n= 24), dois pacientes apresentaram evolução de quatro meses e em seis casos essa informação não foi obtida (nas avaliação quanto ao tempo de evolução esses 08 pacientes foram excluídos).

3. Resposta ao tratamento: o critério de cura estabelecido foi clínico, definido como a epitelização completa das lesões acompanhada do desaparecimento do eritema, induração ou pápulas. Foi considerada como boa resposta ao tratamento (n=28) a ocorrência de cura clínica completa até três meses após o seu término. A má resposta ao tratamento (n=26) foi definida como a ausência de cura clínica no mesmo período, recidivas ou aparecimento de lesões novas. Em seis pacientes essa informação não pôde ser obtida. As lesões mucosas foram avaliadas separadamente e comparadas com os grupos de lesões cutâneas.

Do total de casos selecionados 41 fragmentos congelados foram analisados pela técnica de imunohistoquímica e 41 casos foram submetido à análise por meio de PCR em tempo real, mas nem todos os casos analisados em todos os experimentos. A análise de sangue periférico ocorreu em 18 casos, apenas 1 deles com análise concomitante de lesões cutâneas ou mucosas, em decorrência da ausência de material desses pacientes no banco de biópsias (uma tabela detalhada das análises a que foi submetido cada caso faz parte do Anexo1).

A tabela 3.1 mostra os dados clínicos e evolutivos dos pacientes selecionados para este estudo incluindo a intradermoreação de Montenegro (IDRM). Os valores de idade estão representados pela média \pm desvio padrão.

TABELA 3.1. Características clínicas e evolutivas dos pacientes com LTA estudados

Pacientes Resposta ao tratamento	LCL		LM
	Boa Resposta	Má resposta	
Sexo (M:F)	17:11	15:11	5:8
Idade (média em anos ± DP)	41±12	37±3	60±5
Duração da doença			
Recente ≤ 3 meses	19(67,9%)	20 (76,9%)	0
Tardia > 5 meses	5 (17,9%)	5 (19,2%)	13(100)
Desconhecido ou 4 meses	4 (14,2%)	1 (3,9%)	0
IDRM			
≤29mm	14(50%)	19 (73.1%)	2 (15,4%)
>29mm	12 (42,9%)	7 (26.9%)	9 (69,2%)
Desconhecido	2 (7,1%)	0	2 (15,4%)

DP= Desvio padrão, M=masculino e F=feminino, LCL=lesões cutâneas, ML= lesões mucosas.

3.2. Imunohistoquímica indireta

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para identificação de citocinas e proteínas do sistema Notch na epiderme e no infiltrado inflamatório das lesões de LTA estudadas. Esta metodologia, já estabelecida em nosso grupo (Pirmez *et al.*, 1990), baseia-se na imunoperoxidase de três etapas, sendo a primeira o uso do anticorpo anti-humano específico para a proteína em questão; a segunda, do anticorpo secundário biotilado; e a terceira, da estreptavidina peroxidase. O procedimento se inicia com a obtenção de cortes congelados de 4µm de espessura em criostato (Leica Jung CM1800, Nussloch, Alemanha), a partir de fragmentos de biópsias conservados em nitrogênio líquido. Os cortes foram colocados em lâminas filmadas com silano 4% (Sigma-Aldrich, Inc., EUA) e fixados com acetona gelada (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos (para os marcadores de membrana) ou solução de formalina tamponada/metanol/acetona por 2 minutos (para as citocinas). Após a etapa de fixação, os cortes foram hidratados com TBS por 10 minutos. Daí seguiram-se os bloqueios da peroxidase endógena com solução composta por H₂O₂ 0,6% e azida sódica 0,1% por 30 minutos, e de possíveis ligações inespecíficas através do uso de albumina de soro bovino 2% (Sigma) diluídos em TBS por 30 minutos. O material foi incubado com os anticorpos monoclonais primários anti-humano por 18 horas a 4°C, em concentrações

selecionadas a partir de experimentos de padronização e especificadas na Tabela 3.2. A incubação foi seguida de 2 etapas com duração de 30 minutos, nas quais o material foi incubado primeiramente com os respectivos anticorpos secundários biotinizados e depois com estreptoavidina peroxidase (GE Healthcare, Reino Unido), ambos diluídos 1:100. Todas as etapas foram intercaladas por lavagens em PBS ou Tris/HCl. A revelação com o cromógeno 3-amino-9-ethylcarbazol (Sigma) por 10 minutos foi seguida da contra-coloração das amostras com hematoxilina de Mayer (Merck) por 1 minuto. As lâminas foram então montadas com lamínula em meio aquoso gelatina/glicerina para análise em microscópio de luz Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Todo o processo foi realizado em câmara úmida.

Tabela 3.2. Relação dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Concentração	Purificado em	Fabricante
Notch1	4mg/mL	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)
Notch3	4mg/mL	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
DLL4	4mg/mL	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
Jagged1	4mg/mL	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
IL-18	4mg/mL	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
TGFβ	5mg/mL	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
Notch2	5mg/mL	Cabra	R & D Systems, MN, EUA
Notch4	5mg/mL	Cabra	R & D Systems, MN, EUA
DLL1	10mg/mL	Camundongo	R & D Systems, MN, EUA
IL-17	3,3mg/mL	Cabra	R & D Systems, MN, EUA
IL-23	1mg/mL	Cabra	R & D Systems, MN, EUA
Anti- camundongo biotinilado	1:100	Coelho	Dako A/S, Dinamarca
Multi-link anti- cabra, camundongo e coelho biotinilado	1:100	Porco	Dako A/S, Dinamarca

3.3. Análise das imagens

Para a análise dos resultados de imunohistoquímica foram quantificadas áreas ou células isoladas expressando o marcador específico estudado. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E600. As imagens foram capturadas em câmera digital utilizando-se o programa computacional para análise de imagens (ImagePro Plus vs 4.5.1.29 - Media Cybernetics, Maryland, EUA).

No caso da análise das proteínas do sistema Notch em infiltrado inflamatório dérmico foi realizada a contagem de, no mínimo, 500 células totais em pelo menos cinco campos aleatórios com aumento de 100X. Após esta quantificação, os dados foram calculados para obtenção da frequência de células positivas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Frequência de células} = \frac{\text{número de células positivas}}{\text{número de células totais}} (*100)$$

Para a análise da expressão das proteínas do sistema Notch na camada epidérmica, devido ao padrão de marcação ser constituído por áreas difusas no tecido, também foi realizada a quantificação dos níveis de expressão de através da obtenção de imagens de cinco campos aleatórios da epiderme em aumento de 40X em relação a área total de epiderme presente no campo utilizando a seguinte fórmula (ver imagem ilustrativa no Anexo 2):

$$\text{Percentual de área com marcação positiva} = \left(\frac{\text{área marcada}}{\text{área total de epiderme no campo}} \right) \times 100.$$

A análise de citocinas foi feita contando-se o número de células marcadas em toda área do corte, em virtude da baixa frequência de células marcadas em algumas amostras, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Frequência de células} = \frac{\text{número de células positivas}}{\text{área do corte em mm}^2}$$

As contagens feitas ao microscópio de luz e as análises das imagens foram efetuadas por dois observadores independentes. Os resultados obtidos foram correlacionados com a apresentação clínica da doença, o tempo de evolução e a resposta à terapia específica.

3.4. Preparação do antígeno total de *L.(V.) braziliensis*

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) foram crescidas a 28°C em meio Schneider (Sigma) suplementado com soro fetal bovino 10% (Thermo Scientific Hyclone, Utah, EUA). Os parasitas foram coletados em sete dias (fase estacionária de crescimento). Posteriormente a fase líquida da cultura foi centrifugada a 500xg por 5 minutos e as promastigotas do sedimento ressuspensas em PBS, contadas na câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 10⁸ promastigotas/mL. Em seguida, os parasitas foram rompidos utilizando-se dez ciclos contínuos de congelamento e descongelamento, seguidos de 20 minutos de ultrassom a 40 watts em banho de gelo (Lab-line Instruments Inc., Modelo 9130, Melrose Park, IL, EUA). As amostras foram estocadas a -20°C até o uso.

3.5. Estimulação de células com antígeno total de *L. (V.) braziliensis*:

As amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de sangue heparinizado colhido dos pacientes antes do início do tratamento, separados por um gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) e imediatamente congelados em soro fetal bovino contendo 5% de dimetil-sulfoxido (DMSO – Sigma) com aproximadamente 10^7 células por alíquota. As amostras selecionadas foram descongeladas e imediatamente lavadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI – Sigma) com 10% de soro humano AB (Sigma), acrescido de $10\mu\text{l/mL}$ de L-glutamina 100x, $0,5\mu\text{l/mL}$ de β -mercaptoetanol 0,1M, $1\mu\text{l/mL}$ de penicilina/estreptomicina 1000x. As células foram ajustadas para concentração de 3×10^6 células/mL após contagem em azul de trypan (Gibco-Invitrogen® - CA, EUA), colocadas em placas de 24 poços (3×10^6 células/poço) ou 96 poços (3×10^5 células/poço) e estimuladas com $50\mu\text{l}$ e $10\mu\text{l}$ de antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (10^8 parasitos/mL), respectivamente. As culturas não estimuladas foram usadas como controle negativo. Após 72 horas o sobrenadante foi coletado e armazenado a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ até realização do ensaio imunoenzimático, enquanto as células, coletadas em Trizol (Invitrogen®), foram submetidas ao protocolo para extração de RNA.

3.6. Elisa:

Foi realizada detecção de IL-17, IL-23 e TGF β com o kit Read-set-Go (eBioscience® – CA, EUA) em placas de 96 poços – Coating Corning Costar 9018 (eBioscience®) de acordo com as seguintes etapas: (1) cobertura da placa com anticorpo de captura específico ($100\mu\text{l/poço}$), diluído no tampão fornecido pelo fabricante (PBS 1x pH 7,4), por 18h, seguido de bloqueio de ligações inespecíficas com $200\mu\text{l/poço}$ de solução composta por tampão fosfato enriquecido com soro fetal bovino por 1 hora; (2) as amostras foram testadas em duplicata, adicionando-se $100\mu\text{l}$ de cada sobrenadante por poço e incubadas por 18h. Os anticorpos para composição da curva padrão foram diluídos de forma seriada utilizando essa mesma solução em um volume final de $100\mu\text{l/poço}$; (3) incubação por uma hora com anticorpo de detecção biotilado (camundongo/anti-humano) e (4) revelado com enzima peroxidase (avidin horseradish peroxidase – eBioscience®) por 30 minutos. Todas as etapas foram intercaladas por 5 lavagens com PBS 1x/0,05% Tween-20. Ao final foi adicionada solução de substrato (fornecida pelo fabricante) por 15 minutos, seguida da solução de parada (H_2SO_4 2N). As diluições da curva padrão foram de 500pg/mL a $3,906\text{pg/mL}$ para IL-17, 2000pg/mL a $15,625\text{pg/mL}$ para IL-23 e 8000pg/mL a $62,5\text{pg/mL}$ para TGF- β . Nas amostras de TGF- β , afim de ativar a forma latente de TGF- β 1, foi necessário submeter as amostras a acidificação com $20\mu\text{l}$ de HCL 1N por 10 minutos, seguido de neutralização com NaOH 1N. As placas foram lidas no comprimento de onda de 450nm no equipamento VersaMax ELISA

Microplate reader (MolecularDevices, Inc. EUA) e os resultados analisados no programa Soft Max® Pro (Molecular Devices, Inc. EUA).

3.7. Isolamento de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o Kit de extração da RBC (BioAmerica Inc, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. No caso dos fragmentos de tecido, cada amostra foi composta a partir de 35 a 40 cortes de 5µm dos fragmento das lesões cutâneas criopreservados, obtidos com criostato (Leica Jung 1800 Nussloch, Alemanha) e no caso das células, a partir de $1,0 \times 10^5$ a $3,0 \times 10^6$ células de sangue periférico (PBMC). A presença e integridade do RNA extraído foi confirmada pela visualização das bandas específicas através de eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% (Anexo 3 - Fig1.1). A agarose foi diluída em 50mL de tampão tris-borato (TBE) 0,5% (Sambrooks, *et al.*, 1989) em aquecimento no forno microondas durante 1 minuto e, ainda no estado líquido, foram adicionados 2µL de brometo de etídio 5mg/mL (Sigma). Nos poços, foram depositadas 10µL das amostras acompanhadas do carreador Blue/Orange loading Dye (Promega, Wisconsin, EUA) na proporção de 1:6. Para análise do peso molecular, foi usado 1µL de 100 pares de base “Ladder” 1µg/µL (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) diluído em 9µL de TE 10mM. A corrida foi realizada numa voltagem de 70 V, utilizando TBE 0,5% como tampão de corrida. Após visualização das bandas em transiluminador, o gel foi fotografado em equipamento Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rd Laboratories, Inc, Califórnia, EUA) (Anexo3 - Fig 3.1)

3.8. Síntese do cDNA

A transcrição reversa foi realizada utilizando a amostra total de RNA extraído (volume de 40 – 50 µL), utilizando 0,5µg de oligo dT (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). O RNA foi aquecido a 70 °C por 10 min e transferido para o gelo. À esta solução foram adicionados 4µL do tampão 5 vezes concentrado fornecido pelo fabricante; 2µL de DTT 0,1M; 1µL de dNTP 10mM (Promega) e 1µL de enzima RT (Superscript II RT, Gibco BRL, Invitrogen®), seguindo-se incubação por 50 min a 42°C. O cDNA foi então estocado a –20 °C até seu uso.

3.9. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

O sistema SYBR Green (AppliedBiosystems, EUA) foi utilizado para as reações de PCR em tempo real, realizadas com os pares de iniciadores (Bioneer®, Daejeon, Coreia) específicos para as seqüências codificantes dos seguintes genes: Notch1, Notch3, Notch4, DLL4, Jagged1, T-bet, Gata3, IL-17, IL-18, IFNγ, IL-4 e TGFβ (Tabela 3.3).

Em placas ópticas de 96 poços (AppliedBiosystems) foram adicionados 7,5 μ L de SYBR Green Mix (2x), 0.3 μ L dos pares de oligos iniciadores (10 pmol/ μ L de cada oligo) e água. O volume final da mistura por poço foi de 15 μ L. As amostras foram submetidas ao programa de PCR no termociclador ABI Prism SDS 7000. As temperaturas usadas foram: desnaturação inicial a 95 °C/10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C/30 seg, anelamento e extensão a 60 °C/1min, Hold 25°C/ 5min seguidos por 1 ciclo para obter a curva de dissociação (95 °C/15 seg, 60 °C/20 seg e 95 °C/15 seg). O “software” SDS 7000 (AppliedBiosystems) foi utilizado para a determinar os resultados e os dados obtidos foram avaliados pelo “software” GraphPad Prisma 4.03.m

Tabela 3.3. Sequências dos iniciadores usados para a reação de PCR em tempo real (PB: número de pares de base dos fragmentos amplificados)

Gene *	Senso (Forward)	Anti-senso (Reverse)	PB
Notch 1 NM 17617	CACTGTGGGCGGGTC C	GTTGTATTGGTTCGGCACCA T	85
Notch 3 U97669	AGATTCTCATCCGAAACCGCTC TA	GGGGTCTCCTCCTTGCTATC CTG	259
Notch 4 U95299.1	GCGGAGGCAGGGTCTCAACGG ATG	AGGAGGCGGGATCGGAATG T	92
DLL1 NM 005618.3	CCTACTGCACAGAGCCGATCT	ACAGCCTGGATAGCGGATAC AC	134
DLL4 AF253468	AACTGCCCTTCAATTTACCT	GCTGGTTTGCTCATCCAATA A	176
Jagged1 AF003837	CGGCCTCTGAAGAACAGAAC	GTCACCAAGCAACAGATCCA	83
T-bet NM013351	TGTTGTGGTCCAAGTTTAATCA GCA	CCCGGCCACAGTAAATGACA G	95
Gata 3 NM002051	TGGCCTAAGGTGGTTGTGCTC	CTCAGCACAGGCTGCAGGA ATA	130
IL-17 NM002190	TGTCCACCATGTGGCCTAAGAG	GTCCGAAATGAGGCTGTCTT TGA	119
IL-18 NM 001562.2	GCTTGAATCTAAATTATCAGTC	GAAGATTCAAATTGCATCTT AT	342
INF γ NM 000619	AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT	GTTCCATTATCCGCTACATC TGAA	118
IL-4 M 13982	AACAGCCTCACAGAGCAGAAG AC	GCCCTGCAGAAGGTTTCCTT	101
TGF β NM000660	CGAGAAGCGGTACCTGAAC	TGAGGTATCGCCAGGAATTG	127
Actin- β NM001101	TCACCGAGCGCGGCT	TAATGTCACGCACGATTTC C	60

* Nome do gene acompanhado do número de identificação do “GeneBank-PubMed”.

A curva padrão para a quantificação por PCR em tempo real foi montada utilizando amostras com concentrações de DNA conhecidas variando de 1pg/ μ l a 0,0001pg/ μ l.

Os DNAs usados na curva padrão foram obtidos a partir do produto de uma reação de PCR convencional usando-se os iniciadores específicos para cada alvo. Parte do produto dessa reação foi purificado com o kit de extração para gel e produto de PCR da RBC (BioAmerica Inc). Depois da purificação, uma alíquota de cada amostra foi avaliada no espectrofotômetro (Eppendorf®) na diluição de 1:100 e as diluições para composição da curva foram estabelecidas .

A confirmação da presença do produto específico amplificado por PCR foi realizada pela visualização do material através de eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 2%. A

agarose foi diluída em 50mL de tampão tris-borato (TBE) 0,5% (Sambrook *et al.*,1989) em aquecimento no forno microondas durante 1 minuto e, ainda no estado líquido, foram adicionados 2 μ L de brometo de etídio 5mg/mL (Sigma). Nos poços, foram depositadas as amostras acompanhadas do carreador Blue/Orange loading Dye (Promega) na proporção de 1:6. Para análise do peso molecular, foi usado 1 μ L de 50- pares de base “Ladder” 1 μ g/ μ L (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) diluído em 9 μ L de TE 10mM. A corrida foi realizada numa voltagem de 70 V, utilizando TBE 0,5% como tampão de corrida. Após visualização das bandas em transiluminador, o gel foi fotografado em equipamento Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rd Laboratories, Inc, Califórnia, EUA) (Anexo 3 – Fig 3.2a – 3.2i).

A correção da variação do conteúdo c-DNA entre as diferentes amostras foi feita a partir da relação dos valores obtidos nos ensaios específicos e a concentração de β -actina em cada amostra.

3.10. Análise estatística:

Para realizar as análise estatísticas foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism vs 4.03. As análises entre dois grupos foram feitas com o teste não paramétrico Mann-Whitney e entre mais de dois grupos através do teste de Kruskal-Wallis utilizando o pós-teste de Dunn para comparação entre as variáveis. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,050.

4. RESULTADOS:

Receptores Notch e ligantes Delta-like estão aumentados em lesões de pacientes que evoluem com má resposta ao tratamento

A análise da epiderme através da técnica de imunohistoquímica evidenciou, tanto nas lesões quanto na epiderme normal, a presença dos quatro receptores Notch e dos ligantes Jagged1 e DLL4. O ligante DLL1, no entanto, foi detectado apenas no infiltrado inflamatório. Quando comparadas com a pele normal, as lesões cutâneas apresentaram um aumento expressivo da expressão de Notch1 ($p < 0,0001$). Não foi observada diferença na expressão dos receptores ou ligantes quando se comparou os grupos de pacientes com relação a duração da doença, tamanho de IDRMs ou resposta ao tratamento, exceto por uma tendência a um aumento de expressão de DLL4 nas lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento (Fig 4.1).

