



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

TESE DE DOUTORADO

**CÉLULAS INFLAMATÓRIAS TECIDUAIS NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA CAUSADA POR *Leishmania*
*braziliensis***

MAÍRA GARCIA SALDANHA

Salvador - Bahia

2020

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

CÉLULAS INFLAMATÓRIAS TECIDUAIS NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA CAUSADA POR *Leishmania*
braziliensis

MAÍRA GARCIA SALDANHA

Orientador: Sérgio Marcos Arruda

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Doutor.

Salvador - Bahia

2020

“CÉLULAS INFLAMATÓRIAS TECIDUAIS NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA
HUMANA POR *L. braziliensis*”.

MAIRA GARCIA SALDANHA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 02 de outubro de 2020.

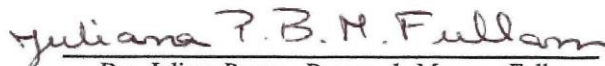
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Naiura Vieira Pereira
Biologista
Hospital das Clínicas da FMUSP



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"

Aos pacientes acometidos pela Leishmaniose Cutânea.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Arruda, meu orientador, por aceitar este desafio, pelos dias de incentivo e confiança que agora completam 8 anos. Obrigada por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma!

Ao Dr. Edgar Carvalho por sua extrema atenção, parceria, cuidado e inspiração. É uma honra poder dialogar, trabalhar e conviver com uma pessoa que é ao mesmo tempo tão simples e grandiosa.

Ao meu companheiríssimo esposo, Alcides Mendes, minha fortaleza. Me ajudou desde sempre com exatamente tudo, desde o abraço revigorante até com a linguagem de programação que nos rendeu um belo painel de análise. E a Pan, que completa a nossa família, sempre trazendo muita alegria e um olhar amoroso de compreensão e cuidado, temos um anjo em formato de pet.

Aos meus pais, Júlio e Alda, que me permitiram voar e vencer mesmo longe de suas asas, mas sempre me mantiveram envolvida por muito amor, orações e dedicação.

Às minhas irmãs, Thais e Sueli, pela amizade, apoio e união a mais de mil quilômetros de distância e saudades.

À minha sogra, Núbia Mendes, pelas palavras de carinho e força, pelo exemplo de dedicação, pelo socorro naqueles dias em que respirar não era a prioridade.

Aqueles que alegremente posso chamar de família e juntos podemos compartilhar e comemorar nossas conquistas.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, que me acolheu com todo carinho e atenção e possibilitou a realização dos meus experimentos, de colaborações e do meu crescimento acadêmico-profissional.

À Dra. Irma Duarte, pela doçura, acolhimento e alegria.

À Dra. Mirian Sotto, pelo total suporte, indicações, delicadeza e confiança, minha infinita gratidão.

À Dra. Carla Pagliari, por seu auxílio incondicional, seu companheirismo e sua preciosa amizade que levarei por toda a minha vida.

À Luciane Kanashiro pela serenidade, amizade e grande suporte para as imunoistoquímicas.

À Cleuza Takakura, Mônica Kauffman, Rosana Cardoso e Ana Carolina Jesus, agradeço por cada auxílio, cada abraço e por fazerem me sentir em família.

Aos amigos da Universidade Federal de São Paulo, mais uma família que me acolheu com muito apoio e atenção, em especial a Nilce Coimbra, Natália Melo e Renato Migliano.

Aos Professores, Coordenação e Diretoria do IGM, por serem tão dedicados, acessíveis e dispostos para fazer a Ciência acontecer.

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

Ao Serviço de Histotecnologia, pela convivência e aprendizado, e pela oportunidade de renovação e crescimento profissional.

A Plataforma de Microscopia Eletrônica, cito com muito carinho, Márcio Ferreira, Adriana Rangel, Cláudio Silveira, Maria Lúcia Vieira e Arlene Lessa meus amigos do coração sempre dispostos e atenciosos para ajudar.

Ao Laboratório Avançado de Saúde Pública, em especial Rita Santana, Jurema Carrilho e Dn. Maria Eugênia.

Aos servidores da biblioteca do IGM, em especial Sra. Ana Maria Fiscina, tão delicada e atenciosa.

Aos companheiros do P0, Filipe Lima e Débora Leal, minha gratidão por serem sempre tão atenciosos e estarem dispostos a colaborar.

A todo pessoal responsável pela organização do IGM, desde a portaria, secretaria e limpeza, por proporcionarem um ambiente propício ao estudo e convivência.

As instituições que fomentaram a compra dos reagentes, a bolsa de estudos e as publicações, em especial a FAPESB.

Aos autores e co-autores dos artigos, que num trabalho coeso e colaborativo permitiram as publicações em revistas científicas.

Aos membros da banca, pelo empenho em contribuir para o desenvolvimento do trabalho e, por consequência, serem extremamente relevantes para o meu crescimento.

Por fim, ao Deus que me enriqueceu com suas bênçãos infindáveis e me presenteou com todas essas pessoas que caminharam comigo e permitiram que esse dia chegasse.

Um forte abraço a todos!!!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”.

Marie Curie

SALDANHA, Maíra Garcia. Células inflamatórias teciduais na patogênese da leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis*. 2020. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose cutânea (LC) é causada pela picada de um flebótomo fêmea que inocula protozoários de *Leishmania* na pele do hospedeiro e desencadeia um processo imunológico com a formação de uma lesão ulcerada. A resposta inflamatória exacerbada consegue controlar os parasitas, entretanto resulta em dano tecidual. Muitos estudos sobre LC utilizam metodologias *in vitro* e com modelos murinos e, mais recentemente, têm sugerido que o acúmulo de células com potencial citotóxico contribui para a formação de lesões na pele.

OBJETIVOS: Propomos uma análise *in situ* para estabelecer correlações entre os eventos clínico-histopatológicos e a participação de células e moléculas inflamatórias, a fim de compreender a imunopatogênese das lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS: Realizamos a análise histopatológica de biópsias da borda da lesão ulcerada de 22 pacientes com diagnóstico de LC. Por imunoistoquímica, identificamos e quantificamos as populações das células *natural killer* (NK) CD57⁺, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B CD20⁺, macrófagos CD68⁺, células perforina⁺, granzima B⁺, TNF- α ⁺ e IL-1 β ⁺. Correlacionamos essas células com o tamanho da lesão, a porcentagem de necrose e de inflamação, e o número de amastigotas. **RESULTADOS:** Identificamos uma alta proporção de linfócitos, havendo uma correlação negativa entre os linfócitos T CD4⁺ com os macrófagos CD68⁺, as amastigotas e a necrose. As perforinas e granzimas, produzidas pelos linfócitos CD8⁺ e células NK, foram correlacionadas com a necrose, bem como as células IL-1 β ⁺ e TNF- α ⁺. **CONCLUSÃO:** Os mecanismos inflamatórios que induzem a morte necrótica das células infectadas são fatores que podem contribuir para o dano tecidual.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, Histopatologia, Imunoistoquímica, *L. braziliensis*.

SALDANHA, Maíra Garcia. Inflammatory tissue cells in the pathogenesis of human cutaneous leishmaniasis due to *L. braziliensis*. 2020. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by the bite of a female phlebotome that protects the *Leishmania* inoculate on the skin of the host and triggers an immune process with the formation of an ulcerated lesion. The exacerbated inflammatory response is able to control the parasites, however it results in tissue damage. Most of the studies on CL report *in vitro* methodologies and with murine models and more recently it was suggested that the accumulation of cells with cytotoxic potential contributes to the formation of skin lesions. **AIM:** We propose an *in situ* analysis to establish correlations between clinical-histopathological events and the participation of inflammatory cells and molecules, in order to understand the immunopathogenesis of cutaneous lesions caused by *L. braziliensis*. **MATERIAL AND METHODS:** Was performed a histopathological analysis of biopsies from the edge of the ulcerated lesion of 22 patients diagnosed with CL. By immunohistochemistry, we identified and quantified the cells of the CD57⁺ natural killer (NK) cells, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD68⁺ macrophages, perforin⁺ cells, granzyme B⁺, TNF- α ⁺ and IL-1 β ⁺. We correlated these cells with the size of the lesion, the percentage of necrosis and inflammation, and the number of amastigotes found in the histological sections. **RESULTS:** We identified a high proportion of lymphocytes, having a negative correlation between CD4⁺ T lymphocytes and CD68⁺ macrophages, such as amastigotes and necrosis. Perforins and granzymes, produced by CD8⁺ lymphocytes and NK cells, were correlated with necrosis, as well as IL-1 β ⁺ and TNF- α ⁺ cells. **CONCLUSION:** the inflammatory mechanisms that induce necrotic death of infected cells are factors that can contribute to tissue damage.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Histopathology, Immunohistochemistry, *L. braziliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1.	Relação de anticorpos utilizados para imunomarcção de células inflamatórias e moléculas nas secções histológicas de lesões ulceradas de pacientes com leishmaniose cutânea.	34
Tabela 2.	Características demográficas e clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea em Corte de Pedra – BA, de 2009 a 2014.	40
Figura 1.	Ciclo de transmissão da leishmaniose cutânea.	19
Figura 2.	Imunoistoquímica nas secções histológicas de biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea.	35
Figura 3.	Exemplificação da análise quantitativa em secção histológica de biópsia de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea após imunoistoquímica.	36-37
Figura 4.	Exemplificação da análise morfométrica em secção histológica de biópsia de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea corada com hematoxilina e eosina.	38
Figura 5.	Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea (CD4 e CD8).	41
Figura 6.	Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea (CD20 e CD57).	42
Figura 7.	Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea (CD68 e <i>Leishmania</i>).	43
Figura 8.	Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea (TNF- α e IL-1 β).	44
Figura 9.	Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea (granzima B e perforina).	45
Figura 10.	Perfil celular inflamatório na leishmaniose cutânea e número de amastigotas.	46
Figura 11.	Comparação do número de células (A) TNF- α^+ e (B) IL-1 β^+ em pacientes com lesão ulcerada de leishmaniose cutânea que apresentaram ou não linfadenopatia.	46

Figura 12.	Correlação entre as células inflamatórias e as características clínico-histopatológicas nas biópsias de lesões ulceradas de pacientes com leishmaniose cutânea.	47
Figura 13.	Correlação linear entre células e áreas de inflamação e de necrose.	48
Figura 14.	Correlação linear entre células e número de amastigotas.	49
Figura 15.	Correlação linear entre macrófagos, amastigotas e células <i>natural killer</i> .	49
Figura 16.	Áreas de inflamação e necrose nas biópsias de IDRM ⁻ e IDRM ⁺ .	51
Figura 17.	Células inflamatórias e amastigotas por imunohistoquímica em secções histológicas de pacientes com IDRM ⁻ e IDRM ⁺ .	51-52
Figura 18.	Esquema representativo da resposta inflamatória na leishmaniose cutânea causada pela <i>L. braziliensis</i> .	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (marcador de membrana de células)
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
DAB	Diaminobenzidina
DTH	Teste de Sensibilidade Tardia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	human immunodeficiency virus/ Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1 beta
LC	Leishmaniose Cutânea
LCC	Leishmaniose Cutânea Clássica
LD	Leishmaniose Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose Mucosa
LCR	Leishmaniose Cutânea Recente
LD	Leishmaniose Disseminada
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
mm²	Milímetro quadrado
MØ	Macrófago
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> - Fosfato Salina Tamponada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Th1	T helper 1
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	EPIDEMIOLOGIA	17
2.2	TRANSMISSÃO.....	18
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO	20
2.4	INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO	21
2.5	A RESPOSTA IMUNE INATA.....	22
2.6	A RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA E OS LINFÓCITOS.....	23
2.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	25
2.8	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS POR <i>L. braziliensis</i>	27
2.9	A RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	ASPECTOS GERAIS.....	31
4.2	DADOS CLÍNICOS	31
4.2.1	Critérios de inclusão	31
4.2.2	Critérios de exclusão	32
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
4.4	BIÓPSIAS	32
4.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUANTITATIVA.....	36
4.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DE INFLAMAÇÃO E NECROSE	38
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.9	MATRIZ DE CORRELAÇÃO	39
5	RESULTADOS	
5.1	ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DO ESTUDO DE LESÕES ULCERADAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	40
5.2	PERFIL CELULAR INFLAMATÓRIO DAS LESÕES DE PACIENTES COM LC COM INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO POSITIVA OU NEGATIVA.....	50
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	57
8	SUMÁRIO ILUSTRATIVO DAS CONCLUSÕES DO ESTUDO	58

REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	70
ARTIGO PUBLICADO: TISSUE DAMAGE IN HUMAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: CORRELATIONS BETWEEN INFLAMMATORY CELLS AND MOLECULE EXPRESSION	70
ARTIGO PUBLICADO: CHARACTERIZATION OF THE HISTOPATHOLOGIC FEATURES IN PATIENTS IN THE EARLY AND LATE PHASES OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS	77

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Cutânea (LC) é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das oito doenças tropicais negligenciadas e o número de casos em áreas endêmicas tem aumentado significativamente nos últimos anos (PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). Atualmente, a doença é endêmica em 102 países e nos últimos anos tem sido cada vez mais observada entre migrantes, viajantes, ecoturistas e militares (MANSUETO et al., 2014). É uma doença desfigurante, inclusive as lesões podem mimetizar outras dermatoses, podendo dificultar o diagnóstico e deixar cicatrizes em locais visíveis do corpo, causando problemas psicológicos, sociais e econômicos.

A LC caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesão ulcerada única ou múltiplas na pele, resultante da inoculação das formas infectivas da *Leishmania Viannia braziliensis*, geralmente em áreas do corpo no local da infecção. Na maioria dos casos, uma linfadenopatia antecede a lesão ulcerada que evolui com um eritema, torna-se uma pápula que ulcera, formando uma lesão com aspecto arredondado e profundo com as bordas elevadas (COSTA et al., 2009; REITHINGER et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009). A úlcera evolui de forma crônica e usualmente cicatriza quando os pacientes recebem a terapia recomendada pelo Ministério da Saúde, podendo ainda ter cura espontânea (MARSDEN, 1994; BRASIL, 2010). Entretanto, o tratamento com antimonial pentavalente não é eficaz na fase inicial da infecção (CARVALHO et al., 1995; MACHADO et al., 2002). Adicionalmente, tem sido crescente o número de casos de lesões disseminadas e alguns pacientes desenvolvem lesões mucocutâneas (SILVA et al., 2017). Este espectro de manifestações clínicas depende da resposta inflamatória, que por sua vez, é essencial para o controle dos parasitas.

Após a inoculação das promastigotas presentes na saliva dos flebotomíneos, ocorre o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da infecção. Os neutrófilos, macrófagos e

células dendríticas são recrutadas para controlar a disseminação dos parasitas, importantes na ativação da resposta imune adaptativa (MAURER; DONDJI; VON STEBUT, 2009). Na borda das úlceras observa-se um infiltrado inflamatório denso de linfócitos T e B, macrófagos e plasmócitos (DA-CRUZ et al., 2005). As células *natural killer* (NK) atuam na defesa contra os parasitas através da produção de interferon gama (IFN- γ) no início da infecção para ativar macrófagos e, conseqüentemente matar as *Leishmanias* (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998). Macrófagos também são ativados pelas células T CD4⁺ e CD8⁺, que através da secreção de níveis elevados de IFN- γ e TNF- α , quimiocinas, e da atividade citotóxica mediada por CD8 e NK, induzem a apoptose das células infectadas (RUIZ; BECKER, 2007). A ativação do inflamassoma e produção de IL1- β torna o ambiente ainda mais inflamatório (NOVAIS et al., 2017). A resposta imune humoral é eficiente contra várias doenças infecciosas agudas, no entanto, na infecção crônica causada pela *Leishmania*, é controversa e pode desregular a resposta imune tendo efeito deletério (SILVA-BARRIOS; CHARPENTIER; STÄGER, 2017).

Nos estudos em modelo murino de leishmaniose, a evolução da lesão tecidual pode ser dividida em duas fases. Uma fase inicial, assintomática, durante a qual ocorre o pico da carga parasitária na derme com ausência de lesão tecidual. E uma segunda fase, onde há o desenvolvimento da doença que se caracteriza por intensa inflamação do tecido infectado e formação da lesão, indicando que o dano tecidual é mediado por uma resposta imune inflamatória e não somente pela presença do parasito (BELKAID et al., 2000; NAIK et al., 2012). É conhecido que o curso da doença é determinado pela natureza e magnitude da resposta imune orquestrada por linfócitos T específicos, os quais exercem um papel central no controle da replicação parasitária e na destruição tecidual (NYLÉN; EIDSMO, 2012; SILVEIRA et al., 2009).