No infiltrado inflamatório foi observado aumento de expressão de Notch1 e DLL1 nas lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento ($p = 0,0403$ e $p = 0,0413$ respectivamente) (Fig 4.2). Nas lesões mucosas foi observado aumento de expressão do receptor Notch3 ($p = 0,0061$) (Fig 4.3) e ambos os ligantes do grupo Delta-like, DLL4 ($p = 0,0056$) e DLL1 ($p = 0,0090$), quando comparados com os achados de lesões cutâneas (Fig 4.4).

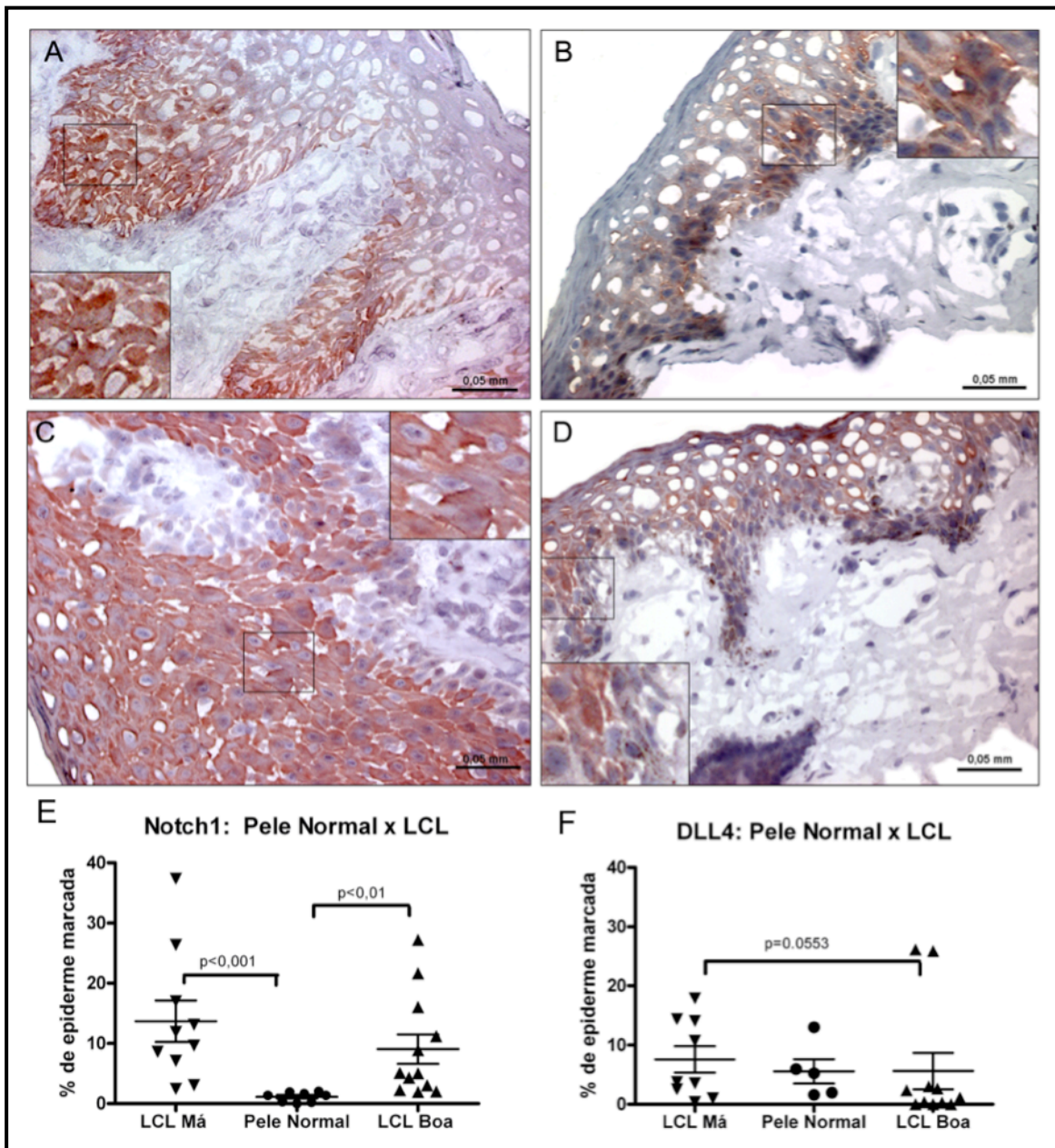


Fig 4.1: Imunohistoquímica de lesões cutâneas de LTA. Imagem representativa de cortes congelados incubados com anticorpo anti-Notch1 evidenciando a marcação na epiderme de um paciente que evoluiu com boa resposta (LCL Boa) (A) e de pele normal (B). Imagem representativa de cortes congelados incubados com anticorpo anti-DLL4 evidenciando a marcação na epiderme de um paciente que evoluiu com boa resposta (LCL Boa) (C) e de pele normal (D). Gráfico comparando a expressão de Notch1 na epiderme das lesões cutâneas com pele normal (n=8) mostrando maior marcação nas lesões, quando comparadas com a pele normal, mais significativo nos casos de má resposta ao tratamento (LCL Má n=10, LCL Boa n=12) (E). Gráfico comparando a expressão de DLL4 na epiderme das lesões cutâneas com fragmentos de pele normal (n=5) não evidencia diferença significativa, no entanto há uma tendência a maior expressão em fragmentos de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento (n=9), quando comparados com aqueles que evoluíram com boa resposta (n=11) (F). Microscopia ótica (40x)

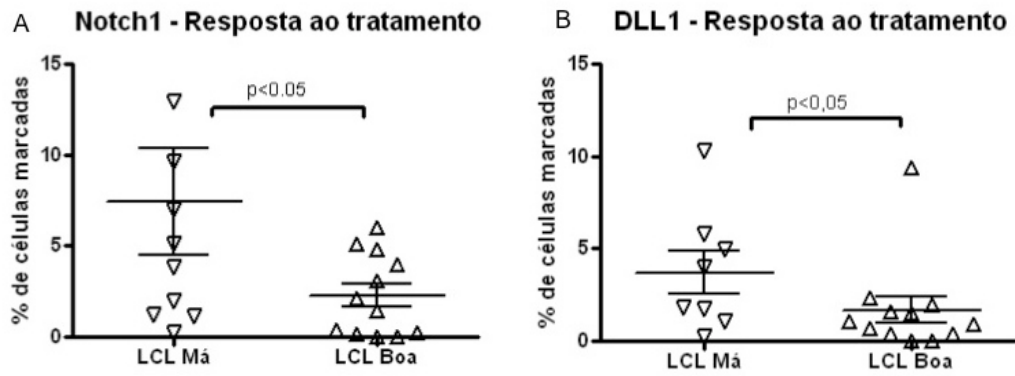


Fig. 4.2 : Gráficos dos resultados das análise dos infiltrados das lesões cutâneas de LTA, com relação ao percentual de células expressando o receptor Notch1 (A) e DLL1 (B), evidenciando maior frequência de células marcadas nas lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento (LCL Má). LCL Má Notch1 n=10, LCL Boa Notch1 n=12; LCL Má DLL1 n=8, LCL Boa DLL1 n=12.

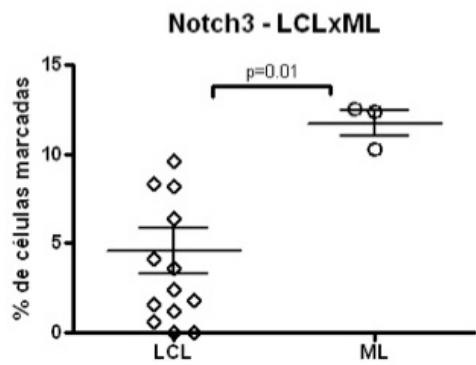


Fig 4.3: Gráfico dos resultados das análise de infiltrados das lesões de LTA comparando LCL (lesões cutâneas n=14) com ML (lesões mucosas n=3), evidenciando maior numero de células marcadas com o receptor Notch3 nas lesões mucosas.

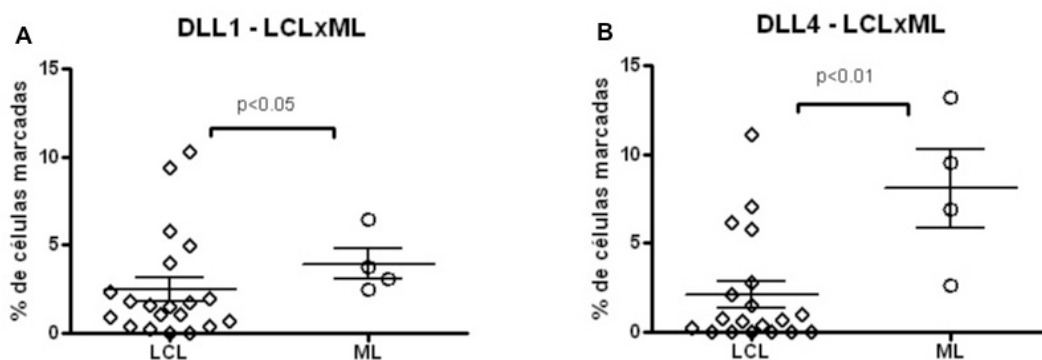


Fig. 4.4: Gráficos dos resultados das análises de infiltrados nas lesões de LTA comparando LCL com ML evidenciando maior número de células marcadas nas lesões mucosas, tanto para DLL1 (A), quanto para DLL4 (B). LCL DLL1 n= 20, ML DLL1 n= 4; LCL DLL4 n= 19, ML DLL4 n= 4)

O ligante Jagged1, foi detectado na epiderme e no infiltrado dérmico distribuído de forma difusa.(Fig. 4.5).

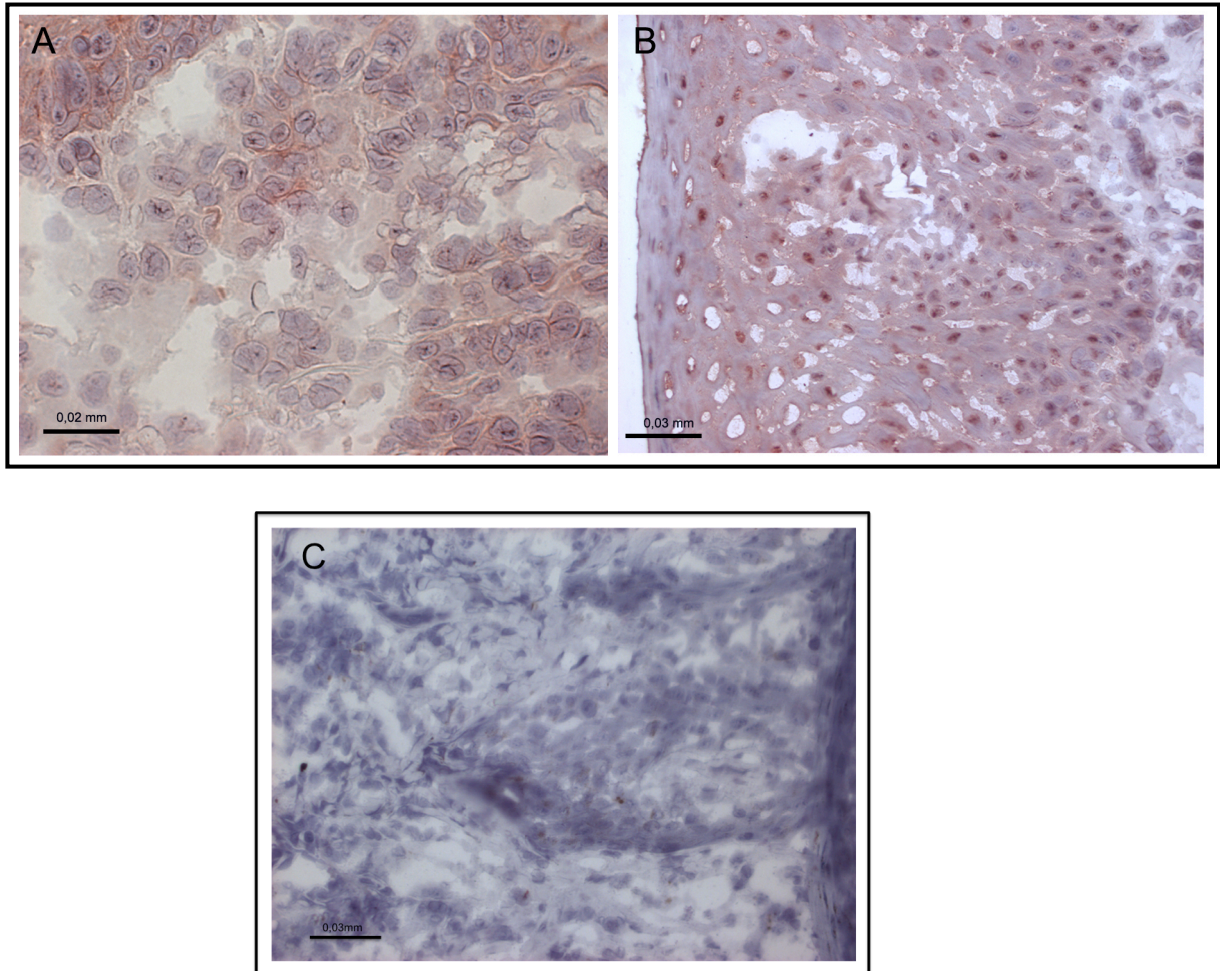


Fig. 4.5: Imunohistoquímica de corte congelado de lesão cutânea de LTA incubada com anticorpos anti-Jagged1 e revelado com peroxidase. Na figura A observamos imagem representativa da marcação difusa do infiltrado dérmico. Microscopia ótica 100x. Na figura B a imagem representativa da distribuição no ligante na epiderme. Microscopia ótica 40x. Na figura C imagem representativa do controle negativo. Microscopia ótica 40x.

A análise de quantificação através de PCR em tempo real confirmou os achados de imunohistoquímica com relação ao receptor Notch1, evidenciando uma maior expressão de Notch1 em lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento ($p=0,0013$) (Fig 4.6) e uma tendência a haver maior expressão desse receptor nas lesões cutâneas em relação às mucosas ($p=0,0581$). DLL1 não foi detectado nas amostras de pele normal através dessa técnica. Não foi observada diferença significativa em relação os demais receptores e aos ligantes estudados (Anexo 4).

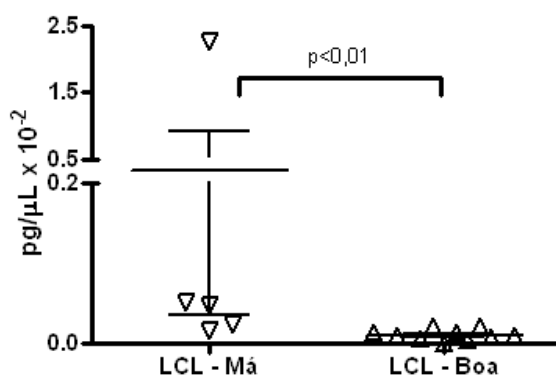


Fig 4.6: Quantificação absoluta do gene Notch1 por PCR em tempo real de material extraído de lesões cutâneas de LTA evidenciando maior expressão nos pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento (LCL - Má). LCL Má n= 5, LCL Boa n=10.

Análises da expressão dos fatores transcricionais T-bet e Gata3 nos fragmentos de lesões cutâneas e mucosas, através de PCR em tempo real, evidenciaram baixa frequência e intensidade de expressão, particularmente de T-bet, que não foi detectado em muitas amostras. No entanto a frequência de amostras com alguma expressão desse fator de transcrição foi maior no grupo que evoluiu com má resposta ao tratamento, quando comparado ao grupo em que se considerou a resposta satisfatória (50% x 25%). Além disso, a razão T-bet/Gata3, também apresentou uma tendência a ser mais elevada nesse grupo ($p=0,066$).

As citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IL-18 estão aumentadas nas lesões dos pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento.

Células marcadas para IL-17 e IL-18 foram observadas com maior frequência nos infiltrados inflamatórios das lesões cutâneas do grupo que evoluiu com má resposta ao tratamento ($p=0,0427$ e $p=0,0337$ respectivamente) (Fig 4.7 e Fig 4.8), enquanto IL-23, outra citocina inflamatória relacionada a ativação de células Th17, não mostrou diferença entre os dois grupos. Células produtoras de TGF β foram observadas com maior frequência nas lesões mucosas, quando comparadas com as lesões cutâneas ($p=0,0028$) (Fig 4.9). Essas diferenças de expressão não foram observadas nas análises de PCR em tempo real para o gene de IL-17. No caso de IL-18 a maioria dos casos teve expressão abaixo do limite de detecção, inviabilizando a comparação entre os grupos (dado não exibido).

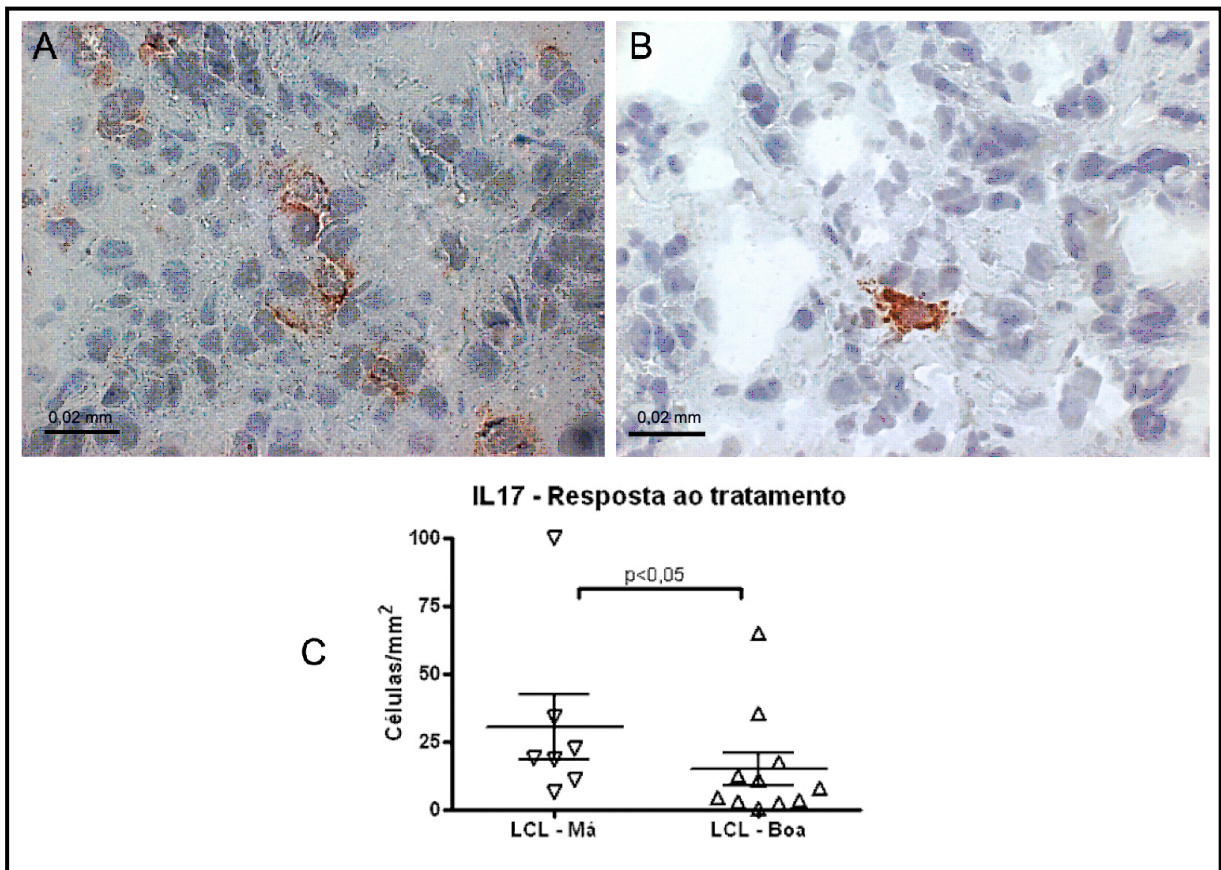


Fig 4.7: Imunohistoquímica de cortes congelados de lesões cutâneas de pacientes com LTA incubados com anticorpo anti-IL-17 e revelados com peroxidase. Imagem representativa de uma amostra de lesão cutânea de paciente que evoluiu com má resposta ao tratamento (A). Imagem representativa de uma amostra de lesão cutânea de paciente que evoluiu com boa resposta ao tratamento (B). Gráfico mostrando o predomínio de células marcadas para IL-17 em lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento (C). Microscopia óptica 100x. LCL Má n= 7, LCL Boa n=11.

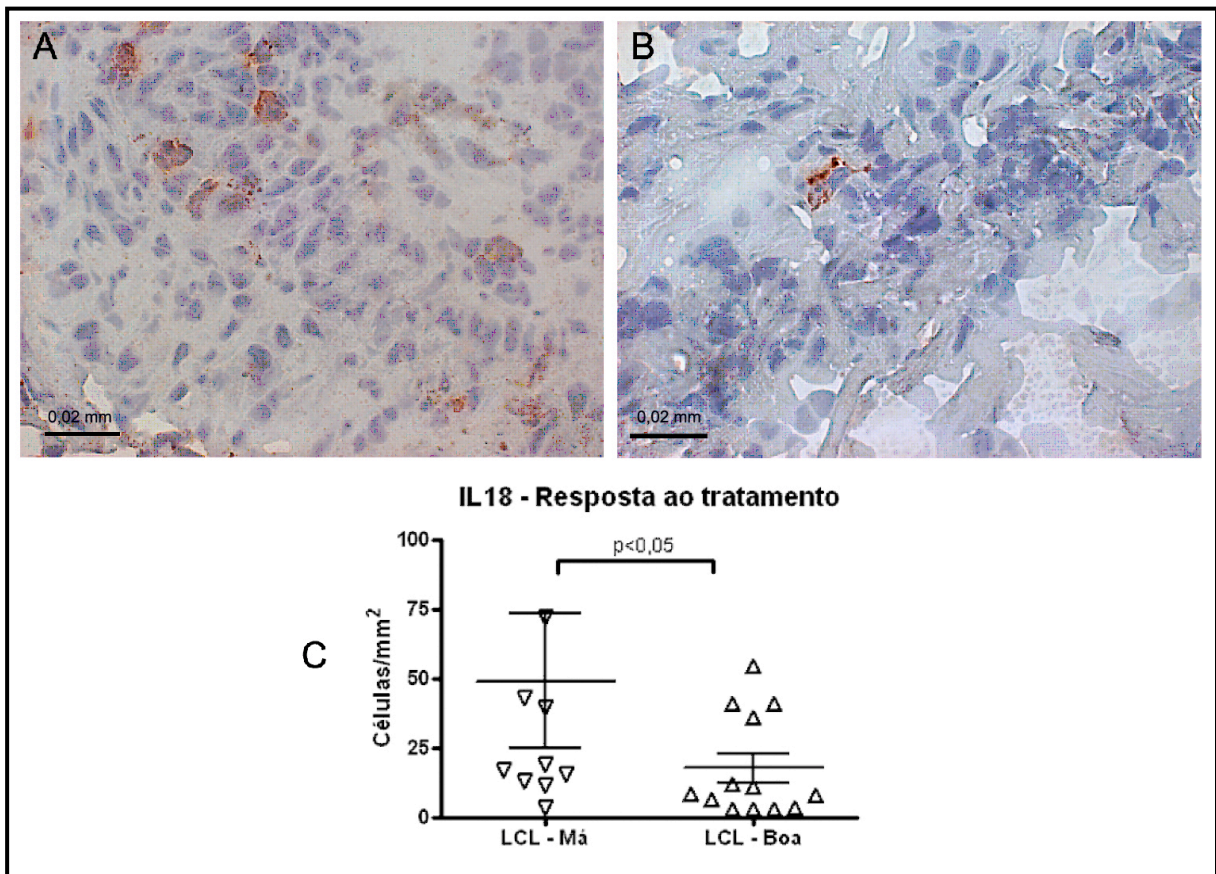


Fig 4.8: Imunohistoquímica de cortes congelados de lesões cutâneas de pacientes com LTA incubados com anticorpo anti- IL-18 e revelados com peroxidase. Imagem representativa de uma amostra de lesão cutânea de paciente que evoluiu com má resposta ao tratamento (A). Imagem representativa de uma amostra de lesão cutânea de paciente que evoluiu com boa resposta ao tratamento (B). Gráfico mostrando o predomínio de células marcadas para IL-18 em lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento (LCL-Má) (C). Microscopia óptica 100x. LCL Má n= 8, LCL Boa n=13.

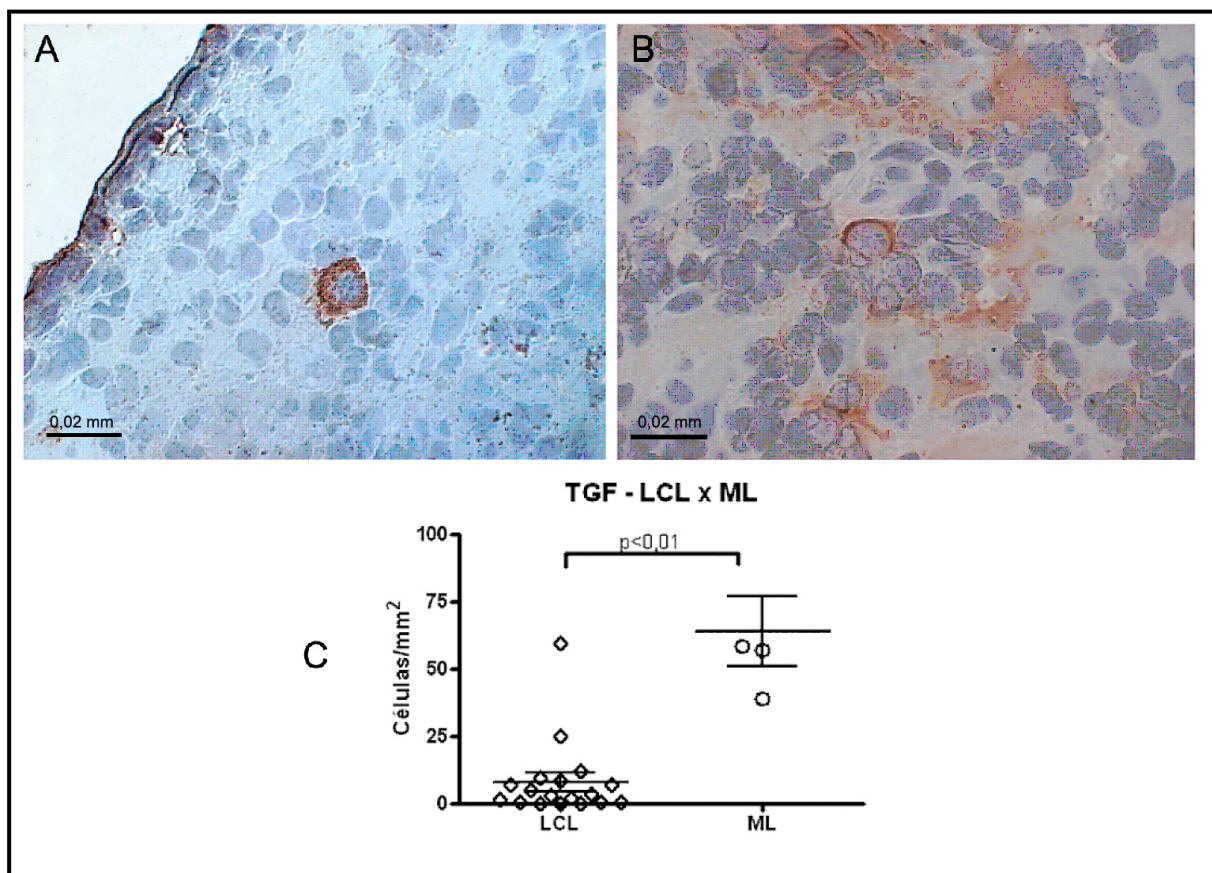


Fig 4.9: Imunohistoquímica de cortes de lesões de LTA incubados com anticorpo anti-TGF- β e revelados com peroxidase. Imagem representativa de uma amostra de lesão cutânea de paciente que evoluiu com boa resposta ao tratamento (A). Imagem representativa de uma amostra de lesão mucosa (B). Gráfico mostrando o predomínio de células marcadas para TGF- β em lesões mucosas (ML) (C). Microscopia óptica 100x. LCL n= 18, ML n=4.

IL-17 e TGF- β são produzidas por células de pacientes com LTA após estímulo com antígeno de *Leishmania*

A pesquisa de produção de IL-17, IL-23 e TGF- β através de ELISA após estímulo com antígeno total de *L. (V.) braziliensis* evidenciou que as células estimuladas produzem quantidades significativamente maiores de IL-17 ($p=0,0189$) e de TGF- β ($p=0,0068$) quando comparadas com o “background” (Fig. 4.10). Não foi observada diferença significativa com relação a IL-23 (dados não exibidos). Não houve diferença com relação à resposta ao tratamento no casos de produção de IL-17.

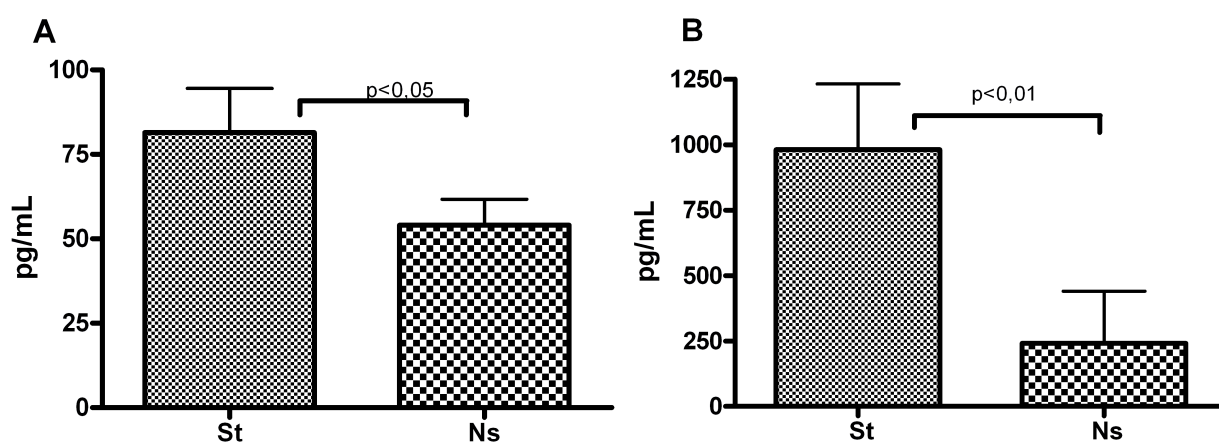


Fig 4.10: Comparação da produção de IL-17 (A) e TGF- β (B) pelo método de ELISA entre células estimuladas e não estimuladas por *L. (V.) braziliensis*, após 72h de incubação. (St = células estimuladas Ns = células não estimuladas . IL17 St n= 6, IL-17 Ns n=6, TGF- β St n=11, TGF- β Ns n= 9.

Células de pacientes com má resposta ao tratamento produzem mais TGF- β que indivíduos que evoluíram satisfatoriamente

Células de pacientes que evoluíram com má resposta produziram mais TGF- β após estímulo com antígeno total de *L. (V.) braziliensis* em comparação com os indivíduos que apresentaram boa resposta ao tratamento ($p < 0,05$). Na comparação entre pacientes com lesão mucosas e os pacientes que tiveram boa resposta ao tratamento não foi observada diferença estatística quando aplicado o teste de comparação entre múltiplas variáveis Kruskal-Wallis, no entanto, quando se aplicou o teste Mann Whitney, houve uma diferença significativa ($p = 0,0159$), sugerindo haver uma tendência a maior expressão também nas lesões mucosas. (Fig 4.11)

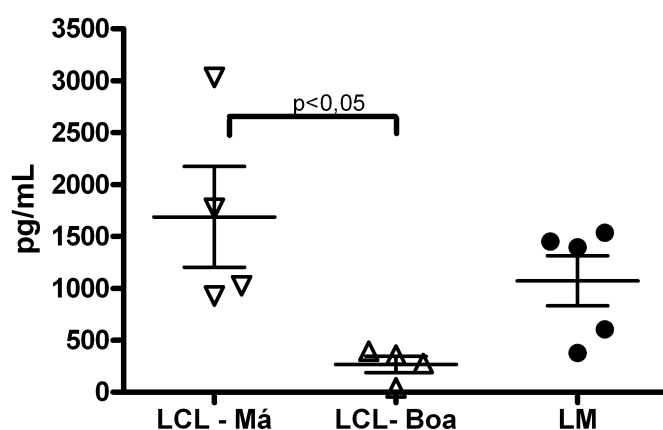


Fig 4.11: Gráfico comparando a produção de TGF β após estímulo com antígeno total de *L. (V.) braziliensis* nos diferentes grupos de pacientes: LCL-Má (lesão cutânea e má resposta ao tratamento n=4), LCL-Boa (lesão cutânea e boa resposta ao tratamento n=4) e LM (lesões mucosas n=5), evidenciando diferença significativa entre os pacientes com lesões cutâneas.

Análise de expressão gênica através de PCR em tempo real evidenciou maior expressão de IL4 nas células estimuladas de pacientes com lesões mucosas.

Foi observada diferença significativa na expressão de IL-17 ($p=0,0264$) e IFN- γ ($p=0,0019$) entre células estimuladas e não estimuladas (Fig 4.12), no entanto sem diferença significativa com relação à resposta ao tratamento. Com relação a IL-4, foi observada maior expressão nas células estimuladas no grupo portador de lesões mucosas em comparação com os pacientes portadores de lesões cutâneas ($p=0,0207$) (Fig 4.13). IL-18 não foi detectada em praticamente nenhum caso por esse método (dados não exibidos).

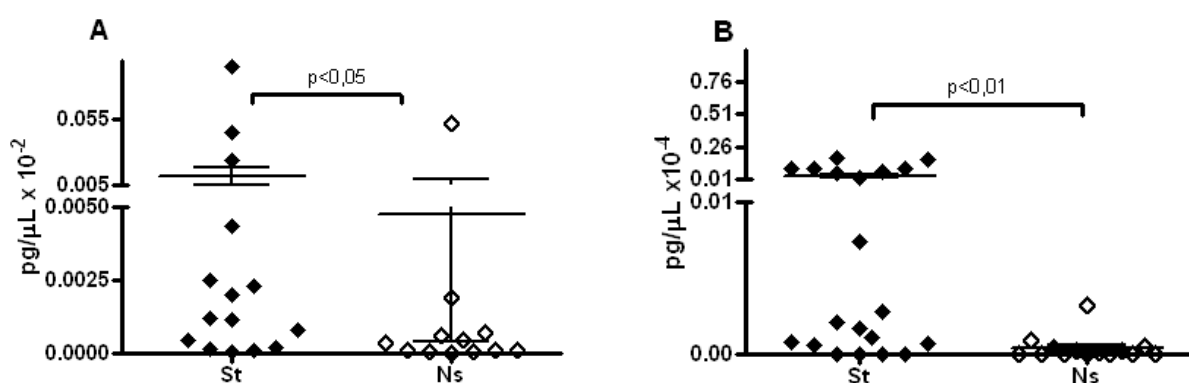


Fig 4.12: Gráfico evidenciando a diferença de expressão gênica de IL-17 (A) e IFN- γ (B) em PBMC submetido a estímulo com *L. (V.) braziliensis* comparado com controles não estimulados de pacientes com LTA (St = estimuladas e Ns não estimuladas). IL-17: St n=15, Ns n=12; IFN- γ : St n= 20, Ns n= 14.

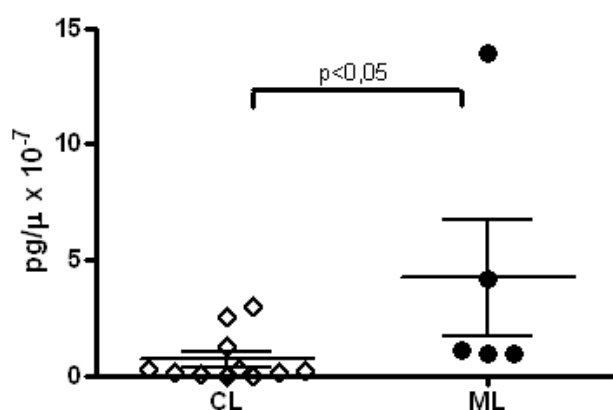


Fig 4.13: Gráfico evidenciando maior expressão gênica de IL-4 em PBMC submetido a estímulo com *L. (V.) braziliensis* em pacientes com lesões mucosas (ML n=5) quando comparados com aqueles portadores de lesões cutâneas (LCL n=11).

DLL4 e Notch3 apresentaram diferença de expressão entre células estimuladas e não estimuladas

DLL4 foi o único ligante estudado a apresentar diferença de expressão entre as células estimuladas e não estimuladas ($p=0,0358$). No entanto sem diferença significativa com relação a resposta ao tratamento (Fig. 4.14).

Notch3 apresentou expressão mais significativa em células estimuladas apenas em pacientes com lesões mucosas ($p=0,0079$) (Fig. 4.15). Não houve diferença significativa com relação a nenhum parâmetro para Notch1, DLL1 e Jagged1 (Anexo 3).

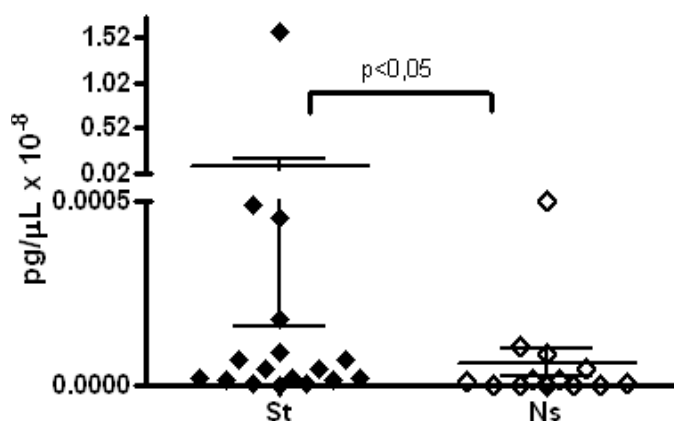


Fig 4.14: Gráfico evidenciando a diferença de expressão gênica de DLL4 em PBMC submetido a estímulo com *L. (V.) braziliensis* comparado com controles não estimulados de pacientes com LTA (St = estimuladas n=18 e Ns não estimuladas n=13).