A ativação de linfócitos T específicos aos antígenos de *Leishmania* resulta na geração de células efetoras e persistência de linfócitos T de memória. Neste contexto, a distribuição e

as características funcionais de células efetoras que participam da patogênese e do processo de cura clínica parecem ter relevante papel no controle da infecção. Os mecanismos envolvidos na geração e manutenção das células envolvidas na resposta anti-*Leishmania* ainda não estão completamente elucidados e a indefinição dos mecanismos protetores e imunopatológicos resultam na dificuldade em disponibilizar métodos profiláticos e esquemas terapêuticos alternativos bem estabelecidos. Assim, a identificação de mecanismos imunológicos associados à cura e à proteção continua sendo um desafio para a geração de candidatos vacinais para a leishmaniose humana. Particularmente, a LC causada por *L. braziliensis* representa um importante alvo de estudo da resposta imune associada ao controle da infecção, visto que uma parte da população na área endêmica tem a intradermorreação positiva mesmo sem apresentar a doença.

Apesar de sabermos que a resposta imune pode ser essencial para o desfecho clínico da LC, ainda não estão definidos quais seriam os demais fatores pelos quais os pacientes curam espontaneamente ou desenvolvem a doença, ou por que falham a terapêutica e até, por vezes, evoluem para recidivas ou desenvolvem formas mucosas e disseminadas. Estabelecemos correlações entre as células inflamatórias e achados histopatológicos de pacientes com lesões ulceradas de LC, comparações entre grupos de pacientes que apresentaram ou não linfadenopatia e, adicionalmente, grupos de pacientes que realizaram o teste da IDRMM com resultado negativo ou positivo. Diferentemente do que temos encontrado na literatura, onde as pesquisas abordam a resposta sistêmica na LC, com análise de PBMCs e modelos murinos, nosso estudo buscou focar os aspectos clínicos e histopatológicos observando a resposta imune local, caracterizando o tecido através de fragmentos de pele coletados da borda da úlcera de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea localizada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania*. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera uma doença emergente e não controlada (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). O termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) refere-se à infecção pela *Leishmania* que afeta a pele e mucosas. Várias espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* causam LTA em humanos, incluindo *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. shawi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, encontradas apenas no Novo Mundo (LAINSON, 2010; ROQUE; JANSEN, 2014; SOUZA; SOUZA; BOTELHO, 2012). As diferenças entre as espécies de *Leishmania* podem levar à diversas manifestações clínicas e respostas terapêuticas (BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; CHRISTENSEN et al., 2018; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Embora a maioria dos casos sejam notificados em países pobres, as leishmanioses podem ocorrer em países da Europa, Américas e Ásia (PACE, 2014). Entretanto, 75% desses casos são encontrados no Brasil, na Síria e no Afeganistão. Com a expansão geográfica da LTA durante a década de 1980, a doença atinge 19 estados brasileiros e, em 2003, foram confirmados casos autóctones nos 27 estados do país. Apesar da ampla dispersão no território nacional, há intensa concentração de casos em determinadas áreas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, enquanto em outras, os casos apresentam-se isolados. A doença é prevalente principalmente na Amazônia, Bahia, Minas Gerais, na região do Triângulo Mineiro e nas regiões próximas à bacia do rio Mucuri e do rio Doce, em São Paulo, na região sul que abrange a área de Mata Atlântica e nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e

Goiás (RANGEL; LAINSON, 2009). Contudo, a taxa de incidência da doença provavelmente é subestimado, devido aos casos nem sempre serem diagnosticados e à não obrigatoriedade de notificações (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

2.2 TRANSMISSÃO

A LTA está associada às condições climáticas tropicais que favorecem o desenvolvimento dos flebotomíneos (MAROLI et al., 2013). Essa transmissão mediada pelo flebótomo pode seguir um ciclo antroponótico ou zoonótico que varia de acordo com a região. *Leishmanias* são parasitas intracelulares que tem um ciclo de vida digenético, transmitido pelas fêmeas infectadas para um hospedeiro vertebrado suscetível. Isso significa que o ciclo desses protozoários depende de uma transmissão bem sucedida entre o vetor, o reservatório e os hospedeiros finais (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019).

São dois os estágios de desenvolvimento, as formas amastigotas, que sobrevivem dentro dos macrófagos dos mamíferos e, as promastigotas, presentes no tubo digestivo do flebotomíneo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). As fêmeas do flebótomo adquirem macrófagos infectados com amastigotas quando se alimentam do sangue de mamíferos infectados. Após o repasto sanguíneo, os amastigotas se transformam em promastigotas, amadurecem e se dividem em até três dias após a ingestão no intestino do flebotomíneo. Em seguida, os promastigotas migram para a probóscide do flebotomíneo e estão prontos para serem regurgitados na pele do vertebrado no próximo repasto (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; PACE, 2014). As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de uma interação complexa entre a espécie infectante e a resposta imune do hospedeiro. O ciclo de transmissão da *Leishmania* entre vetor, reservatório e hospedeiro está representado na figura 1.