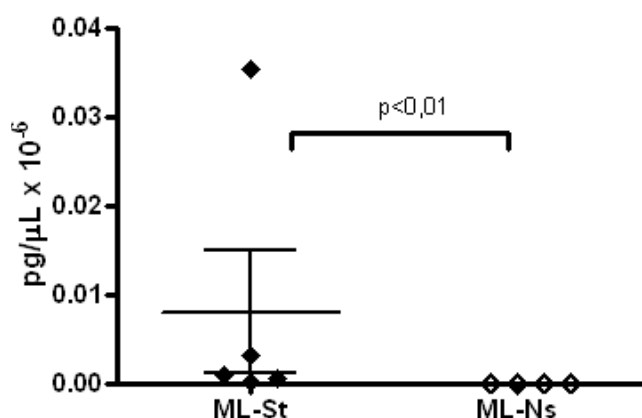


Fig 4.15: Gráfico evidenciando a diferença de expressão gênica de Notch3 em PBMC submetido a estímulo com *L. (V.) braziliensis* comparado com controles não estimulados de pacientes com lesões mucosas de LTA (ML) (St = estimuladas n= 5; Ns = não estimuladas n=4).

O estudo dos fatores transcripcionais T-bet e Gata3 evidenciou uma tendência de maior expressão de T-bet, bem como da razão T-bet/Gata3 em pacientes com má resposta ao tratamento ($p=0,0524$ e $p=0,0688$ respectivamente) (Fig.4.16).

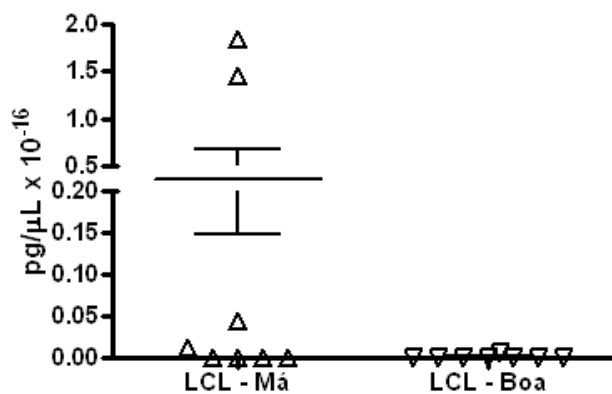


Fig 4.16: Gráfico comparando a diferença de expressão gênica de T-bet entre pacientes com lesões cutâneas de LTA em PBMC submetido a estímulo com *L. (V.) braziliensis* de acordo com a resposta ao tratamento, evidenciando a tendência ao predomínio de T-bet naqueles que evoluíram com má resposta ao tratamento. LCL Má n=7; LCL Boa n=6.

5. DISCUSSÃO

As lesões de leishmaniose cutânea podem evoluir para a cura espontânea (Reithinger *et al.*, 2007), no entanto, quando se considera o caso particular das infecções por *L. (V.) braziliensis* (Costa *et al.*, 1987), a frequência com que isso ocorre é imprevisível, possivelmente menor e seguramente mais arrastada do que na doença observada no Velho Mundo (Oliveira-Neto, 1998) ou na LTA causada por outros agentes (Weigle & Saravia, 1996). Além disso, o indivíduo acometido está sob o risco de surgimento da lesão metastática na mucosa, que, embora ocorra em menos de 5% dos casos (Marsden, 1986; Davies *et al.*, 2000), apresenta alto grau de morbidade, não havendo fatores preditivos determinantes de sua ocorrência, o que faz com que, uma vez que a LTA seja diagnosticada, haja prioridade para início imediato da terapêutica (Oliveira-Neto, 1998).

A utilização de antimoniatos de meglumina, nas doses e tempo preconizados, muitas vezes implica em uma logística complexa, em virtude do local de residência ou do risco de potenciais efeitos colaterais. Como alternativa, a experiência terapêutica no Rio de Janeiro (Oliveira-Neto *et al.*, 1996; Oliveira-Neto *et al.*, 1997; Oliveira-Neto *et al.*, 1997; De Oliveira-Neto *et al.*, 2006) utilizando esquemas com doses baixas e intra-lesionais de antimônio não observou diferença na evolução clínica, quando comparados com as doses usuais (Mattos, 2004). No entanto, independente do esquema empregado, há um grupo de pacientes cuja evolução é mais arrastada, que acabam por demandar tratamentos mais prolongados, ou repetição de esquemas terapêuticos. A descoberta de fatores preditivos da evolução para formas clínicas mais graves, de resolução mais lenta ou associadas a lesões mucosas seria muito interessante, pois permitiria estabelecer protocolos de terapia diferenciados com relação à agressividade dos esquemas, diminuindo a exposição dos doentes aos efeitos colaterais dos medicamentos, aumentando assim a adesão ao tratamento e possivelmente melhorando os índices de cura.

A avaliação clínica inicial não permite a identificação desse grupo de pacientes. Embora alguns sinais, como eritema localizado simultaneamente no centro e na borda da lesão, possam ser associados ao mau prognóstico (Mattos, 2004), parâmetros inequívocos ainda não foram estabelecidos. A observação de aspectos *in situ*, que pudessem ser acoplados aos clínicos, contribuiria de forma significativa nessa avaliação.

Considerando que todos os pacientes com diagnóstico de LTA são submetidos ao tratamento sistêmico (excepcionalmente intra-lesional) e que a imensa maioria acaba respondendo ao tratamento, estabelecemos como parâmetro de prognóstico a resposta ao tratamento. Os dados clínicos foram obtidos através dos registros médicos para que fosse feita correlação com os achados do estudo (fragmentos de biópsia congelados ou PBMC). O

controle de cura tendo como base critérios eminentemente clínicos na LTA (Oliveira-Neto *et al.*, 2000) pode ser considerado subjetivo, no entanto, avaliação evolutiva ou de cura através de análises laboratoriais das lesões, embora utilizada em alguns estudos clínicos (Schubach *et al.*, 1998; Amato *et al.*, 2003; Vergel *et al.*, 2006), não se justifica na rotina ambulatorial. A validação de parâmetros de cura e prognóstico, como estudado por Mattos (2004), associada à documentação rigorosa das avaliações clínicas, torna mais objetivo o acompanhamento da resolução e cura das lesões durante e após o tratamento.

No presente estudo, buscando alterações que pudessem ser detectadas nas lesões iniciais, a primeira observação significativa foi a detecção dos receptores Notch1 expressos de forma exacerbada na epiderme das lesões cutâneas, quando comparados com a pele normal. Nessa localização não foi observada diferença quanto a evolução clínica entre os pacientes. A presença desse receptor na epiderme era esperada uma vez que, não apenas Notch1, mas as outras proteínas do sistema Notch são encontradas na epiderme humana normal, distribuídas ao longo das camadas da epiderme (Blanpain *et al.*, 2006; Watt *et al.*, 2008) e atuando de forma expressiva na homeostase desse tecido, principalmente através do controle dos processos de diferenciação celular, mas também na manutenção de células indiferenciadas das camadas basais e dos anexos (Rangarajan *et al.*, 2001; Nickoloff *et al.*, 2002; Blanpain *et al.*, 2006). Apesar de os 4 receptores serem encontrados na epiderme, Notch1 parece ter o papel mais significativo, uma vez que a inativação de cada um dos outros 3 receptores isoladamente não afeta o processo de diferenciação como ocorre com Notch1 (Watt *et al.*, 2008).

Estudos avaliando a hiper-expressão de Notch na epiderme de camundongos evidenciam o espessamento das camadas da epiderme, acompanhado da perda do caráter de impermeabilidade do tecido (Ambler & Watt, 2010). Por outro lado, experimentos inibindo a atividade de Notch na epiderme de camundongos também observaram hiperproliferação das camadas, sem alterações de permeabilidade e, em alguns casos, evoluindo com alterações neoplásicas caracterizadas pelo desenvolvimento de carcinoma de células basais e espinhoso (Nicolas *et al.*, 2003; Proweller *et al.*, 2006; Demehri *et al.*, 2009). Estudos realizados em culturas de células de carcinomas de células basais humanas reforçam a correlação dos receptores com neoplasias de pele, uma vez que estas células têm menor expressão de Notch1, Notch2 e Jagged1, quando comparadas com a pele normal. (Thélu *et al.*, 2002), sugerindo a possibilidade de que na epiderme o sistema Notch tenha um efeito protetor quanto ao desenvolvimento de neoplasias (Koch & Radtke, 2007). Esses achados contrariam o papel atribuído a esse receptor na maioria dos tecidos, nos quais a hiperexpressão de Notch está relacionada ao desenvolvimento de neoplasias, como no caso dos tumores sólidos de mama, pâncreas, pleura, orofaringe, colon, melanomas, além das leucemias (Nickoloff *et al.*, 2003;

Koch & Radtke, 2007). Em outras lesões de características hiperproliferativas na pele, como a psoríase, também se observa menor expressão de Notch1, que retorna aos níveis habituais após o tratamento (Thélu *et al.*, 2002).

Considerando o aspecto hiperproliferativo das lesões de LTA caracterizado por intensa acantose, algumas vezes com hiperplasia pseudoepiteliomatosa associada a hiperkeratose e parakeratose, além de processos degenerativos e atróficos nas células basais (Ridley *et al.*, 1980; Ridley, 1980; Grevelink *et al.*, 1996), é possível que haja correlação entre o aumento dos receptores Notch1 e o processo de proliferação tecidual observado. No entanto, é provável, pela avaliação do papel atribuído a esse receptor em outras patologias da pele, em comparação com a observação de maior expressão de Notch1 na pele de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento, que na LTA a atuação do sistema Notch seja distinto do observada nas lesões neoplásicas, ou na psoríase.

O ligante DLL1 foi detectado na camada basal da epiderme através de hibridização *in situ* e técnicas de biologia molecular (Lowell *et al.*, 2000; Thélu *et al.*, 2002). Na presente avaliação, foi observado apenas no infiltrado dérmico e, nas amostras de pele normal, estava abaixo do limite de detecção através da técnica de PCR em tempo real. Isso pode ser explicado por diferenças nas técnicas empregadas, mas é importante ressaltar que mesmo nos estudos onde se esse ligante foi detectado na epiderme, isso ocorreu de forma irregular, incluindo casos nos quais também não foi detectado (Lowell *et al.*, 2000; Thélu *et al.*, 2002). A ação de DLL1, na epiderme, está relacionada às etapas iniciais de diferenciação (Talora *et al.*, 2008), embora quando sua expressão esteja aumentada, tenha um efeito protetor nas células indiferenciadas da camada basal (“stem cells”), que se agrupam de forma coesa, permanecendo sem diferenciação. Por outro lado, as células presentes nas bordas desse agrupamento seguem o processo de diferenciação para camadas superiores (Lowell *et al.*, 2000; Watt *et al.*, 2008).

A observação concomitante de que há aumento do número de células expressando Notch1 e DLL1 no infiltrado inflamatório dos pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento sugere que a atuação, pelo menos em parte, possa ser no sentido de retardar a resolução das lesões, uma vez que DLL1 pode estar relacionado a manutenção de células basais em seu estado indiferenciado. Os tipos celulares que foram detectados expressando DLL1 no presente estudo não foram identificados, mas considerando a íntima relação entre as células da derme e das camadas basais, não pode ser descartada a influência nos queratinócitos levando a um retardo no processo de epitelização das lesões cutâneas dos pacientes com má resposta ao tratamento. Estudos de natureza funcional, envolvendo queratinócitos, além de outros tipos celulares potencialmente associados ao processo

inflamatório intra-lesional, são essenciais para a compreensão desse fenômeno e corroborar essa hipótese.

DLL4, o outro ligante Delta-like estudado, embora seja com mais frequência relacionado a processos de diferenciação do tecido endotelial (Iso *et al.*, 2003; Limbourg *et al.*, 2005; Harrington *et al.*, 2008) e não ser mencionado nos trabalhos envolvendo a epiderme, foi encontrado nas camadas de epiderme normal e em lesões de LTA, sem diferença significativa quanto à intensidade de expressão, exceto por uma tendência ao predomínio na epiderme dos indivíduos que evoluíram com má resposta ao tratamento. Fato coerente com os achados referentes a DLL1 e reforçando a correlação entre essa via de ativação e a evolução observada nesse grupo de pacientes.

No estudo de Ambler e Watt (2010), que avaliou o aumento da expressão de Notch no epitélio de camundongos, foi observado que, além do espessamento da epiderme, havia acúmulo, na derme, de linfócitos T, células neuronais, além de células positivas para marcadores de crista neural na derme. Considerando que vários tipos celulares estão presentes no infiltrado inflamatório das lesões de LTA, predominando macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Ridley, 1980; Ridley & Wells, 1986), com participação também de células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos, além de graus variáveis de reação granulomatosa (Ridley, 1980), é possível que o aumento de receptores Notch1 possa contribuir com o aporte e a função de alguns tipos celulares, o que poderia estar ocorrendo de forma exacerbada no grupo de pacientes que evoluiu com pior resposta ao tratamento e contribuindo de alguma maneira com o retardo na resolução.

A hiperexpressão de Notch provocada na epiderme de camundongos também foi associada ao aumento de ligantes do tipo Jagged, que em associação com TNF- α , foi responsabilizado pelo aumento de permeabilidade observada (Ambler & Watt, 2010). No presente estudo os ligantes Jagged1 foram observados distribuídos ao longo das camadas supra-basais como já havia sido descrito previamente (Nickoloff *et al.*, 2002; Watt *et al.*, 2008), mas também encontrados de forma difusa na derme. Nesse caso, algumas vezes de forma intensa, dificultando a individualização de células marcadas. Esse fato foi atribuído à capacidade desse ligante adquirir a forma solúvel, mantendo ação moduladora sobre os receptores Notch de queratinócitos (Aho, 2004; Ambler & Watt, 2010) e de outros tipos celulares como de fibroblastos presentes na derme (Urs *et al.*, 2008). Não foi observada diferença de expressão entre a pele normal e as lesões, sugerindo a possibilidade de que o papel fisiológico de Jagged1, relacionado às etapas finais do processo de diferenciação, seja mantido (Nickoloff *et al.*, 2002) e que possa, inclusive, estar atuando no processo de cicatrização das lesões de LTA. Estudos avaliando a importância do sistema Notch nos

processos de cicatrização ressaltam o ligante Jagged1 como o principal responsável por ativação de Notch1, nesse sentido.

A maioria dos trabalhos avaliando a participação desse sistema na cicatrização demonstraram a relação dos receptores Notch1 nesse processo principalmente através de influência na angiogênese, na migração e ativação de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos e na atividade de fibroblastos e queratinócitos. Nesse sentido, a deficiência de Notch estaria relacionada a um retardo no processo de cicatrização (Chigurupati *et al.*, 2007). No entanto, mais recentemente, outro estudo, enfatizando o aspecto inflamatório das lesões, observou que, na deficiência desse receptor, o processo inflamatório gerado principalmente por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ é menos intenso, sugerindo a possibilidade de que o dano tecidual que antecede a cicatrização possa ser diminuído nesses casos, podendo em última análise ter efeito benéfico (Outtz *et al.*, 2010). O estudo de Chigurupati (2007) nos permite supor que o aumento de Notch1 nas lesões cutâneas de LTA também poderia representar uma resposta à infecção, contribuindo para a resolução e cicatrização, no entanto, os achados de Outtz (2010) reforçam a relação da hiperexpressão de Notch com aumento de resposta inflamatória e possivelmente com o dano tecidual observado. É possível que, à semelhança do que ocorre com as citocinas inflamatórias, a participação na resolução ou na persistência das lesões seja uma questão de intensidade de expressão, ou mesmo relacionada ao tipo de ativação que predomine no microambiente da lesão.

O sistema de sinalização Notch também está relacionado à diferenciação de linfócitos T, dependendo do ligante usado para ativar o receptor (ArtavanisTsakonas *et al.*, 1999; Osborne & Minter, 2007; Radtke *et al.*, 2010). Ativação por ligantes do tipo Delta-like levam ao desenvolvimento de células Th1 e Th17 enquanto ligantes Jagged geram células Th2 e Treg (Osborne & Minter, 2007; Radtke *et al.*, 2010). Há ainda autores que associam a presença de ligantes Delta-like à maturação de linfócitos T CD8 citotóxicos (Cho *et al.*, 2009).

Os infiltrados inflamatórios de indivíduos que evoluíram com má resposta ao tratamento evidenciaram, além do aumento de Notch1 e DLL1, a expressão das citocinas IL-17 e IL-18 de forma exacerbada. IL-17, produzida pela linhagem de células Th17, descritas mais recentemente como um terceiro grupo de células efectoras da linhagem T *helper*, está associada à intensa reação inflamatória em diferentes tecidos, em virtude da ampla distribuição dos receptores específicos (Korn *et al.*, 2007). Para a diferenciação dessa linhagem celular é essencial a presença de IL-6 e também TGF- β (AcostaRodriguez *et al.*, 2007; Manel *et al.*, 2008), mas para ativação e manutenção da produção de IL-17 é importante a presença de IL-23 (Veldhoen *et al.*, 2006; Volpe *et al.*, 2008). Esse grupo de células foi

inicialmente associado aos processos de inflamação tecidual em doenças auto-imunes (Korn *et al.*, 2009; Damsker *et al.*, 2010), mas gradualmente sua relação com doenças infecciosas vem sendo estabelecida. Já foi comprovado seu efeito protetor em doenças fúngicas, principalmente causadas por *Candida* sp, (Eyerich *et al.*, 2008; Conti *et al.*, 2009; VanDeVeerdonk *et al.*, 2009) e em infecções bacterianas causadas por *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citobacter rodentium* e *Salmonella* sp (VanDeVeerdonk *et al.*, 2009). Em infecções bacterianas causadas por *Borrelia* sp, sua ação parece contribuir com a fisiopatogenia da doença, agravando a artrite associada a infecção (Kotloski *et al.*, 2008). Nas infecções por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* contribui com o desenvolvimento de imunidade duradoura contra esses agentes (Umemura *et al.*, 2007; Okamoto *et al.*, 2010). Com relação às infecções virais, apesar de ser detectada em níveis elevados em infecções por vírus da Hepatite C e Hepatite B, seu papel ainda está por ser estabelecido (VanDeVeerdonk *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010). A relação dessa citocina em infecções por protozoário vem sendo descrita recentemente. Em infecções experimentais por *Toxoplasma gondii* em camundongos parece ter efeito protetor, mas também contribuir com o grau de lesão hepática e intestinal observada (Kelly *et al.*, 2005). A supressão da diferenciação de células Th17 parece ter sido benéfica em infecções experimentais por *Trypanosoma cruzi* (Hamano *et al.*, 2003), embora a ausência de IL-17 esteja relacionada a aumento da parasitemia e letalidade (Miyazaki *et al.*, 2010). Na leishmaniose humana, o efeito protetor de IL-17 foi demonstrado na doença visceral causada por *Leishmania donovani* (Pitta *et al.*, 2009), no entanto em infecções causadas por espécies dermatrópicas como *L. major*, as células Th17 parecem contribuir com a persistência do processo inflamatório (Anderson *et al.*, 2009; LopezKostka *et al.*, 2009). A presença de IL-17 em lesões de pacientes com LTA foi demonstrada (Bacellar *et al.*, 2009; Boaventura *et al.*, 2010), no entanto, sem correlação dessa citocina com prognóstico. No presente estudo, a maior expressão de IL-17 nas lesões de pacientes que apresentaram pior resposta ao tratamento sugere que essa citocina, além de estar presente nas lesões, parece contribuir para a persistência da inflamação, dificultando a resposta ao tratamento, à semelhança do que foi descrito nas infecções por *L. major*. No sangue periférico, as células dos pacientes com LTA produzem IL-17 como resposta ao estímulo com antígenos de *L. (V.) braziliensis*, embora sem diferença quanto à resposta ao tratamento. Esse dado sugere que fatores intra-lesionais possam estar modulando a expressão e o comportamento dessa citocina.