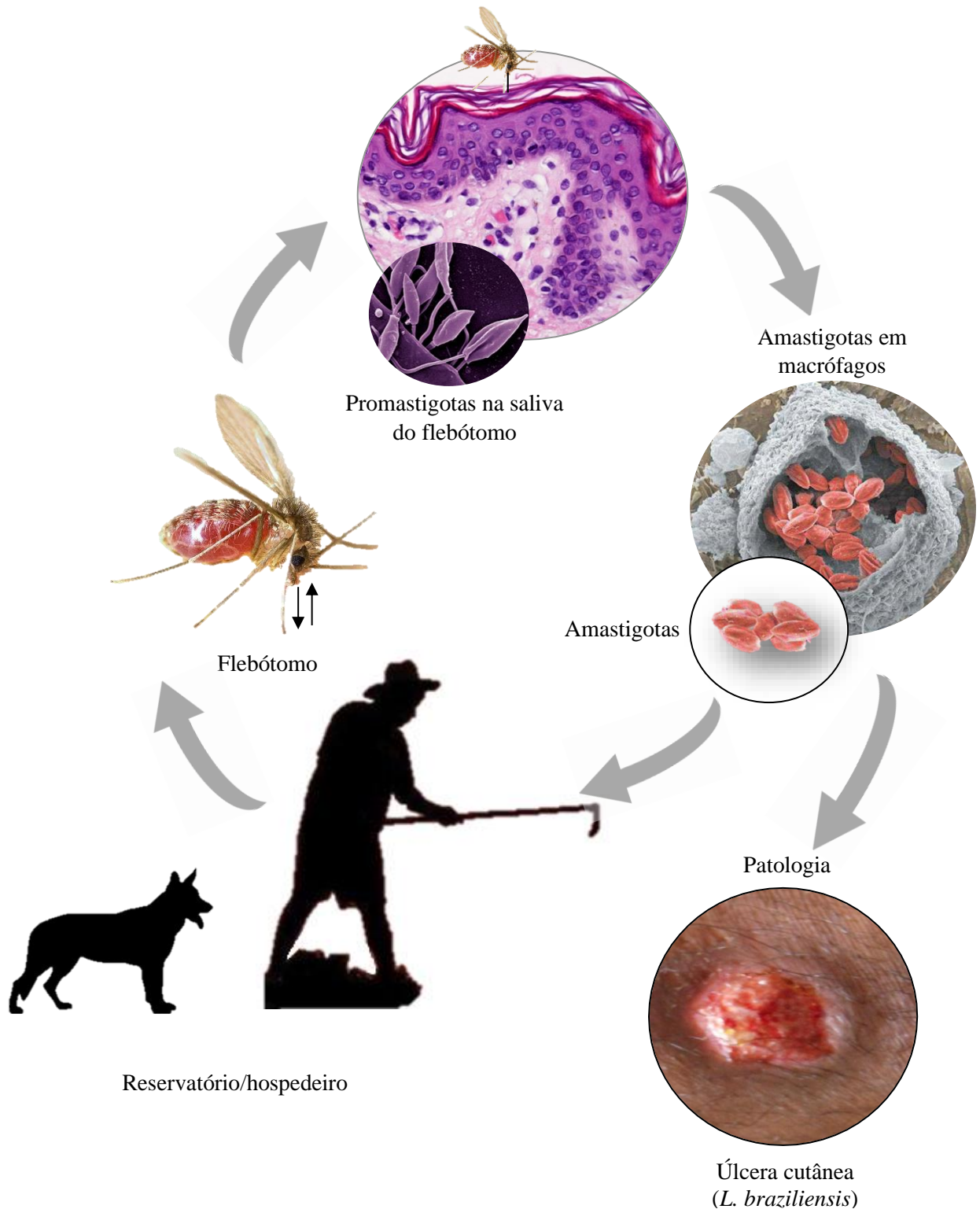


Figura 1. Ciclo de transmissão da leishmaniose cutânea. A *Leishmania* é transmitida pela picada de flebotomíneas infectadas, que utilizam mamíferos silvestres e domésticos como reservatórios. Durante o repasto sanguíneo, as flebotomíneas inoculam na pele do hospedeiro as formas infectivas da *Leishmania*, as promastigotas, que são fagocitadas pelos macrófagos e outras células mononucleares fagocíticas. Dentro dessas células, as promastigotas se transformam em amastigotas, as mesmas formas encontradas nos reservatórios, completando assim o ciclo de vida digenético da *Leishmania*. O desenvolvimento de uma patologia depende da interação entre os parasitas e a resposta imunológica do hospedeiro.

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

As lesões na LTA são pleomórficas nas suas apresentações clínicas. A Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), se manifesta com uma ou até dez lesões ulceradas na pele. A Leishmaniose Disseminada (LD), apresenta pápulas disseminadas, sendo uma úlcera inicial primária e acima de dez lesões secundárias papulosas. E a Leishmaniose Mucocutânea (LM), ocorre após uma lesão cutânea, evoluindo com úlceras nas mucosas nasal e bucal (ARENAS et al., 2017).

A LCL é a manifestação mais comum, podendo progredir dentro de semanas ou meses de pápulas ou nódulos a lesões ulceradas (LAINSON; SHAW, 2010). As lesões cutâneas podem curar espontaneamente, mas também há casos de recidiva durante e após o tratamento (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016; STRAZZULLA et al., 2013). Em alguns pacientes as lesões permanecem durante anos, período que pode ser caracterizado por deficiência de função, susceptibilidade à infecções secundárias e desenvolvimento de desfigurações e cicatrizes permanentes (CARVALHO et al., 1994; COSTA et al., 1986, 2009; PACE, 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016).

Geralmente, o diagnóstico da LCL é feito pelas características clínicas das úlceras associadas à detecção do parasita por vários métodos de diagnóstico laboratoriais. As formas amastigotas de *Leishmania* são estruturas intracelulares arredondadas com 1,5 µm a 3,0 µm, identificadas em amostras de biópsia de lesão de pele por observação microscópica óptica. Além da detecção de parasitas pela histopatologia (ELMAHALLAWY et al., 2014), é possível realizar testes indiretos com sorologia, cultura parasitária e diagnósticos moleculares (GOTO; LINDOSO, 2010) para detectar o DNA do parasita, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é aplicada especialmente nos casos em que os amastigotas não são visualizados por microscopia óptica. Contudo, o diagnóstico parasitológico ainda é considerado o padrão-ouro no diagnóstico das leishmanioses devido à sua alta especificidade. Principalmente pelo

exame para a detecção do parasita e em cultivos *in vitro* a partir de material de lesões suspeitas, buscando a identificação direta de amastigotas em biópsias, raspagens ou esfregaços (DEVRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

2.4 INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

O teste cutâneo para determinação da infecção por *Leishmania*, também chamado de intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou teste de hipersensibilidade tardia (DTH) é uma forma indireta de diagnóstico laboratorial baseado na mensuração da induração após injeção intradérmica de antígenos do parasito. Posteriormente, o indivíduo é avaliado entre 48 e 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de induração igual ou maior que 5 mm de diâmetro. O teste é produzido com parasitas mortos ou com antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL) e apresenta alta sensibilidade e alto valor preditivo para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar (LT) causada por *L. braziliensis*. Este método indireto complementa o diagnóstico clínico-epidemiológico e laboratorial (BRASIL, 2017; VEGA-LÓPEZ, 2003) e tem sido utilizado para identificar indivíduos expostos a *Leishmania*, mas que não desenvolvem doenças (DAVIES et al., 1995; FOLLADOR et al., 2002; SCHNORR et al., 2012). Pacientes com LM usualmente apresentam IDRM exacerbada, com vários centímetros de induração, enquanto nos pacientes com LC a resposta é moderada.

A IDRM está associada à proliferação linfocitária e produção de IFN- γ em células sanguíneas periféricas estimuladas com ASL (CARVALHO et al., 1994). Uma IDRM negativa durante a infecção por *L. amazonensis* está associada a um comprometimento da resposta das células T, replicação parasitária e desenvolvimento de múltiplas lesões nodulares com macrófagos cheios de parasitas, como observado na leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BARRAL et al., 1995b; SILVEIRA et al., 2009). Além disso, uma IDRM negativa também é

observada na leishmaniose visceral (LV), uma doença associada à disseminação do parasita (EVANS et al., 1992; JERONIMO et al., 1994).

A vila de Corte de Pedra é reconhecida como uma das áreas mais importantes de transmissão de *L. braziliensis* na América Latina e mais de 1000 casos de LC são vistos anualmente no Posto de Saúde de Corte de Pedra. Embora a positividade da IDRМ nesses pacientes seja superior a 95%, observamos que pacientes com úlceras típicas de LC podem ter uma IDRМ negativa. Por isso, comparamos a resposta imune de pacientes com LC que apresentaram IDRМ⁻ com aqueles IDRМ⁺.

2.5 A RESPOSTA IMUNE INATA

As células *natural killer* (NK), estranhamente traduzidas por “assassinas naturais” são recrutadas para o local no estágio inicial da infecção (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; PASSERO et al., 2010). Elas se caracterizam por serem grandes leucócitos granulares que desempenham um papel fundamental na resposta imune inata (LANIER, 2008). Essas células são importantes para definir a evolução da doença, restringindo a disseminação precoce do parasita através da lise direta de células parasitadas.

Estudos realizados em modelos murinos mostraram que o aumento na carga parasitária está diretamente associado à ausência das células NK (HERNANDEZ SANABRIA et al., 2008; LAURENTI et al., 1999; SCHARTON; SCOTT, 1993). As *Leishmanias* parecem ter alguns mecanismos de evasão ou mesmo inibição de migração e atividade das células NK. Em camundongos infectados com *L. major*, foi observado que as células NK exibem uma forte capacidade de proliferação que atinge o máximo de 12 a 48 horas após a infecção, e um posterior declínio (BOGDAN, 2012; HERNANDEZ SANABRIA et al., 2008; LAURENTI et al., 1999; SCHARTON; SCOTT, 1993). Quando efetivas, essas células podem ser

inflamatórias, reguladoras e citotóxicas. Elas produzem precocemente citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , que favorece a diferenciação das células CD4⁺ Th1 e, juntamente com TNF- α , ativam macrófagos (LAURENTI et al., 1999; MORGADO et al., 2008; SCHATTON; SCOTT, 1993).

Macrófagos são células presentes na maioria dos tecidos e podem estar envolvidos numa variedade de processos biológicos que incluem, entre outros, a participação na cicatrização, na resposta imune através da fagocitose e, principalmente, a apresentação de antígenos às células T (MCCORMICK; STEVENS; KANG, 2000). Macrófagos são as células hospedeiras finais dos parasitas de *Leishmania* (LIU; UZONNA, 2012). Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, as formas promastigotas sofrem diferenciação morfológica transformando-se em amastigotas, capazes de resistir aos mecanismos de destruição e sobreviver dentro das células (LIU; UZONNA, 2012). Adicionalmente, as amastigotas dentro dos macrófagos se replicam e induzem a cronicidade da infecção cutânea mantendo a inflamação na derme (LIU; UZONNA, 2012). As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α estimulam os macrófagos contribuindo com o controle parasitário, mas também promovem a necrose tecidual como consequência de uma intensa resposta imune que favorece o desenvolvimento de lesões graves (GAAFAR et al., 1995).

2.6 A RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA E OS LINFÓCITOS

Linfócitos T CD4⁺ são as principais células produtoras de IFN- γ (SANTOS et al., 2013) as quais, juntamente com o TNF- α , permanecem ativando macrófagos para impedir a proliferação parasitária nas fases iniciais da infecção. Entretanto, se esta resposta inflamatória for muito intensa pode contribuir para a destruição tecidual (BACELLAR et al., 2002).

Linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel fundamental na resposta imune anti-*Leishmania*, através do reconhecimento de antígenos e produção de citocinas.

Embora pouco se discuta sobre o papel da atividade citotóxica das células CD4⁺ na infecção por *Leishmania*, tem sido demonstrado uma alta frequência de subconjuntos de células T CD4⁺ produtoras também de granzima B, as quais já foram encontradas em indivíduos que infectados por *L. major* (NAOUAR et al., 2014). A produção de moléculas citotóxicas pelas células T CD4⁺ também foi detectada, principalmente em indivíduos assintomáticos para LC (EGUI et al., 2018). No entanto, são necessários mais estudos para determinar os possíveis papéis dessas células e entender as implicações para proteção e danos.

Linfócitos T CD8⁺ desempenham um papel crucial na resposta imune da LC (BRODSKYN et al., 1997; DA-CRUZ et al., 2005, 2002; FARIA et al., 2009; HERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2010; RUIZ; BECKER, 2007). Entretanto, vários autores também têm sugerido que linfócitos T CD8⁺ podem contribuir tanto para a destruição parasitária quanto para o dano tecidual (BOUSOFFARA et al., 2004; CARDOSO et al., 2015; ESTERRE et al., 1992; FARIA et al., 2009; NYLÉN; EIDSMO, 2012; SANTOS et al., 2013).

Estudos mostraram que linfócitos T CD8⁺ eliminam macrófagos infectados contribuindo para a resolução da infecção (COUTINHO et al., 1998; DA-CRUZ et al., 1994). Linfócitos T CD8⁺ produzindo IFN- γ foram associados à resolução da infecção (DA-CRUZ et al., 2002; ROSTAMI et al., 2010), pois grandes quantidades de IFN- γ produzido por T CD8⁺ logo após a infecção reduziu a carga parasitária antes do desenvolvimento da lesão em modelo experimental murino (BERTHOLET et al., 2005). Além disso, os linfócitos T CD8⁺ também teriam um papel modulador sobre os linfócitos T CD4⁺, indicando que o equilíbrio entre estas células configura uma etapa importante para o processo de controle da infecção e cicatrização da lesão (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; DA-CRUZ et al., 2005). Outros estudos argumentam que estas células participam do estabelecimento e progressão da doença,

principalmente através de mecanismos citotóxicos (BARRAL-NETTO et al., 1995; BRODSKYN et al., 1997; SANTOS et al., 2013).

2.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA

A atividade citotóxica das células T CD8⁺ é importante para a eliminação do parasita (BARRAL-NETTO et al., 1995; DA-CRUZ et al., 1994; JORDAN; HUNTER, 2010; KHAN; SMITH; KASPER, 1988; MONTOYA et al., 1996; PURNER et al., 1996; SANTOS et al., 2013). Os linfócitos T CD8⁺ induzem a apoptose de monócitos infectados na LC, mas ainda assim a resposta é insuficiente (CARDOSO et al., 2015; SANTOS et al., 2013). Enquanto a atividade citotóxica induz a morte da célula-alvo, a exacerbação das vias inflamatórias mediadas pela citocinas como IFN- γ e TNF- α não são reguladas adequadamente, e podem ocorrer distúrbios inflamatórios e danos nos tecidos (ARIAS et al., 2014; FOLLADOR et al., 2002; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998).

Linfócitos T CD8⁺ e células NK participam da resposta imune contra a *L. braziliensis*, contribuindo com a produção de TNF- α e através da atividade citotóxica. MACHADO et al., 2002, observaram linfócitos T CD8⁺ e células NK e suas atividades citotóxicas em lesões de pacientes com LC, sugerindo não apenas a participação ativa dessas células na destruição de parasitas, mas também seu papel na ulceração.

A atividade citotóxica é observada em uma variedade de células imunes, incluindo os os linfócitos T CD8⁺ e células NK, que destroem alvos através da liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas. A perforina promove a formação de poros nas membranas das células alvos, facilitando a entrada de granzimas e induzindo a morte celular programada através da fragmentação do DNA (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007; RUIZ; BECKER, 2007; TRAPANI, 2001; TRAPANI; SMYTH, 2002).

Uma provável explicação sobre os mecanismos das células citotóxicas para mediar a inflamação e a lesão tecidual na LC é através da degranulação das células citotóxicas, liberando granzima B e perforina no espaço extracelular para induzir a apoptose de macrófagos infectados e células vizinhas. Fragmentos de células são fortes estímulos para recrutamento de novas células inflamatórias. Adicionalmente, a granzima extracelular B pode induzir indiretamente a inflamação através da ativação de citocinas pró-inflamatórias e degradação dos substratos da matriz extracelular, contribuindo para o aumento na destruição tecidual. Esses dados sugerem um papel importante das granzimas na amplificação da inflamação e consequente destruição tecidual nas infecções por *Leishmania* (CAMPOS et al., 2017).

Novais e cols. (2013), mostraram o efeito deletério dos linfócitos T CD8⁺ em camundongos infectados por *L. braziliensis*. Nos animais, a progressão das úlceras e o aparecimento de metástases foram associados à presença de linfócitos T CD8⁺ e perforina, indicando que a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ são importantes também para a patologia da LCL. Essa ambiguidade de um papel protetor e um papel patológico dos linfócitos T CD8⁺ na leishmaniose cutânea depende também da carga parasitária.

A granzima B foi encontrada na matriz extracelular de tecidos, plasma e exsudato de feridas crônicas (BOIVIN et al., 2009; HIEBERT; GRANVILLE, 2012). Granzimas extracelulares podem induzir a produção de uma variedade de citocinas e promover danos aos tecidos, atrasando assim o reparo tecidual (AFONINA et al., 2011; HIEBERT; GRANVILLE, 2012; OMOTO et al., 2010). Além disso, foi observado que a inibição *in vitro* da granzima B diminuiu significativamente os níveis de TNF- α em PBMCs de pacientes com LC (CAMPOS et al., 2019).

2.8 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS POR *L. braziliensis*

O papel da IL-1 β durante a infecção por *Leishmania* é considerado controverso (ZAMBONI; SACKS, 2019). IL-1 β é produzida como um polipeptídeo que é processado após a ativação do inflamassoma, inserido em um complexo molecular composto por proteínas (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Há a hipótese de que a *Leishmania* pode ativar o inflamassoma na pele indiretamente, quando os parasitas são fagocitados por células imunes inatas (LIMA-JUNIOR et al., 2013; SCOTT; NOVAIS, 2016) ou ativando uma via indireta não canônica (ZAMBONI; SACKS, 2019). Outros componentes derivados do vetor também podem participar da ativação da IL-1 β (DEY et al., 2018). Foi demonstrado que a IL-1 β pode promover a expansão das células Th1 mediada por IL-12, estimula a produção de óxido nítrico e TNF- α , que juntos contribuem para eliminar os parasitas (ALEXANDER; BRYSON, 2005; LIMA-JUNIOR et al., 2013). No entanto, num estudo com pacientes infectados pela *L. mexicana* a expressão elevada de IL-1 β foi associada à gravidade da doença (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2012). Embora conflitantes, esses achados também dependem da espécie infectante, pois interfere nos mecanismos responsáveis pela resistência ou suscetibilidade. Foi relatado que pacientes infectados por *L. braziliensis* e apresentando lesões ulceradas exibem níveis mais elevados de células T CD8⁺ do que pacientes com lesões não ulceradas (FARIA et al., 2009).