O aumento de IL-18 no grupo de pacientes com má resposta reforça a correlação dos fatores que aumentam a resposta inflamatória com pior evolução. IL-18 é uma potente citocina inflamatória da família de IL-1 (Wittmann *et al.*, 2009), indutora de IFN- γ , que

normalmente é produzida por macrófagos ativados, mas que também pode ser produzida por queratinócitos em processos inflamatórios ou infecciosos (Naik *et al.*, 1999; Lebre *et al.*, 2003). Paradoxalmente, no entanto, em algumas circunstâncias essa citocina pode induzir uma resposta do tipo Th2 por estimular a produção de IL-4, IL-13 e IL-10 (Mullen *et al.*, 2006). Sua participação já foi estudada em algumas doença infecciosas. Em infecções bacterianas associadas a septicemia, o bloqueio de IL-18 parece ter efeito protetor nos danos teciduais causados por endotoxinas (Dinarello, 2003). Em doenças por protozoários seu efeito protetor foi constatado em infecções causadas por *Toxoplasma gondii* (Cai *et al.*, 2000) e por *L. donovani*, nesta última sem influência na resposta ao tratamento com antimoniais (Mullen *et al.*, 2006). Em infecções experimentais causadas por *L. major* observou-se susceptibilidade à infecção em camundongos incapazes de produzir IL-18 (Wei *et al.*, 1999). Em patologias inflamatórias da pele tem-se observado uma maior expressão dessa citocina, quando comparadas à pele normal, indicando a possibilidade de sua utilização como alvo terapêutico (Wittmann *et al.*, 2009). No presente estudo observamos maior expressão de IL -18 em indivíduos com resposta menos satisfatória ao tratamento, sugerindo que essa citocina também possa estar contribuindo para a reação inflamatória mais prolongada nesses pacientes.

Os achados obtidos através de PCR em tempo real do material das lesões para essas duas citocinas não corroboraram as observações da imunohistoquímica. Este fato pode ser explicado tanto pela degradação precoce do RNA-m (Hamilton *et al.*, 2010), quanto pelos baixos níveis de detecção dessas citocinas nos fragmentos de biópsias congelados que foram estudados, com valores próximos ao nível de ruído (“background”) do experimento (ct - “cycle threshold” - acima de 30), dificultando a comparação confiável entre os grupos. No caso de IL-17, nas análises de PBMC foram evidenciados níveis de detecção mais elevados, permitindo comparações confiáveis e reproduzindo o padrão observado no ELISA com relação à diferença de expressão nos diferentes grupos de pacientes.

O achado concomitante de Notch1, DLL1 e IL-17 pode sugerir uma associação entre esses fenômenos, uma vez que a ativação de Notch1 por ligantes Delta-like está associada ao processo de diferenciação de linfócitos Th17. O fato de não haver diferença nas análises de IL-23 falam a favor de uma via de ativação de células Th17 distinta da habitual, no entanto, estudos subseqüentes analisando IL-6, principal fator responsável pela diferenciação dessas células, poderiam contribuir para a compreensão da participação de IL-17 nesse processo. Considerando que o processo de ativação do sistema Notch através de ligantes do grupo Delta-like ocorre mediado pelo fator de transcrição T-bet, a observação de que há uma tendência de a razão T-bet/GATA3 estar aumentada nos tecidos e nas células de sangue periférico, no grupo de pacientes que evoluiu com má resposta ao tratamento, é mais um dado

que aponta na direção de que esse sistema possa estar envolvido na ativação e diferenciação de linfócitos nas linhagens Th1 ou até mesmo Th17 na LTA.

O sistema de sinalização Notch, como exposto previamente, independente de sua participação no desenvolvimento dos diferentes fenótipos de linfócitos T helper, influencia os processos de epitelização, bem como a cicatrização de feridas (Thélu *et al.*, 2002; Chigurupati *et al.*, 2007; Outtz *et al.*, 2010), o que isoladamente justificaria o aumento dessas proteínas, inclusive como resposta ao processo inflamatório. Estudos subsequentes de caráter funcional são fundamentais para esclarecimento das relações de causa e efeito entre essas proteínas e o processo inflamatório das lesões de leishmaniose.

A análise das lesões mucosas tendo como base os achados das lesões cutâneas não corresponde ao modelo ideal, mas tem sido utilizado por vários autores (Barral *et al.*, 1987; Barral *et al.*, 1995; Bacellar *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007). A comparação com mucosa nasal normal poderia ser uma alternativa, no entanto, esse material não é fácil de ser obtido e não responderia necessariamente às questões com relação à fisiopatogenia da doença. Considerando que os mecanismos imunológicos associados à lesão mucosa (Pirmez, 1992; Carvalho *et al.*, 2007) ou à persistência e maior tamanho das lesões cutâneas (Antonelli *et al.*, 2005) são semelhantes, variando na intensidade e presença ou não de fatores modulatórios, a análise das lesões mucosas em comparação com as lesões cutâneas nos pareceu adequada.

Nas lesões mucosas foi observado aumento dos ligantes Delta-like em associação com o receptor Notch3, prevalecendo sobre Notch1, que tem participação mais significativa nas lesões cutâneas. Isso pode ser explicado unicamente pelo fato de que a distribuição de Notch3 nos tecidos é mais restrita que a do análogo Notch1 (Bellavia *et al.*, 2008). Entretanto, algumas correlações estruturais denotam a importância particular desse receptor nessa localização. Durante a embriogênese, Notch3 se relaciona ao desenvolvimento do epitélio olfatório (Doi *et al.*, 2004), à diferenciação de células musculares dos vasos (Domenga *et al.*, 2004) e já foi descrito como um dos marcadores de células mesenquimais (Kaltz *et al.*, 2010). Considerando as características da mucosa e a proximidade com o epitélio olfatório, parece coerente o predomínio de Notch3 nessas lesões. As lesões mucosas são causadas por parasitas que migram para o epitélio respiratório através de vasos sanguíneos e linfáticos. A razão da preferência por esse local é desconhecida, mas supõe-se que fatores intrínsecos favoreçam a colonização. Citocinas relacionadas à resposta Th2 estão presentes na mucosa normal (Daynes *et al.*, 1990), possivelmente facilitando a colonização e se relacionando à cronicidade típica desse tipo de apresentação, uma vez que são detectadas em maior intensidade nas lesões mucosas (Pirmez *et al.*, 1993). Esse dado foi mais uma vez corroborado através da observação

de que nas células de pacientes com lesão mucosa, após estímulo com antígenos de *Leishmania* havia maior expressão de IL-4.

O dano na mucosa também está associado à não regulação de citocinas Th1 (Pirmez *et al.*, 1990; Faria *et al.*, 2005), nesse sentido o aumento de expressão tanto de DLL1, quanto de DLL4 pode se relacionar à ativação do sistema Notch no sentido do desenvolvimento de resposta Th1 ou Th17. A maior produção de citocinas de padrão Th1 como IFN- γ e TNF- α (Bacellar *et al.*, 2002), além da presença de IL-17 nas lesões mucosas já foi observada (Boaventura *et al.*, 2010). No presente estudo não foi observada diferença na expressão de IL-17 entre as lesões mucosas e cutâneas.

Altos níveis de TGF- β também foram observados na mucosa, reforçando os achados de Barral *et al.* (1995). A presença dessa citocina poderia representar uma tentativa de conter a reação inflamatória, no entanto, a evidência de que esse efeito supressor sobre INF- γ está reduzido em pacientes com LTA (Bacellar *et al.*, 2002), associada à relação de TGF- β com a redução de atividade citotóxica de macrófagos (BarralNetto *et al.*, 1995), sugere que a presença dessa citocina pode contribuir para a persistência da infecção e conseqüentemente contribuir com a cronicidade da lesão mucosa. Curiosamente, TGF- β , em associação com IL-6, induz a diferenciação de linfócitos Th17. Essa relação aparentemente contraditória, em virtude da associação de TGF- β com a diferenciação de células T-regulatórias, pode representar o elo de ligação entre essas duas linhagens de células T, que com frequência compartilham lados diferentes dos mesmos processos (Korn *et al.*, 2009), como é, inclusive, o caso das lesões de LTA.

As células de PBMC dos pacientes estudados produziram TGF- β como resposta à estimulação com antígeno total de *Leishmania (V.) braziliensis*. Além disso, a produção de TGF- β foi mais expressiva em indivíduos que apresentaram má resposta e naqueles com lesão mucosa, confirmando os achados das análises das lesões mucosas e reforçando a participação dessa citocina nos processos regulatórios que favorecem a persistência da inflamação.

Outro aspecto que deve ser considerado, à semelhança do discutido com relação às lesões cutâneas, é a participação do sistema Notch no processo de lesão mucosa através de outros mecanismos de ação tecidual. DLL4, em particular, também está envolvido na angiogênese, inibindo células endoteliais (Jakobsson *et al.*, 2009) e influenciando a expressão de receptores para o fator de crescimento endotelial - VEGF (Williams *et al.*, 2006). Além disso, quando desregulado, pode levar a alterações patológicas das células endoteliais (Yan *et al.*, 2010). Considerando que a mucosa nasal se caracteriza por uma densa rede de capilares com fenestrações entre as células endoteliais e anastomoses arteriovenosas (Widdicombe, 1997) e que a presença de vasculite de pequenos vasos dérmicos é achado frequente nas

lesões (Oliveira-Neto, 1998), é possível que, além da ação relacionada ao sistema imune, os ligantes DLL4 possam ter alguma relação com o dano vascular observado nas lesões mucosas.

Com relação à análise da expressão gênica de proteínas do sistema Notch nas células de PBMC dos pacientes com LTA, houve diferença significativa entre células estimuladas e não estimuladas apenas para DLL4, e no caso das células de pacientes com LM também para Notch3. Tanto Notch3 quanto DLL4, receptor e ligante, são expressos de forma mais significativa nas lesões mucosas. Considerando o aspecto metastático dessas lesões, é interessante observar que os fatores que se mostraram significativos nas células estimuladas, também se destacaram nas lesões mucosas, ao contrário das lesões cutâneas, nas quais as correlações observadas *in situ* não se reproduziram no sangue periférico, sugerindo mais uma vez que, nas lesões cutâneas, a interferência de fatores locais possa ter papel determinante nos mecanismos de regulação de expressão ou atividade dessas proteínas.

O desenvolvimento da doença clínica na LTA, bem como o prognóstico e a resposta terapêutica, dependem da complexa interação entre fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro como tamanho do inóculo, sensibilidade a drogas e imunidade inata. O papel de citocinas Th1, com destaque para IFN- γ , é bem conhecido no controle da infecção, quando se avalia principalmente a carga parasitária, no entanto a doença progride e lesões extensas e graves se desenvolvem mesmo na presença dessa citocina. IL-10 e TGF- β facilitam a proliferação do parasita (Faria, *et al.*, 2005; Campanelli *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2007), permanecendo elevados em pacientes que reativam (Carvalho *et al.*, 2007) e em lesões de pacientes que apresentam má resposta ao tratamento, como descrito recentemente (MarettiMira *et al.*, 2010). Nesse processo de interação complexo é provável que outras citocinas estejam envolvidas tanto na resolução quanto no aumento da inflamação nas lesões. Além disso, deve ser levado em conta que os queratinócitos se tornam imunologicamente ativos na maioria dos processos inflamatórios da pele (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1992) e que as células T interagem diretamente com a epiderme em lesões de *Leishmania* sp (Isaza, *et al.*, 1996). Nesse sentido a expressão de receptores Notch1 e DLL1 nas lesões de pacientes com má resposta ao tratamento, sem correlação com as células de sangue periférico, sugere que esse sistema possa ter papel determinante como fator intra-lesional na LTA, atuando em diferentes tipos celulares. A alta expressão dessas proteínas nas lesões dos pacientes que evoluíram com pior resposta ao tratamento, associada ao aumento das citocinas IL-17 e IL-18, nos permite sugerir que esses fatores sejam considerados possíveis marcadores de prognóstico e que, quando presentes em altos níveis, possam indicar os pacientes que demandem uma abordagem terapêutica mais agressiva ou um pelo menos um acompanhamento mais minucioso.

Outro aspecto a ser considerado é a inclusão das proteínas do sistema Notch, ou mesmo estas citocinas, como possíveis alvos terapêuticos. Agentes inibidores de Notch, atuando na enzima γ -secretase, têm sido investigados como alternativas para tratamento de câncer em função do fato de que, quando desregulado, esse sistema se relaciona à inibição de apoptose de células cancerígenas, bem como à homeostase de outros tipos celulares que podem influenciar a progressão tumoral e compõe o estroma, como células endoteliais e fibroblastos, além de queratinócitos (Rizzo *et al.*, 2008). Considerando que a LTA é uma doença que afeta prioritariamente a pele, essa possibilidade deve ser analisada com cautela, uma vez que, ao contrário da maioria dos tecidos, na epiderme a presença de Notch foi considerada protetora com relação ao desenvolvimento de neoplasias. (Koch & Radtke, 2007). A observação preliminar com relação às lesões de LTA, no entanto, evidencia um padrão mais próximo do observado nos outros tecidos, nos quais se associa o aumento de expressão de Notch com doença, em um contexto que pode envolver não apenas células do sistema imune, mas fatores intra-lesionais associados a neovascularização, ativação de fibroblastos e proliferação de queratinócitos, todos potencialmente envolvidos tanto na progressão da doença quanto na resolução da lesão, em um contexto similar ao que ocorre em lesões cancerígenas.

Considerando as dificuldades para o tratamento da LTA, principalmente em relação à posologia e efeitos adversos do antimonialto de meglumina, a descoberta de medicamentos que pudessem ser utilizadas em conjunto, ou mesmo substituir os antimoniais, seria útil tanto para diminuir os riscos de efeitos colaterais quanto para aumentar a eficácia do tratamento. Nesse sentido, a descoberta de que o sistema Notch possa estar influenciando na evolução da lesões de LTA inclui esses receptores no grupo de possíveis candidatos. No entanto, a abrangência de funções desse sistema, que vem desde a embriogênese e segue pela vida adulta interferindo em processos decisórios de inúmeros tecidos, associada ao efeitos observados em estudos experimentais na epiderme, impõe cautela na escolha dessas proteínas como alvos terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

Os achados desse estudo demonstram primeiramente o aumento de expressão de proteínas do sistema Notch nas lesões de pacientes com LTA. Os receptores Notch1 nas lesões cutâneas e Notch 3 nas lesões mucosas em associação com ligantes da linhagem Delta-like (DLL1 e DLL4).

A concomitância de expressão de receptores Notch1 nas lesões de pele e Notch 3 nas lesões mucosas associados ao ligantes Delta-like em pacientes que evoluíram com má resposta e nas lesões mucosas sugere uma correlação entre essa via de ativação e o pior prognóstico.

O aumento de IL-17 e IL-18 associados à má resposta ao tratamento amplia a possibilidade de envolvimento de citocinas inflamatórias fora do eixo IFN- γ /TNF- α , com os processos de resolução/dano tecidual das lesões cutâneas de LTA. A contribuição de IL-17 ao dano tecidual em doenças auto-imunes já está bem estabelecido, sendo possível haver um comportamento semelhante nas lesões de LTA.

A resposta das células de sangue periférico ao estímulo com antígeno total de *L. braziliensis* ressalta a importância de IL-17 e TGF- β na LTA, com ênfase no papel de TGF- β nos pacientes que evoluíram com má resposta e naqueles com lesão mucosa.

A análise de expressão gênica em PBMC dos pacientes com LTA evidenciou uma maior expressão de Notch3 e do ligante Delta-like DLL4 nas células estimuladas, destacando os fatores que também estão aumentados nas lesões mucosas.

Nas células de indivíduos com LM foi observada maior expressão de IL-4 coerente com os achados de estudos anteriores analisando a expressão de IL-4 nas lesões mucosas.

Embora a expressão dos receptores Notch seja considerada como fator de proteção em doenças neoplásicas da pele, a presença dos receptores Notch em associação com os ligantes Delta-like (DLL1 e DLL4) e também de IL-17 e IL-18 expressos de forma mais intensa nas lesões de pacientes que evoluíram com má resposta ao tratamento, sugerem que na LTA a atuação do sistema Notch seja distinta da observada em outras patologias da epiderme,

permitindo incluir essas proteínas como possíveis marcadores de má resposta, além de abrir a possibilidade para estudos que os considerem como alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007, Sep;8(9):942-9.

Adler SH, Chiffolleau E, Xu L, Dalton NM, Burg JM, Wells AD, et al. Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *The Journal of Immunology* 2003;171(6):2896.

Aho S. Soluble form of jagged1: Unique product of epithelial keratinocytes and a regulator of keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem* 2004, Aug 15;92(6):1271-81.

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, May;68(5):527-8.

Ambler CA, Watt FM. Adult epidermal notch activity induces dermal accumulation of T cells and neural crest derivatives through upregulation of jagged 1. *Development* 2010, Nov;137(21):3569-79.

Amsen D, Antov A, Jankovic D, Sher A, Radtke F, Souabni A, et al. Direct regulation of gata3 expression determines the T helper differentiation potential of notch. *Immunity* 2007, Jul;27(1):89-99.

Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing leishmania major infection. *J Immunol* 2009, Oct 1;183(7):4619-27.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 2004, May;136(2):341-8.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 2005, Nov 15; 101(2):226-30.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999, Apr 30; 284(5415):770-6.

Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of leishmania braziliensis promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other leishmania species and correlates with response to therapy in american tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol* 2007, Jun;93(3):688-93.

Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-Regulation of th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002, Dec;70(12):6734-40.

- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2009, Jul 1;200(1):75-8.
- Baldi A, De Falco M, De Luca L, Cottone G, Paggi MG, Nickoloff BJ, et al. Characterization of tissue specific expression of notch-1 in human tissues. *Biol Cell* 2004, May;96(4):303-11.
- Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Netto M, Costa JM, et al. Evaluation of t-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987, Jul;9(4):487-97.
- Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 1995, Oct;147(4):947-54.
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1995, Jan;17(1):21-8.
- Bellavia D, Checquolo S, Campese AF, Felli MP, Gulino A, Screpanti I. Notch3: From subtle structural differences to functional diversity. *Oncogene* 2008, Sep 1;27(38):5092-8.
- Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev* 2006, Nov 1;20(21):3022-35.
- Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother* 2004, Feb;53(2):158-66.
- Blum JA, Hatz CF. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. *J Travel Med* 2009;16(2):123-31.
- Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(2):267.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília, 2007. 65-95p.
- Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 2010, Oct; 40(10):2830-6.
- Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA, Oriol O, Kraal G, Tapia FJ. Epidermal compromise in american cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 1992, Nov;99(5):95S-8S.
- Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, et al. Determination of the cytokine profile in american cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993, Mar;91(3):500-5.
- Cai G, Kastelein R, Hunter CA. Interleukin-18 (IL-18) enhances innate il-12-mediated resistance to toxoplasma gondii. *Infect Immun* 2000, Dec;68(12):6932-8.
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit

- phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 2006, May 1;193(9):1313-22.
- Carini, A. & Paranhos, U. Identification de l'a "Ulcers de Bauru" avec le bouton d'Orient. *Bull Soc Path Exot* 1909, 2:255-257.
- Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 2007, May;29(5):251-8.
- Chigurupati S, Arumugam TV, Son TG, Lathia JD, Jameel S, Mughal MR, et al. Involvement of notch signaling in wound healing. *Plos One* 2007;2(11):e1167.
- Cho OH, Shin HM, Miele L, Golde TE, Fauq A, Minter LM, Osborne BA. Notch regulates cytolytic effector function in CD8+ T cells. *J Immunol* 2009, Mar 15;182(6):3380-9.
- Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009, Feb 16;206(2):299-311.
- Costa JM, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD. Spontaneous healing of cutaneous leishmania braziliensis braziliensis ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(4):606.
- Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and th17 cells: Adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* 2010, Jan;1183:211-21.
- David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 2009;22(6):491-502.
- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in andean countries. *Cad Saude Publica* 2000;16:925-50.
- Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K, Dudley D. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med* 1990;171(4):979.
- de Magalhães AV, Chiarini LH, Raick AN. (The histopathology of cutaneous leishmaniasis). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1982;24(5):268-76.
- de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD. (Histopathology of cutaneous leishmaniasis by leishmania braziliensis braziliensis. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1986;28(4):253-62.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of leishmania--a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994;89(3):463-9.
- Demehri S, Turkoz A, Kopan R. Epidermal notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. *Cancer Cell* 2009, Jul 7;16(1):55-66.

de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in rio de janeiro state, brazil: Main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 2000, Jul;39(7):506-14.

Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, Sep;27(5):305-18.

Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999, Sep;19(1):121-32.

Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 2003, Jun 15;187 Suppl 2:S370-84.

Doi K, Ishida H, Nibu K. Notch expression in developing olfactory neuroepithelium. *Neuroreport* 2004, Apr 29;15(6):945-7.

Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, et al. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev* 2004, Nov 15;18(22):2730-5.

Elyaman W, Bradshaw EM, Wang Y, Oukka M, Kivisäkk P, Chiba S, et al. JAGGED1 and delta1 differentially regulate the outcome of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007, Nov 1;179(9):5990-8.

Eyerich K, Foerster S, Rombold S, Seidl HP, Behrendt H, Hofmann H, et al. Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol* 2008, Nov;128(11):2640-5.

Falqueto A. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de viana, estado do espírito santo, brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* :155-63.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 2005, Dec;73(12):7853-9.

Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of notch signaling--a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* 2008, Oct 1;121(Pt 19):3109-19.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 1996, Feb;34(2 Pt 1):257-72.

Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg* 1989, Dec;41(6):687-725.

Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, et al. WSX-1 is required for resistance to trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2003, Nov;19(5):657-67.

Hamilton T, Novotny M, Pavicic PJ, Herjan T, Hartupee J, Sun D, et al. Diversity in post-transcriptional control of neutrophil chemoattractant cytokine gene expression. *Cytokine* 2010;52(1-2):116-22.

Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, Taylor JM, Shi W, Li JL, Harris AL. Regulation of multiple angiogenic pathways by dll4 and notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 2008, Mar;75(2):144-54.

Hoyne GF, Dallman MJ, Lamb JR. T-Cell regulation of peripheral tolerance and immunity: The potential role for notch signalling. *Immunology* 2000, Jul;100(3):281-8.

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, Oct;55(4):365-9.

Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, Apr 1;23(4):543-53.

Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. Vegfrs and notch: A dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans* 2009, Dec;37(Pt 6):1233-6.

Jubb AM, Turley H, Moeller HC, Steers G, Han C, Li JL, et al. Expression of delta-like ligand 4 (dll4) and markers of hypoxia in colon cancer. *Br J Cancer* 2009, Nov 17;101(10):1749-57.

Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, Charbord P, Niemeyer M, Jacobs VR, et al. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp Cell Res* 2010, Oct 1;316(16):2609-17.

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against toxoplasma gondii infection. *Infect Immun* 2005, Jan;73(1):617-21.

Koch U, Radtke F. Notch and cancer: A double-edged sword. *Cell Mol Life Sci* 2007, Nov;64(21):2746-62.

Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007, Dec;19(6):362-71.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.

Kotloski NJ, Nardelli DT, Peterson SH, Torrealba JR, Warner TF, Callister SM, Schell RF. Interleukin-23 is required for development of arthritis in mice vaccinated and challenged with borrelia species. *Clin Vaccine Immunol* 2008, Aug;15(8):1199-207.

Lainson R. The american leishmaniasis: Some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77(5):569-96.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120 In W Peters & R Killick-Kendrick (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine* 1987, Vol. 1. *Biology and Epidemiology*. Academic Press, England.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994;89(3):435-43.

Lebre MC, Antons JC, Kalinski P, Schuitemaker JH, van Capel TM, Kapsenberg ML, De Jong EC. Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a type-1 polarized phenotype in dendritic cells: Role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J Invest Dermatol* 2003, Jun;120(6):990-7.

Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 2009, Jun;21(3):274-80.

Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* 2005, Apr 12;111(14):1826-32.

Lindenberg, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. *Bull.Soc.Path.Exot* 1909, 2: 252-254.

Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 2009, Mar 1;182(5):3039-46.

Lowell S, Jones P, Le Roux I, Dunne J, Watt FM. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* 2000, May 4;10(9):491-500.

Maillard I, Fang T, Pear WS. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 2005;23:945-74.

Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 2008, Jun;9(6):641-9.

Maretti-Mira AC, De Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, De Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 2010, Nov 22.

Marsden, PD, Nonata, RR. Mucocutaneous leishmaniasis. A review of clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 1975, 9: 309-326.

Marsden, PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitology today (Personal ed.)* 1985, Nov;1(5):129-33.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("spundia" escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80(6):859 - 876.

Mattos, MS. Determinação de parâmetros clínicos e prognósticos para o controle de cura da Leishmaniose Tegumentar Americana. Tese de Doutorado 2004. Instituto Oswaldo Cruz. Medicina Tropical, Rio de Janeiro.

Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* 2010, Jun 18.

Morgan TH. The theory of the gene. *American Naturalist* 1917;51(609):513-44.

Mukherjee S, Schaller MA, Neupane R, Kunkel SL, Lukacs NW. Regulation of T cell activation by notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and rorc activation. *J Immunol* 2009, Jun 15;182(12):7381-8.

Mullen AB, Lawrence CE, McFarlane E, Wei XQ, Carter KC. Endogenous interleukin-18 is involved in immunity to leishmania donovani but its absence does not adversely influence the therapeutic activity of sodium stibogluconate. *Immunology* 2006, Nov;119(3):348-54.

Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. Responses to leishmania donovani in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect Immun* 2006, Jul;74(7):4370-4.

Naik SM, Cannon G, Burbach GJ, Singh SR, Swerlick RA, Wilcox JN, et al. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* 1999, Nov;113(5):766-72.

Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bonish B, Miele L. Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through nf-kappab and ppargamma. *Cell Death Differ* 2002, Aug;9(8):842-55.

Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: A new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003, Sep 29;22(42):6598-608.

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003, Mar;33(3):416-21.

Okamoto M, Takeda K, Joetham A, Ohnishi H, Matsuda H, Swasey CH, et al. Essential role of notch signaling in effector memory CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Exp Med* 2008, May 12;205(5):1087-97.

Oliveira Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C. High and low doses of antimony (sbv) in american cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91(2):207-9.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with american cutaneous leishmaniasis: Extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 1997, Dec;57(6):651-5.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, da Costa SC, Pirmez C. Intralesional therapy of american cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in rio de janeiro, brazil--an area of leishmania (V.) Braziliensis transmission. *Int J Dermatol* 1997, Jun;36(6):463-8.

Oliveira-Neto, MP. Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro: Estudo de 648 Casos Observados no Hospital Evandro Chagas – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, Rio de Janeiro. 1998.

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Gonçalves-Costa SC, Souza CF, Grimaldi G. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of n-methyl glucamine (glucantime) in rio de janeiro, brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000;42(6):321-5.

Osborne B, Miele L. Notch and the immune system. *Immunity* 1999, Dec;11(6):653-63.

Osborne BA, Minter LM. Notch signalling during peripheral t-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2007, Jan;7(1):64-75.

Outtz HH, Wu JK, Wang X, Kitajewski J. Notch1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates vascular endothelial growth factor receptor-1 and inflammatory cytokine expression in macrophages. *J Immunol* 2010, Oct 1;185(7):4363-73.

Palaga T, Miele L, Golde TE, Osborne BA. Tcr-Mediated notch signaling regulates proliferation and ifn-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol* 2003, Sep 15;171(6):3019-24.

Pessoa, SB, Barreto, MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Educação e Saúde, Imprensa Nacional 1948, Rio de Janeiro. BRASIL.

Pirmez C, Marzochi MC, Coutinho SG. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*leishmania braziliensis braziliensis*). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83(2):145-51.

Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in american cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 1990, Nov 1;145(9):3100-4.

Pirmez C. Immunopathology of american cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87 Suppl 5:105-9.

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, Apr;91(4):1390-5.

Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *leishmania donovani*. *J Clin Invest* 2009, Aug;119(8):2379-87.

Proweller A, Tu L, Lepore JJ, Cheng L, Lu MM, Seykora J, et al. Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res* 2006, Aug 1;66(15):7438-44.

Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity* 2010, Jan 29;32(1):14-27.

Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001, Jul 2;20(13):3427-36.

- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007, Sep;7(9):581-96.
- Revelink, SA, Lerner, EA. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1996, Fev;34(2):257-72.
- Rey, L. O Complexo *Leishmania braziliensis* e as leishmanioses cutâneas das Américas. In: *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos*, 4ª Ed. 2008. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Brasil:372-95.
- Ridley DS, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in brazil and its clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74(4):508-14.
- Ridley DS. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74(4):515-21.
- Ridley MJ, Wells CW. Macrophage-Parasite interaction in the lesions of cutaneous leishmaniasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1986, Apr;123(1):79-85.
- Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. Rational targeting of notch signaling in cancer. *Oncogene* 2008, Sep 1;27(38):5124-31.
- Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, et al. Down-Regulation of th1 type of response in early human american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1999, Nov;180(5):1731-4.
- Samon JB, Champhekar A, Minter LM, Telfer JC, Miele L, Fauq A, et al. Notch1 and *tgfbeta1* cooperatively regulate *foxp3* expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood* 2008, Sep 1;112(5):1813-21.
- Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, NY.
- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G, Fernandes O. Detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 1998, Sep;178(3):911-4.
- Sinan/Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde/Brasil. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560 (Acessado em 04/10/2010)
- Sousa Ade Q, Parise ME, Pompeu MM, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, et al. Bubonic leishmaniasis: A common manifestation of leishmania (viannia) braziliensis infection in ceara, brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1995, Oct;53(4):380-5.
- Tacchini-Cottier F, Allenbach C, Otten LA, Radtke F. Notch1 expression on T cells is not required for CD4+ T helper differentiation. *Eur J Immunol* 2004, Jun;34(6):1588-96.
- Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, Gulino A, Screpanti I. Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta* 2008, Sep;1782(9):489-97.

Thélu J, Rossio P, Favier B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol* 2002, Apr 29;2:7.

Tu L, Fang TC, Artis D, Shestova O, Pross SE, Maillard I, Pear WS. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 2005, Oct 17;202(8):1037-42.

Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, et al. IL-17-Mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary mycobacterium bovis bacille calmette-guerin infection. *J Immunol* 2007, Mar 15;178(6):3786-96.

Urs S, Roudabush A, O'Neill CF, Pinz I, Prudovsky I, Kacer D, et al. Soluble forms of the notch ligands delta1 and jagged1 promote in vivo tumorigenicity in NIH3T3 fibroblasts with distinct phenotypes. *Am J Pathol* 2008, Sep;173(3):865-78.

van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Joosten LAB, Netea MG. Th17 responses and host defense against microorganisms: An overview. *Pathogenesis* 2009;42(12):776-87.

Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* 2006, Nov;7(11):1151-6.

Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M, et al. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis* 2006, Aug 15;194(4):503-11.

Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008, Jun;9(6):650-7.

Watt FM, Estrach S, Ambler CA. Epidermal notch signalling: Differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2008, Apr;20(2):171-9.

Wei XQ, Leung BP, Niedbala W, Piedrafita D, Feng GJ, Sweet M, et al. Altered immune responses and susceptibility to leishmania major and staphylococcus aureus infection in il-18-deficient mice. *J Immunol* 1999, Sep 1;163(5):2821-8.

Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996;14(5):433-50.

Widdicombe J. Microvascular anatomy of the nose. *Allergy* 1997;52:7-11.

Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G. Up-Regulation of the notch ligand delta-like 4 inhibits vegf-induced endothelial cell function. *Blood* 2006, Feb 1;107(3):931-9.

Wittmann M, Macdonald A, Renne J. IL-18 and skin inflammation. *Autoimmun Rev* 2009, Sep;9(1):45-8.

WHO. Programmes and Projects: Leishmaniasis. WHO, 2010. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (acessado em Outubro de 2010).

Yan M, Callahan CA, Beyer JC, Allamneni KP, Zhang G, Ridgway JB, et al. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. *Nature* 2010, Feb 11;463(7282):E6-7.

Ye Y, Xie X, Yu J, Zhou L, Xie H, Jiang G, et al. Involvement of th17 and th1 effector responses in patients with hepatitis B. *J Clin Immunol* 2010, Jul;30(4):546-55.

Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. Structure of leishmania minicircle kinetoplast DNA classes. *J Clin Microbiol* 1999, May;37(5):1656-7.

ANEXO 1:

Tabela detalhada dos casos identificando as análise a que foi submetido cada caso estudado.

Caso	Idade	Tempo(m)	IDRM	FC	Resposta	IHQ	RT	PBMC
1	35	3	21	LCL	Má		X	
2	59	2	18	LCL	Má			X
3	67	3	30	LCL	Má			X
4	34	2	27	LCL	Má		X	
5	32	2	94	LCL	Má		X	
6	58	3	60	LCL	Má		X	
7	35	5	33	LCL	Má	X	X	
8	36	3	60	LCL	Má	X	X	
9	47	2	16	LCL	Má	X		
10	38	5	15	LCL	Má		X	
11	25	1	19	LCL	Má	X		
12	17	2	12	LCL	Má	X	X	
13	34	2	32	LCL	Má		X	
14	49	8	42	LCL	SI		X	
15	30	2	29	LCL	Má	X	X	
16	16	2	16	LCL	Má	X	X	
17	34	SI	27	LCL	Má	X		
18	61	6	39	LCL	Má	X	X	
19	35	2	27	LCL	Má	X	X	
20	61	2	16	LCL	Má			X
21	26	6	18	LCL	Má			X
22	31	8	11	LCL	Má	X	X	
23	35	3	25	LCL	Má			X
24	22	2	21	LCL	Má	X		
25	30	2	8	LCL	Má			X
26	27	1	24	LCL	Má			X
27	38	3	18	LCL	Má	X	X	
28	29	5	14	LCL	SI	X		
29	45	2	24	LCL	SI		X	
30	69	12	32	LCL	SI	X	X	
31	51	3	SI	LCL	SI		X	
32	21	15	SI	LCL	SI		X	
33	18	2	35	LCL	Boa	X		
34	24	5	14	LCL	Boa	X		
35	24	4	22	LCL	Boa	X		
36	5	2	NEG	LCL	Boa	X	X	
37	74	5	29	LCL	Boa	X	X	
38	29	3	42	MCL	Boa		X	
39	15	1	35	LCL	Boa			X
40	5	6	14	LCL	Boa			X
41	SI	SI	SI	LCL	Boa	X	X	
42	19	2	19	LCL	Boa			X
43	31	2	52	LCL	Boa	X	X	
44	63	3	39	LCL	Boa	X	X	
45	7	1	16	LCL	Boa	X		
46	11	4	55	LCL	Boa	X	X	
47	18	24	38	LCL	Boa	X	X	
48	36	2	11	LCL	Boa			X

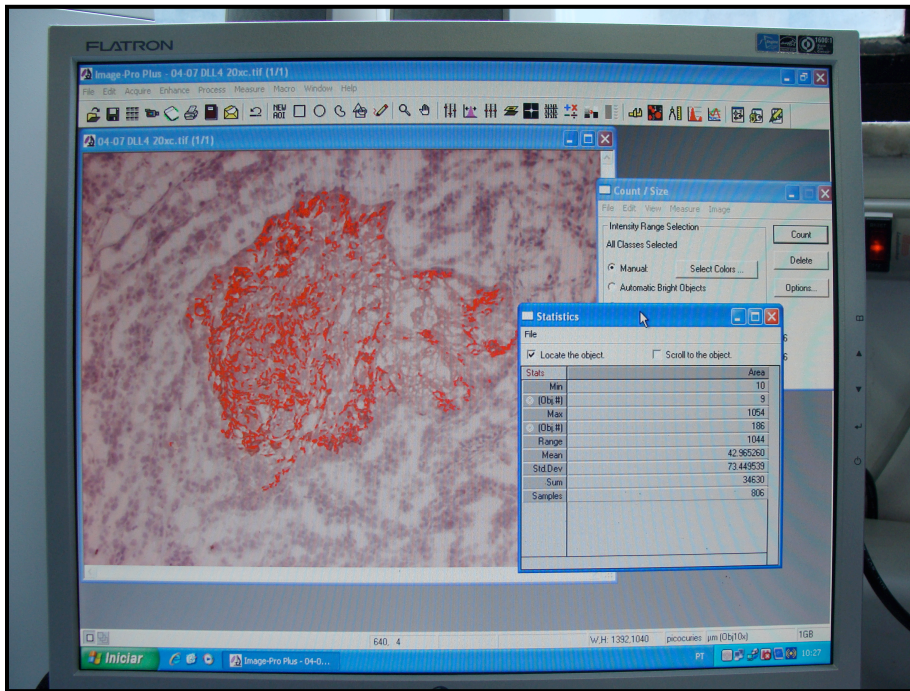
Caso	Idade	Tempo(m)	IDRM	FC	Resposta	IHQ	RT	PBMC
49	10	6	50	LCL	Boa			X
50	53	3	30	LCL	Boa		X	
51	55	1	15	LCL	Boa	X		
52	81	3	25	LCL	Boa	X	X	
53	35	3	18	LCL	Boa		X	X
54	42	3	12	LCL	Boa	X		
55	SI	SI	45	LCL	Boa	X		
56	17	3	SI	LCL	Boa	X	X	
57	64	3	14	LCL	Boa	X	X	
58	17	2	32	LCL	Boa	X	X	
59	25	2	86	LCL	Boa	X	X	
60	11	2	14	LCL	Boa	X		
61	62	24	5	ML		X		
62	64	12	22	ML		X	X	
63	72	10 anos	32	ML		X		
64	65	180	32	ML				X
65	64	24	44	ML				X
66	SI	8 anos	48	ML		X	X	
67	25	24	51	ML				X
68	67	12	53	ML				X
69	67	60	56	ML				X
70	43	360	67	ML			X	
71	47	SI	SI	ML		X	X	
72	SI	SI	SI	ML		X	X	
73	SI	SI	SI	ML			X	

Tabela 1 (Anexo1): Tempo (tempo de doença até o diagnóstico em meses), MTN (resultado da reação de Montenegro em mm), FC (forma clínica), IHQ(imunohistoquímica), RT (PCR em tempo real), PBMC (pacientes cujo PBMC foi utilizado), SI (sem informação disponível).

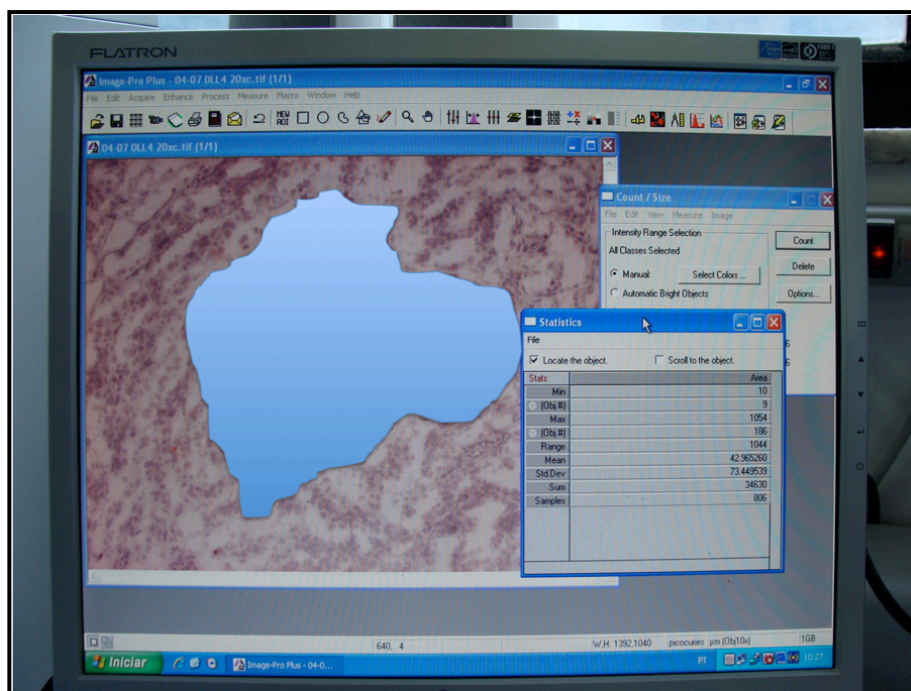
ANEXO 2:

Exemplo de captação e quantificação da área de epiderme marcada no programa de captação e análise de imagens (Image-Pro Plus – Media Cybernetics). Na figura A observamos a determinação da área marcada. Na figura B está delimitada a área de epiderme que será considerada área total sobre o qual será considerado o percentual de marcação.

A



B



ANEXO 3:

Fotografias dos géis de agarose:

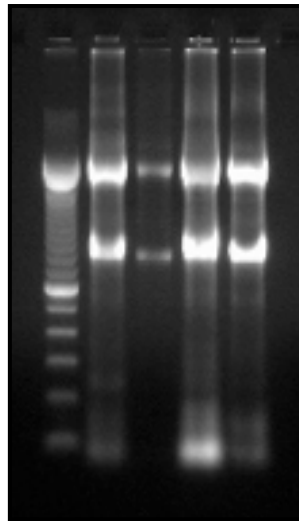


Fig 3.1: Gel produzido como controle de integridade de RNA extraído. Marcador de peso molecular (MPM)= 100pb

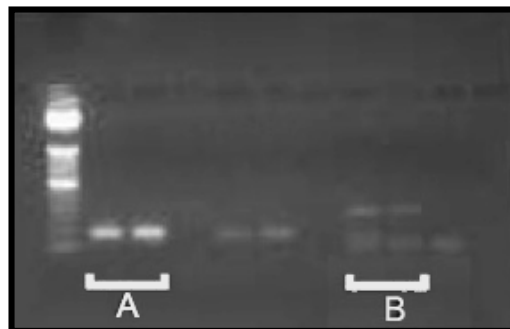


Fig 3.2a: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com Notch1=85pb (A) e DLL4=176pb (B). MPM=50pb

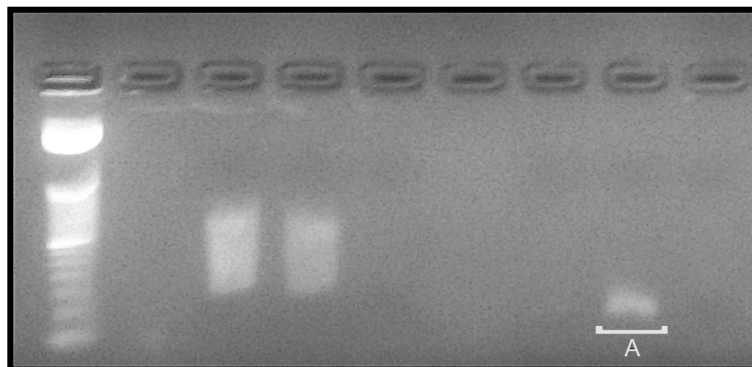


Fig 3.2b: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com Jagged1=83pb (A). MPM=50pb

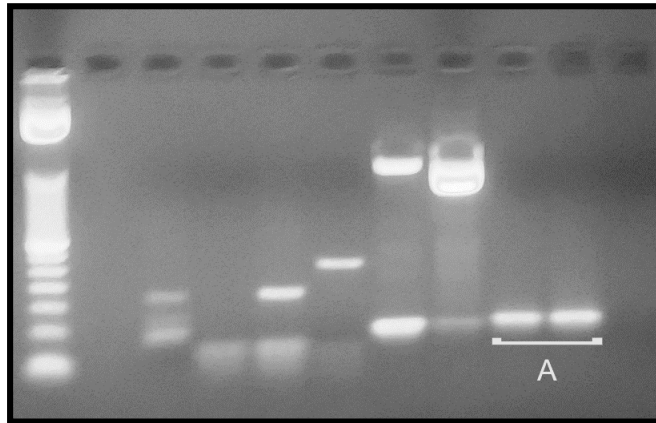


Fig 3.2c: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com Notch4=92pb (A). MPM=50pb

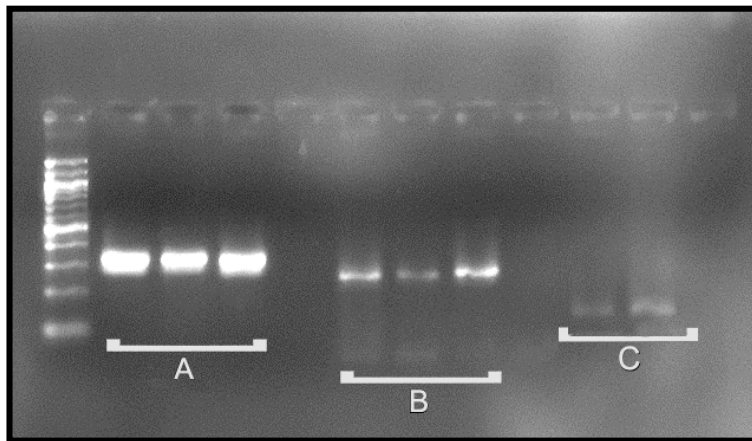


Fig 3.2d: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com IL-18=342pb (A), Notch3=259pb (B) e DLL1=134pb (C). MPM=100pb

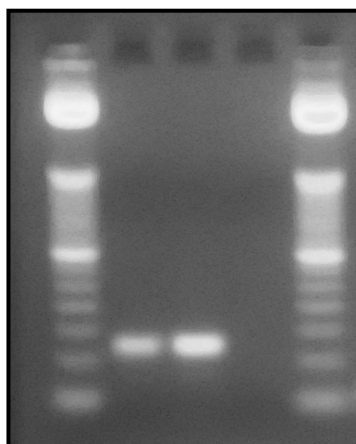


Fig 3.2e: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com IL-17=119pb. MPM=50pb.

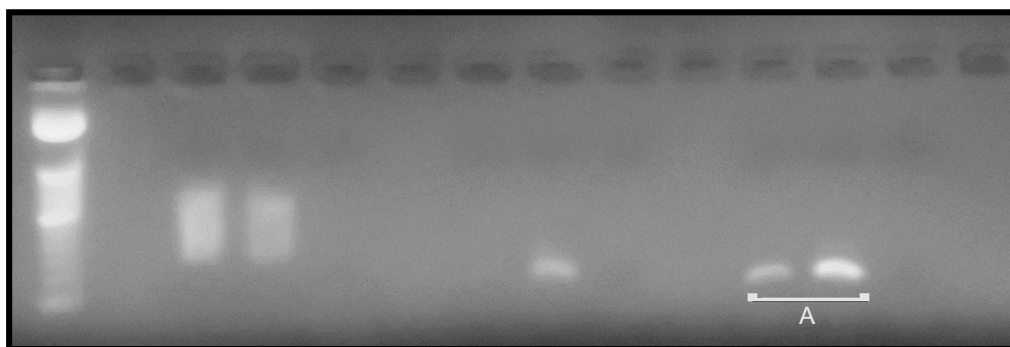


Fig 3.2f: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com T-bet=95pb (A). MPM=50pb.

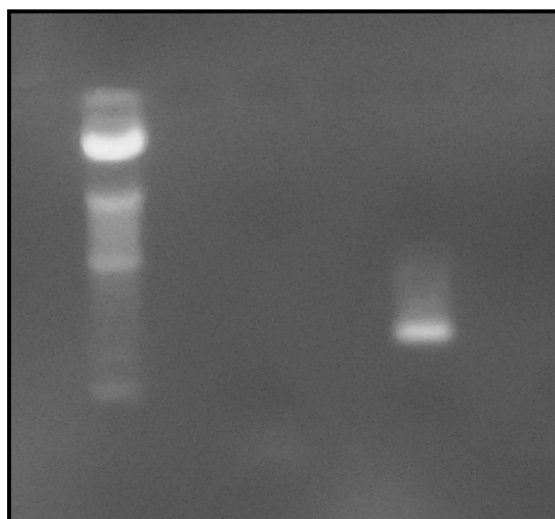


Fig 3.2g: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com GATA3=130pb. MPM=50pb .

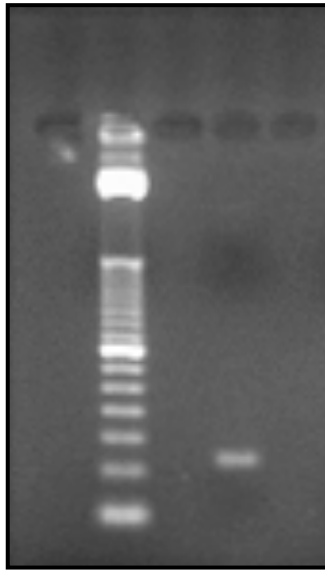


Fig 3.2h: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com IFN γ =118pb. MPM=50pb.

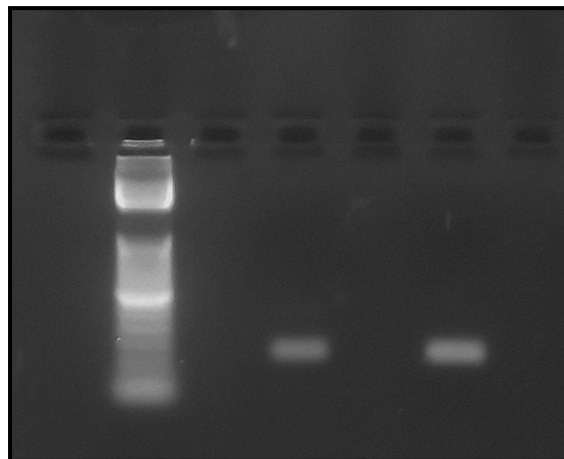
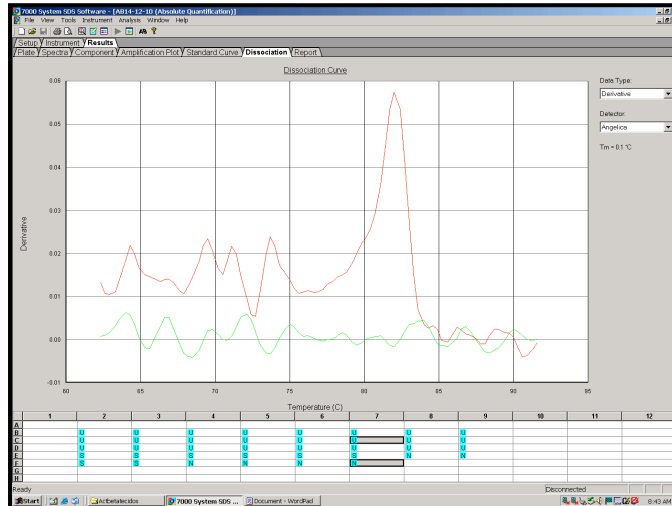


Fig 3.2i: Gel de agarose a 2% evidenciando banda compatível com TGF β =127pb. MPM=50pb.

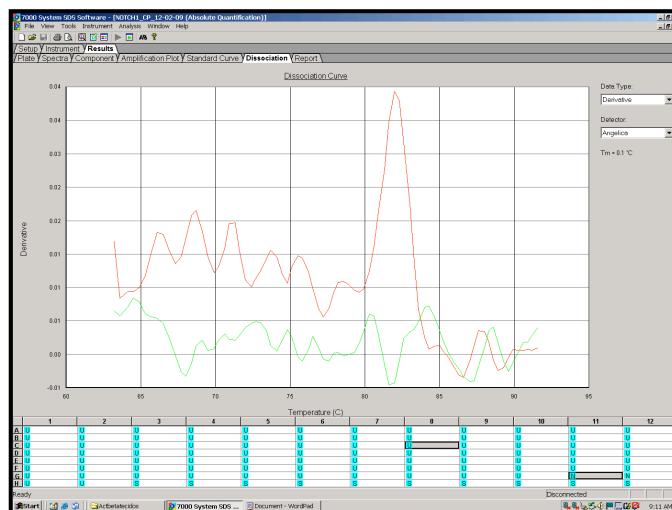
ANEXO 4:

Curvas de dissociação dos experimentos de PCR em tempo real para os fragmentos de tecido evidenciando a presença de um único produto, destacando uma amostra (Unknown), curva vermelha e o branco (NTC), curva verde.

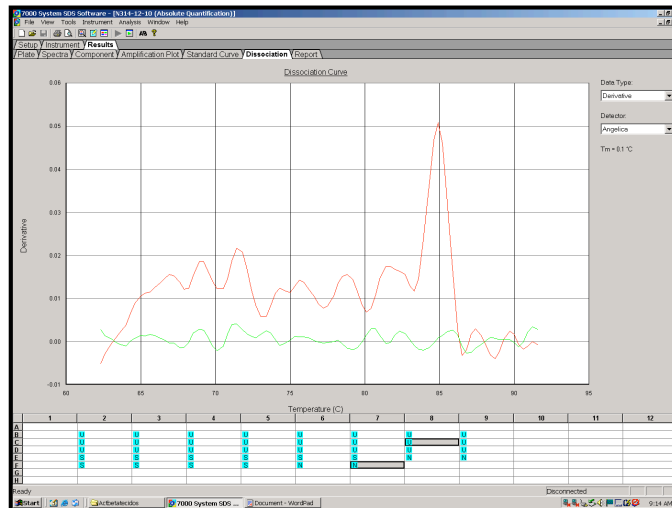
4.1 Gene Act-b ($R^2=0,9732$):



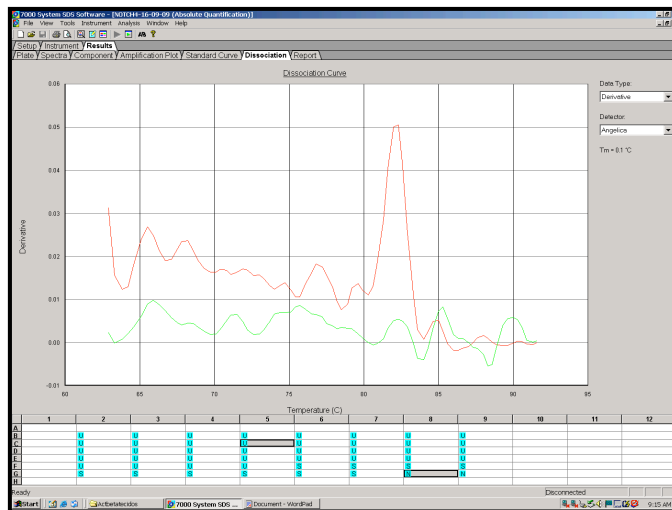
4.2 Gene Notch1 ($R^2=0,9954$):



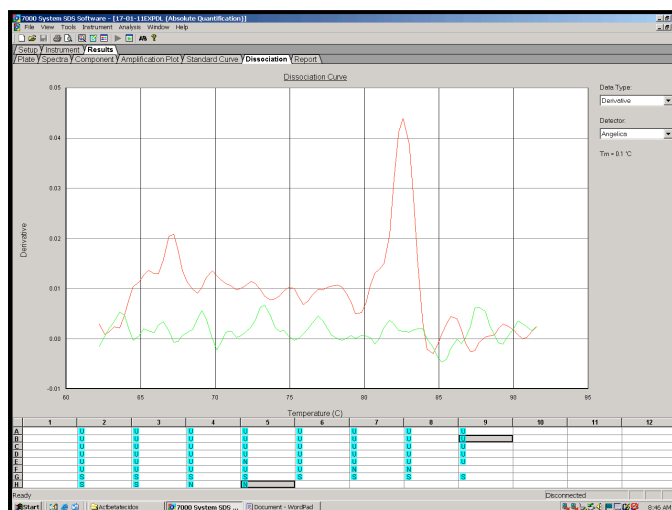
4.3. Gene Notch3 (R2=0,973):



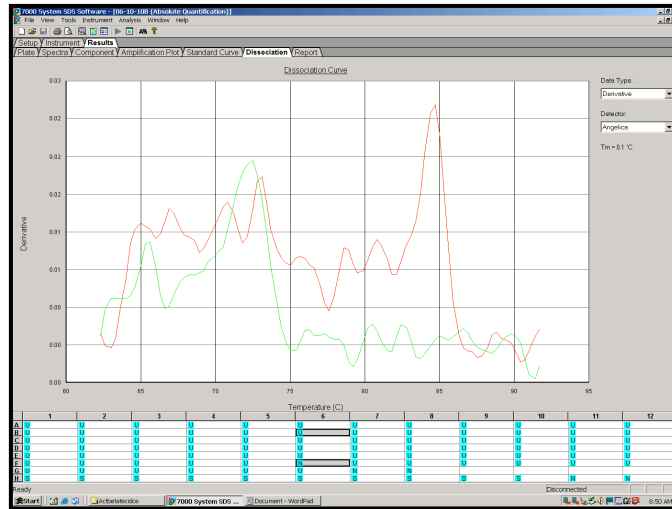
4.4. Gene Notch4 (R2=0,901):