Muitos estudos mostraram que o IFN- γ participa da ativação das células fagocíticas, induzindo a morte do parasita (KAYE; SCOTT, 2011; NOVAIS et al., 2014), mas existem várias fontes celulares de IFN- γ (CARDOSO et al., 2015; NOVAIS et al., 2014). Embora em pacientes com LC a maioria das células que expressam IFN- γ seja CD4⁺ e células T CD8⁺, as células CD3⁻CD56⁺ (células NK) foram a principal fonte de IFN- γ em indivíduos expostos a *L. braziliensis* que não desenvolveram a doença. A produção de IFN- γ pode ter um papel duplo na infecção por *L. braziliensis*. Em pacientes com LC, existe uma correlação positiva entre a

frequência de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e o tamanho da lesão (ANTONELLI et al., 2005). Além disso, os níveis de IFN- γ são mais altos na LC do que na infecção dos indivíduos subclínicos (FOLLADOR et al., 2002; NOVOA et al., 2011). Consequentemente, é provável que, no início da infecção, a produção de IFN- γ esteja relacionada à proteção, enquanto na fase tardia esteja associada à doença. Na LC causada pela *L. braziliensis*, praticamente todos os pacientes apresentam resultados positivos de IDR e produzem IFN- γ *in vitro*. O relato de que as células NK são a principal fonte de IFN- γ na infecção de pacientes subclínicos também pode explicar a única concordância entre os resultados do teste cutâneo e a produção de IFN- γ nesses indivíduos. Nesse cenário, a resposta ao teste cutâneo pode estar relacionada às células T, enquanto o IFN- γ é produzido pelas células NK.

2.9 A RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Linfócitos B são fundamentais para a resposta humoral, responsáveis pela geração de anticorpos específicos aos antígenos e são ativados por linfócitos T específicos, denominada ativação B dependente de T (ANAYA JM et al., 2013; RODRIGUEZ-PINTO; SARAIVA; MCMAHON-PRATT, 2014). Essas células tornam-se ativadas após a exposição a antígenos exógenos, que são internalizados, levando à replicação e diferenciação de células B efectoras e produção de anticorpos (ANAYA JM et al., 2013). Vários estudos sugerem que as células B podem estar envolvidas na exacerbação das infecções por *Leishmania*, causadas por *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, embora o mecanismo específico ainda seja desconhecido (BANKOTI et al., 2012; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; WANASEN; XIN; SOONG, 2008).

Estudos com diferentes linhagens de camundongos infectados por *Leishmania* spp. revelaram que as células B podem ter um papel no desenvolvimento da imunidade contra a

infecção por *Leishmania* (SCOTT; NATOVITZ; SHER, 1986; WOELBING et al., 2006), desempenharam um papel fundamental na morte de parasitas intracelulares de *L. amazonenses* e curaram a infecção (MUKBEL; PETERSEN; JONES, 2006). Mais recentemente, mostrou-se que células B de camundongos resistentes co-infectados com *L. major* e *L. amazonensis* promovem a diminuição de parasitas (GIBSON-CORLEY; JONES; HOSTETTER, 2010).

Observou-se uma relação inversa entre os anticorpos IgE anti-*Leishmania* no soro e o número de úlceras cutâneas em pacientes com LC (SOUSA-ATTA et al., 2002). Anticorpos IgE são produzidos na resposta imune Th2 e a participação dessas imunoglobulinas na LC pode ser interpretada como um mecanismo protetor para impedir a disseminação cutânea da infecção, modulando a resposta inflamatória da pele mediada pelas citocinas Th1 (O'NEIL; LABRADA; SARAVIA, 1993).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar fatores no processo inflamatório tecidual que contribuem para a formação de lesões ulceradas em pacientes com LC causada por *L. braziliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar as áreas de inflamação e de necrose das secções de pele dos casos de leishmaniose cutânea localizada.
- Identificar e quantificar por imunoistoquímica (IHQ) a quantidade de amastigotas de *L. braziliensis*.
- Identificar por imunoistoquímica as populações de macrófagos CD68⁺, linfócitos T CD4⁺ CD8⁺, B CD20⁺ e células CD57⁺ NK, quantificando-as nas biópsias de úlceras de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.
- Identificar por imunoistoquímica e quantificar a expressão de citocinas, IL-1 β e TNF- α , nas biópsias de úlceras de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.
- Identificar por imunoistoquímica e quantificar a produção de moléculas citotóxicas, granzimas B e perforina, nas biópsias de úlceras de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.
- Correlacionar as células imunomarcadas às áreas de inflamação e necrose das secções histológicas de lesões ulceradas causadas pela *L. braziliensis*.
- Comparar a resposta imune de pacientes com LC que apresentaram IDRM⁻ com aqueles IDRM⁺.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS GERAIS

Este é um estudo de corte transversal, com amostra de conveniência, de caráter investigativo e descritivo, cujo objetivo principal é identificar no processo inflamatório *in situ* quais fatores e células contribuem para a formação da lesão em pacientes com Leishmaniose Cutânea causada por *L. braziliensis*. Foram incluídas 22 biópsias de pele de LCL e para o estudo comparativo da IDRМ, foram 25 biópsias, 12 IDRМ⁺ e 13 IDRМ⁻. Todos os pacientes foram atendidos no centro de saúde de Corte de Pedra, Bahia, no período de 2009 a 2018.

4.2 DADOS CLÍNICOS

As informações clínicas como dados sobre idade, gênero, local e tamanho da lesão e estimativa do período da lesão fornecida pelo paciente foram coletadas retrospectivamente a partir dos prontuários. Foi realizado o cálculo do diâmetro da circunferência ($C = 2 \cdot \pi \cdot r$) para aferir o tamanho da lesão, assim, os valores referentes a estes dados foram expressos em mm. O diagnóstico dos pacientes para LC foi confirmado em todos os casos através de biópsia, exame parasitológico direto e reação de Montenegro.

4.2.1 Critérios de inclusão

- a) Lesões ulceradas de 30 até 120 dias de evolução, típicas de leishmaniose cutânea clássica (LCC);

- b) Identificação de parasitas por análise histopatológica, PCR e/ou cultura para *L. braziliensis* positivos;
- c) Ter realizado o teste de IDRM;
- d) Biópsia antes do início do tratamento.

4.2.2 Critérios de exclusão

- a) Pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea com lesões atípicas.
- b) Pacientes grávidas;
- c) Pacientes HIV positivos e com diabetes;
- d) Pacientes com mais de 10 lesões cutâneas;
- e) Lâminas com artefatos que inviabilizam a análise histológica.

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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

4.4 BIÓPSIAS

As biópsias foram coletadas da borda da úlcera utilizando um *punch* de quatro milímetros mediante anestesia local. Os fragmentos foram fixados em formaldeído tamponado

a 10% para posterior processamento e corte no Serviço de Histotecnologia do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), onde também são realizadas as colorações em HE e Grocott para a análise histopatológica e diagnóstico diferencial. O aspirado do local da lesão foi realizado para cultura *in vitro* e um diminuto fragmento foi reservado em *RNA later* para realização da técnica de PCR no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e, posteriormente, os resultados foram anexados aos prontuários dos pacientes.