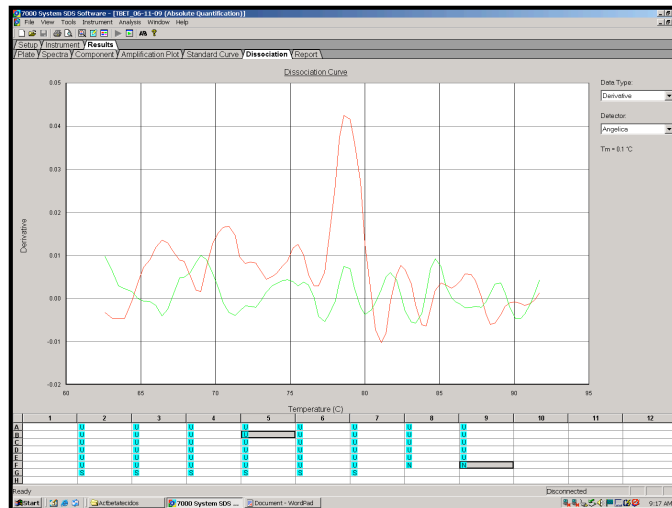
4.5. Gene DLL1 (R2=0,9953):



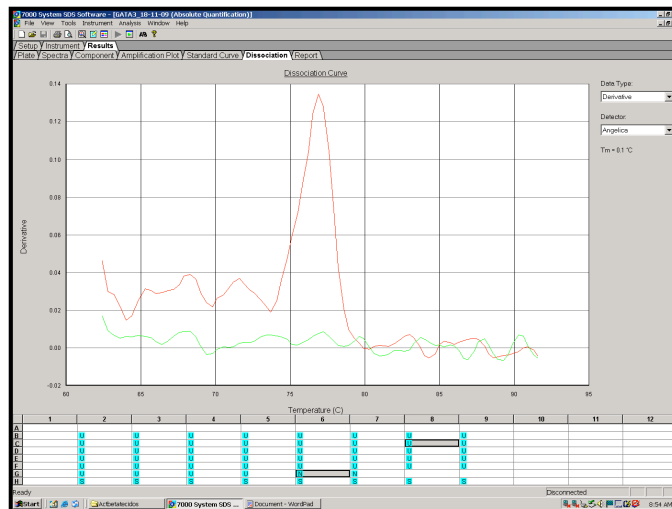
4.6. Gene DLL4 (R2=0,9704):



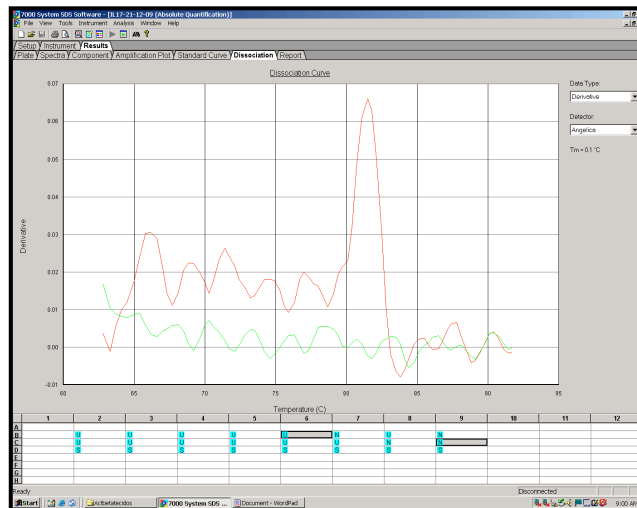
4.7. Gene T-bet (R2=0,974):



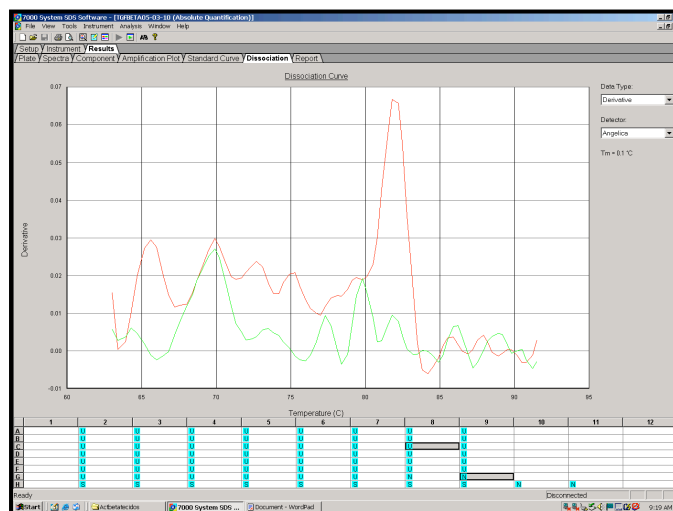
4.8. Gene Gata3 (R2=0,9435):



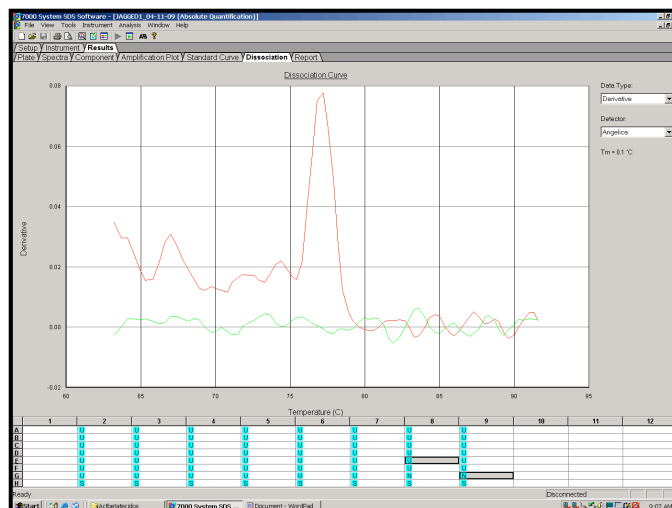
4.9. Gene IL-17 (R2=0,9120):



4.10. Gene TGF-β (R2=0,9888):



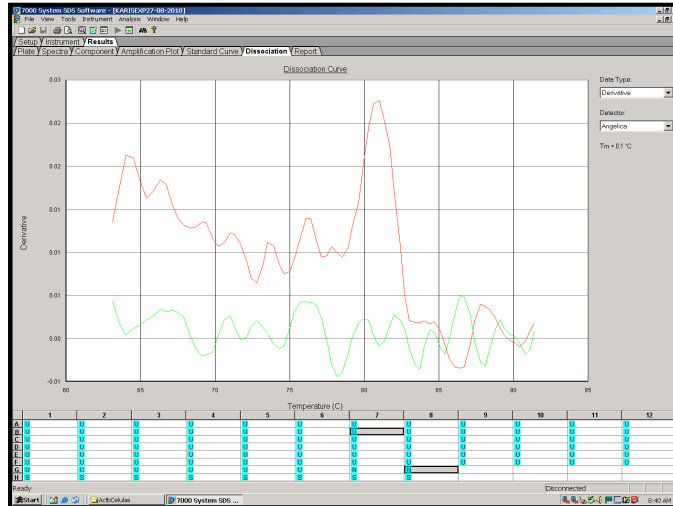
4.11. Gene Jagged1 (R2=0,9161):



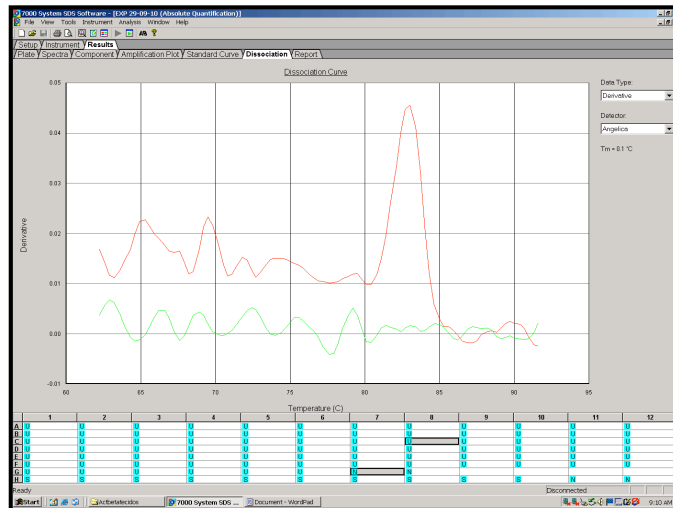
ANEXO 5:

Curvas de dissociação dos experimentos de PCR em tempo real para as células de sangue periférico (PBMC) evidenciando a presença de um único produto, destacando uma amostra (Unknown), curva vermelha e o branco (NTC), curva verde.

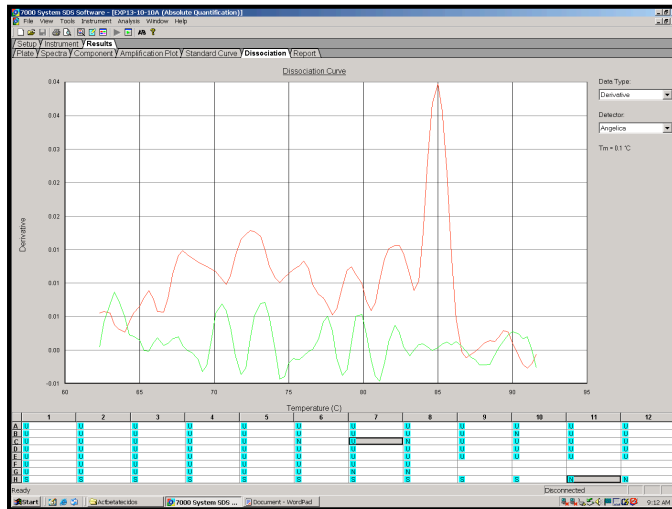
5.1. Gene Act-b ($R^2=0,9120$):



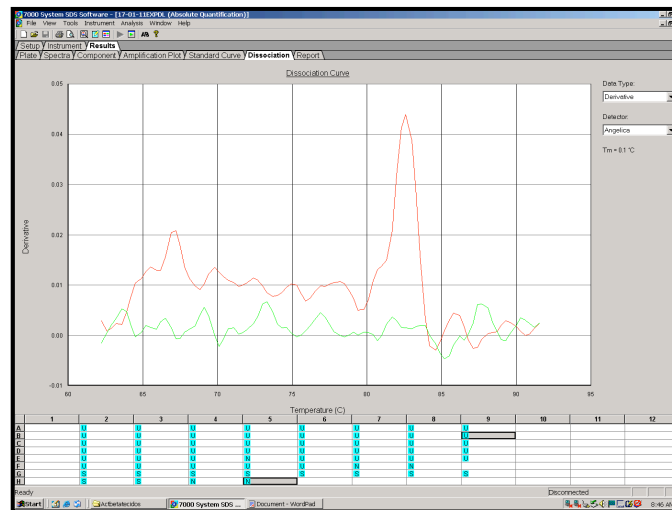
5.2. Gene Notch1 ($R^2=0,9663$):



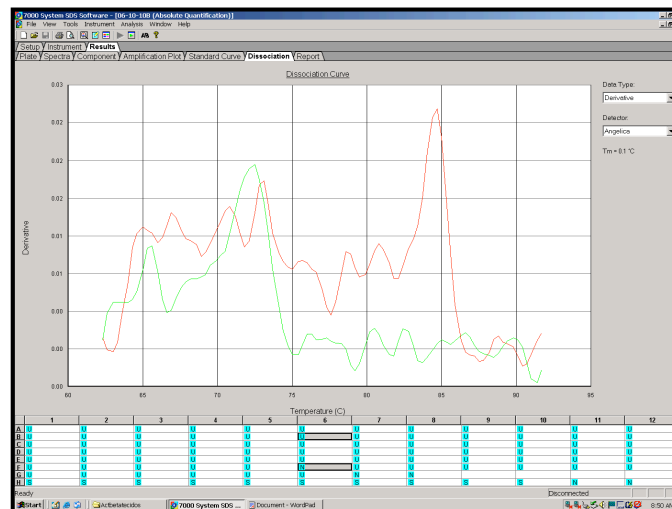
5.3. Gene Notch3 (R2=0,9895):



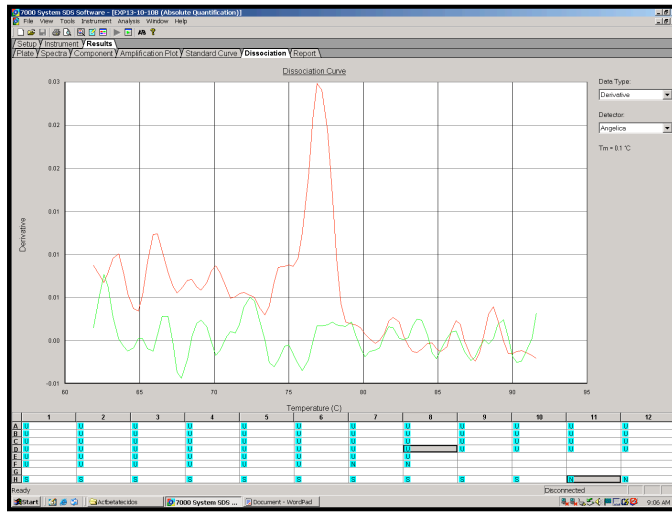
5.4. Gene DLL1 (R2=0,9969):



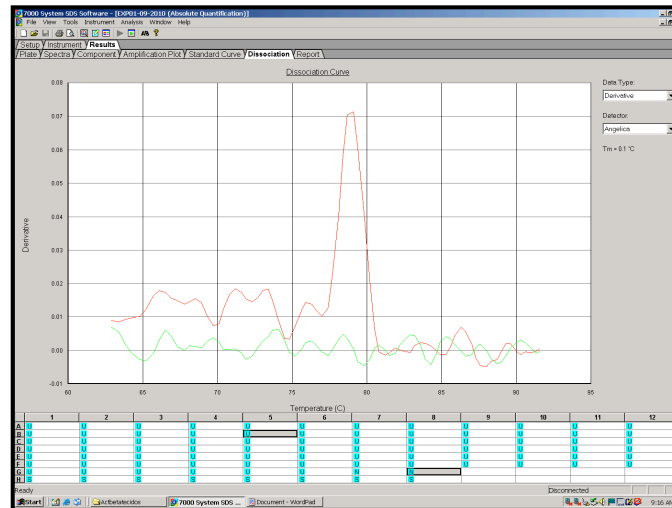
5.5. Gene DLL4 (R2=0,9826):



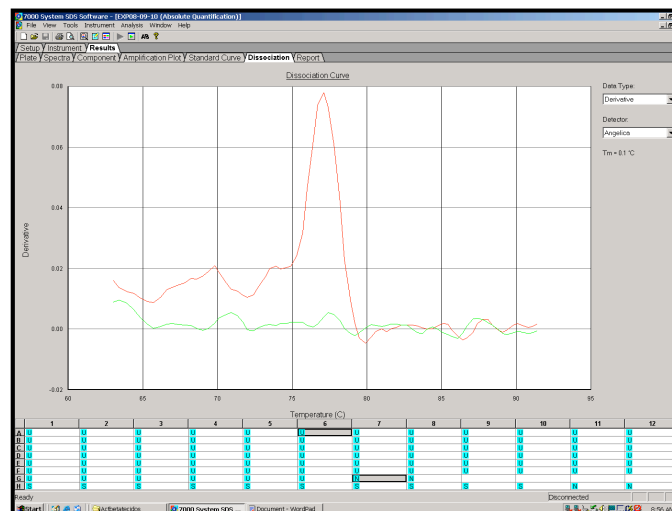
5.6. Gene Jagged1 (R2=0,9331):



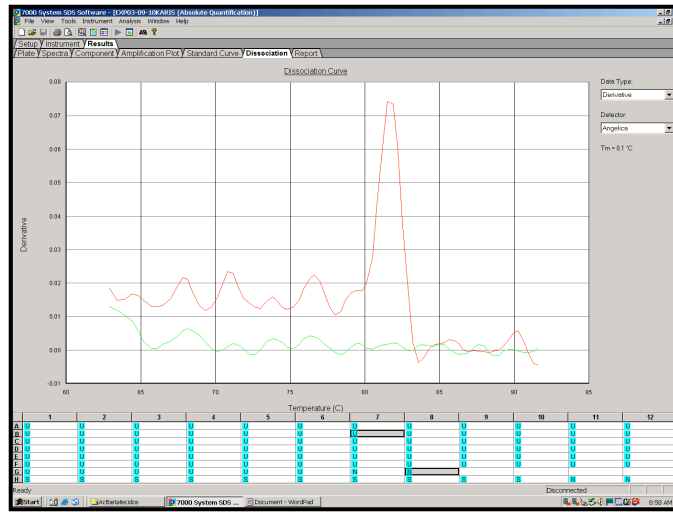
5.7. Gene T-bet (R2=0,9993):



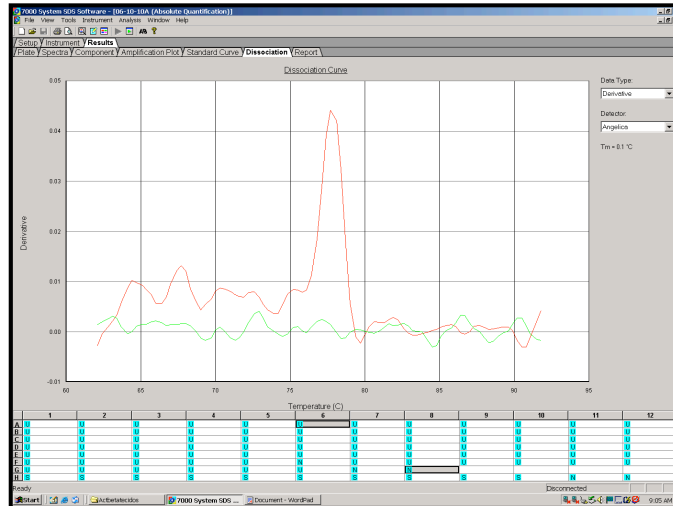
5.8. Gene Gata3 (R2=0,9076):



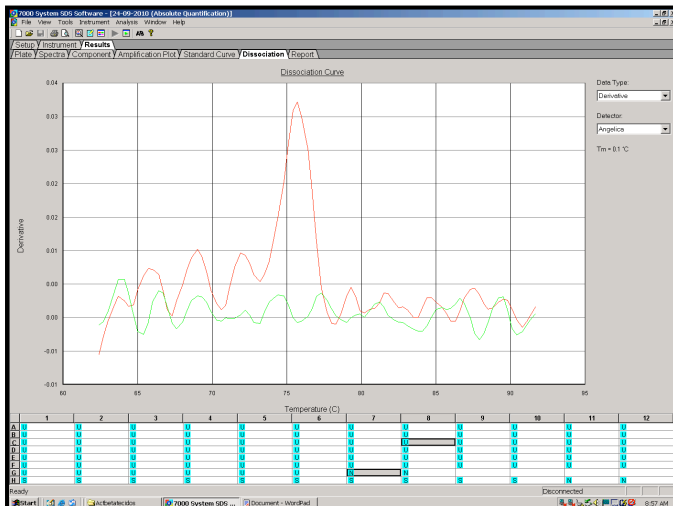
5.9. Gene IL-17 (R2=0,9431):



5.10. Gene IL-4 (R2=0,9486):



5.11. Gene IFN- γ (R2=0,9704):



5.12. Gene TGF- β (R2=0,9974):