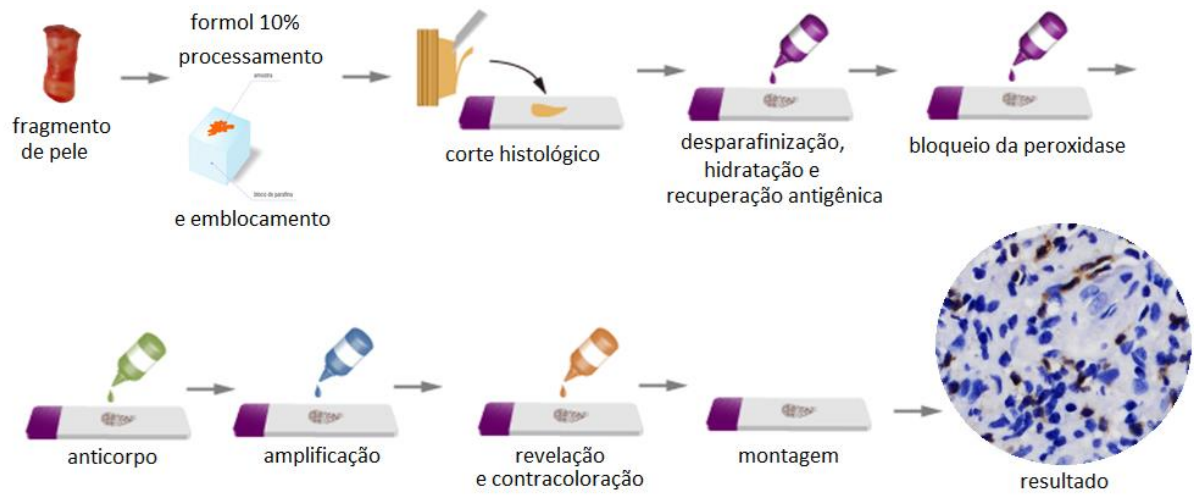
4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunistoquímica foram realizadas no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os cortes histológicos de 5 µm (cinco micrômetros) de espessura foram desparafinizados e reidratados utilizando xilol e álcool PA. Em seguida, para a recuperação antigênica foi utilizado tampão de pH 9.0 a 96° C durante 20 minutos. As reações de imunistoquímica foram realizadas após o bloqueio da atividade da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos e proteínas com bloqueio proteico sem soro (DAKO, Carpinteria, CA) durante 15 minutos. As lâminas foram incubadas overnight a 4° C com os anticorpos listados na Tabela 1. Foi utilizado o kit Peroxidase HorseRadish KP500, Mouse and Rabbit (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, EUA) para a revelação da reação de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as lâminas foram contrastadas com hematoxilina Harris, desidratadas e montadas com Permount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e lamínulas de vidro. Em todas as reações, um padrão pré-selecionado foi utilizado como controle positivo e uma seção que não havia sido incubada com o anticorpo primário, para o controle negativo. O resumo deste protocolo de imunistoquímica está representado na Figura 2A e o padrão de marcação dos anticorpos utilizados está exemplificado na Figura 2B.

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados para imunomarcção de células inflamatórias e moléculas nas secções histológicas de lesões ulceradas de pacientes com leishmaniose cutânea.

Anticorpo	Célula-alvo	Clone	Diluição	Marca
Monoclonal Mouse anti-CD4	Linfócitos T CD4 ⁺	EP204	1/50	ThermoFisher, Massachusetts, USA
Monoclonal Mouse anti-CD8	Linfócitos T CD8 ⁺	C8/144B	1/200	Cell Marque, Californie, USA
Monoclonal Mouse anti-CD20	Linfócitos B CD20 ⁺	clone L26	1/200	Dako, Californie, USA
Monoclonal Mouse anti-CD57	Células <i>natural</i> <i>killer</i> CD57 ⁺	Ab-1	1/100	ThermoFisher, Massachusetts, USA
Monoclonal Mouse anti-CD68	Macrófagos CD68 ⁺	PG M1	1/200	Dako, Californie, USA
Polyclonal Rabbit anti- <i>Leishmania</i>	Amastigotas de <i>Leishmania</i>	<i>in house</i>	1/1000	Schubach et al., 2001
Polyclonal Rabbit anti-TNF- α	Células TNF- α ⁺	orb129752	1/100	Biorbyt, Cambridge, UK
Monoclonal Mouse anti-IL-1 β	Células IL- 1 β - α ⁺	3AC	1/100	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Polyclonal Rabbit anti-Granzyme B	Células Granzima B ⁺	EP230	1/100	Cell Marque, Californie, USA
Monoclonal Mouse anti- Perforin	Células Perfonina ⁺	5B10	1/100	Cell Marque, Californie, USA

(A)



(B)

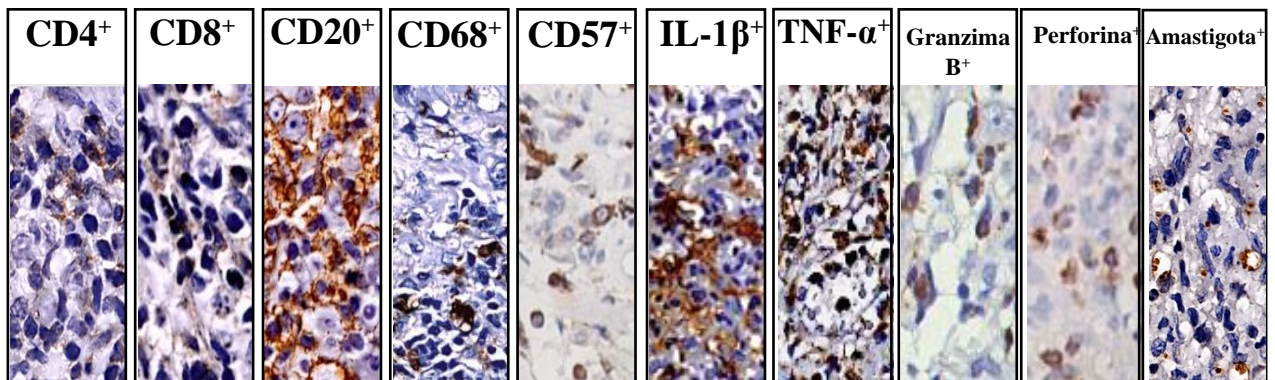
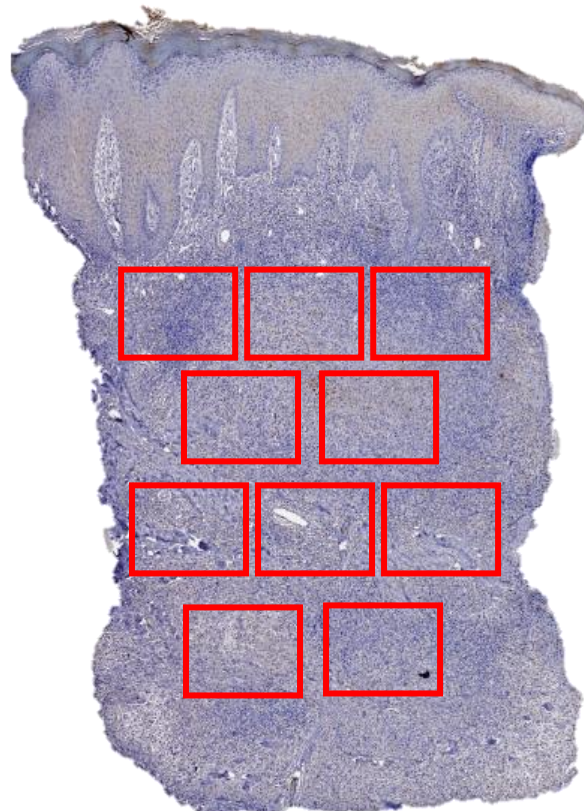


Figura 2. Imunoistoquímica nas seções histológicas de biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea. (A) Esquema representativo do protocolo realizado para a técnica de imunohistoquímica. (B) Painel de anticorpos e padrão de imunomarcção a partir de fotomicrografias das reações.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUANTITATIVA

O método para quantificação de células teve por base a histomorfometria de RODRIGUES DE SANTANA et al. (2014). Foi utilizado o microscópio modelo 90i (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) anexado a um sistema de câmera digital DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) com o software Nis-Elements, versão 3.1. Foram fotografados dez campos randomizados da derme de cada secção histológica, utilizando a objetiva de 40x para análise das células inflamatórias e a de 100x para contagem de amastigotas. Em cada campo, o número de células positivas foi quantificado utilizando o recurso de contagem semi-automática do software ImageJ, versão 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD), conforme representado na figura 3. As células positivas foram definidas pela identificação das moléculas amplificadas que reagiram com o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB), resultando na coloração marrom. (eBioscience, San Diego, CA).

(A)



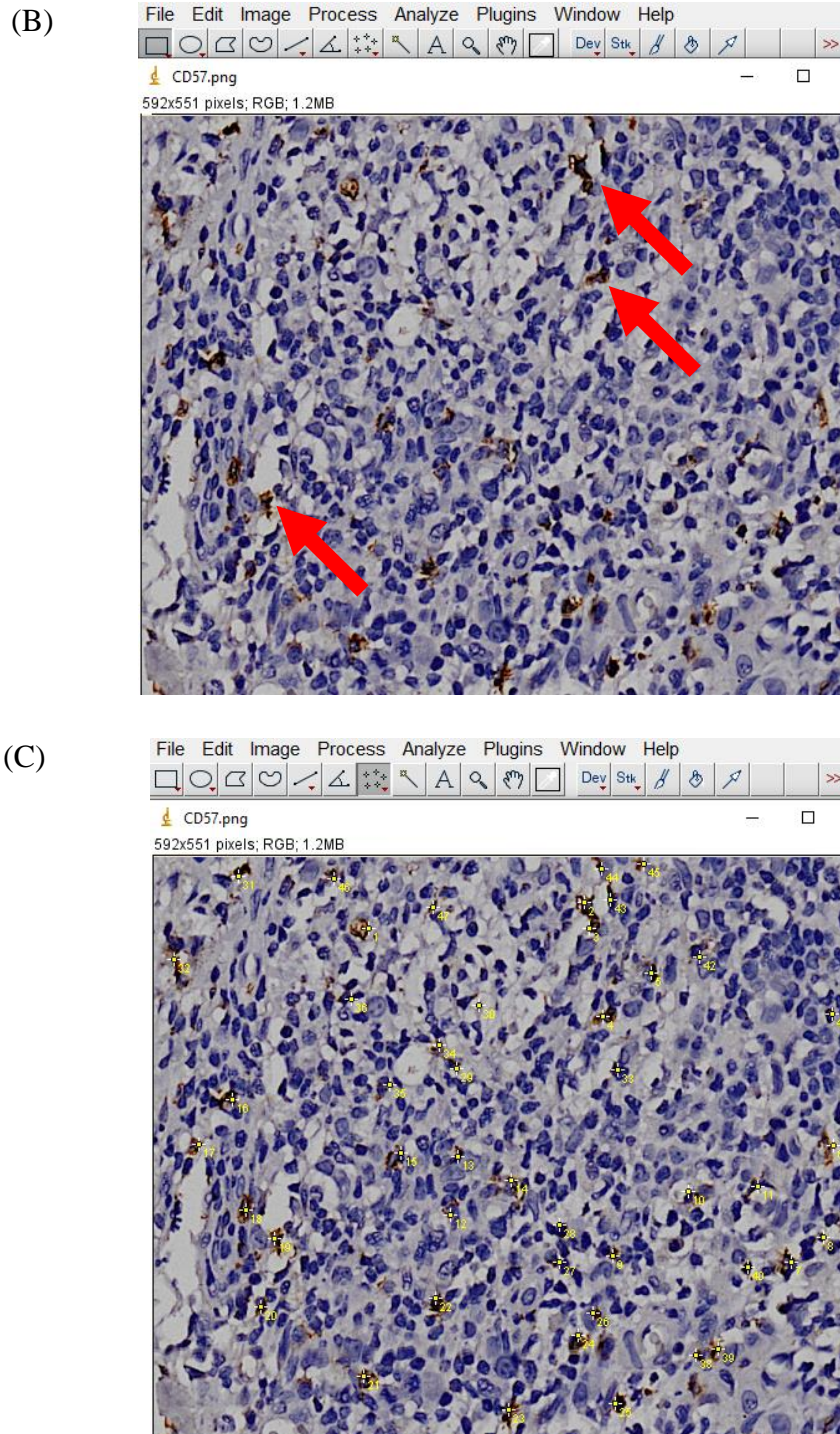


Figura 3. Exemplificação da análise quantitativa em secção histológica de biópsia de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea após imunohistoquímica. (A) Exemplo de seleção aleatória de 10 campos microscópicos na derme (retângulos vermelhos). (B) Visualização das células imunomarcadas em marrom (setas vermelhas). (C) Identificação e quantificação das células positivas (numeração amarela).

4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ÁREAS DE INFLAMAÇÃO E NECROSE

Todas as secções coradas em HE foram escaneadas por microscópio óptico com *scanner* acoplado (Olympus BX51) nas objetivas de 10x a 40x. As imagens das secções foram registradas no aumento digital de 0,7x, mediante visualização utilizando o software OlyVIA 2.7 (Olympus Corporation, 2013). A análise semi-automática foi realizada com o auxílio do software da ImageJ, versão 1.48, conforme exemplificado na figura 4.

Foram realizadas as medidas da área total do corte histológico e, em seguida, selecionadas as áreas de infiltrado inflamatório na derme. A área total do fragmento e o somatório das áreas de inflamação foram apresentados em mm². Desta maneira, foi possível mensurar a proporção em porcentagem (%) da inflamação por área total do fragmento.

Método semelhante foi utilizado para atribuir valores às áreas de necrose, quando presentes na biópsia. Todavia, como não foi possível visualizar essas áreas com precisão em pequenos aumentos, o registro das imagens foi feito com o aumento digital de 7x. Assim, foi possível percorrer toda a secção e identificar as áreas de necrose.

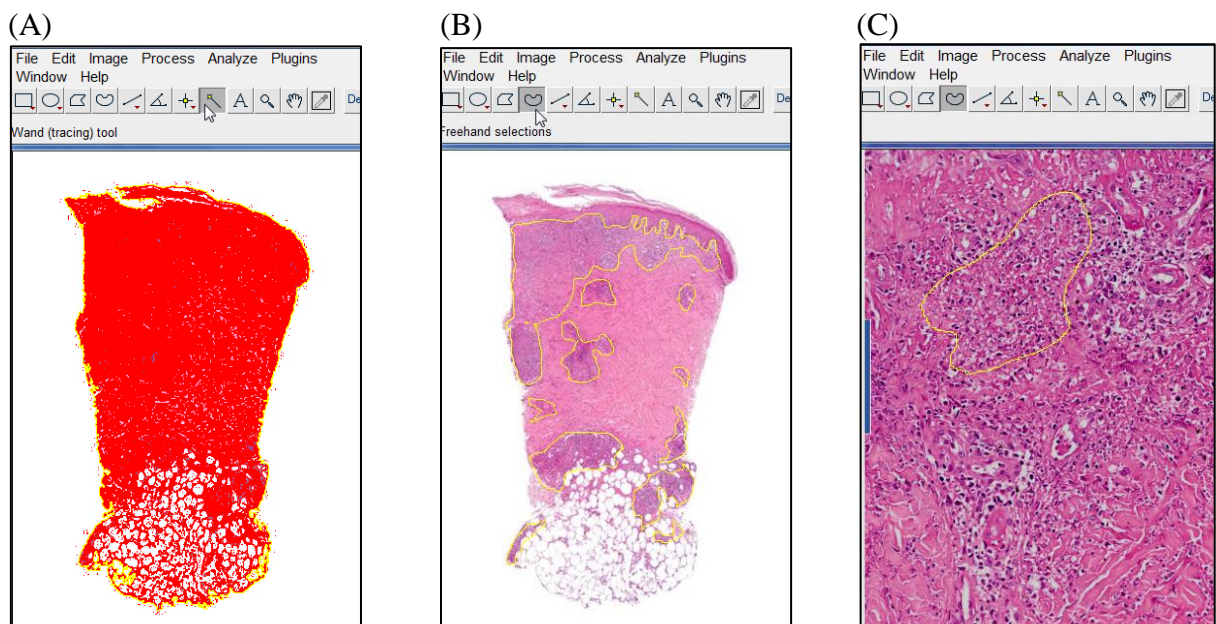


Figura 4. Exemplificação da análise morfométrica em secção histológica de biópsia de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea corada com hematoxilina e eosina. Seleção (A) da área total do corte, (B) da área de infiltrado inflamatório (C) e da área de necrose.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados em tabelas e gráficos onde os números representam valores absolutos ou proporções. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.01 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*) (Figura 4).

Para variáveis com distribuição normal, utilizamos o teste *Two-way ANOVA*. Para distribuição não-normal, o teste não paramétrico *Mann Whitney*. Para as correlações com variáveis de distribuição normal e não-normal, utilizamos os testes de *Pearson* e *Sperman*, respectivamente.

4.9 MATRIZ DE CORRELAÇÃO

A linguagem R através da interface RStudio (versão 1.2.5019) foi utilizada para traçar mapas de calor e matrizes de correlação entre os parâmetros e marcadores observados. As funções *corrplot* e *corrgram* foram usadas para traçar as matrizes de correlação, respectivamente, usando o método estatístico de Pearson. As correlações positivas são exibidas em azul e as negativas em vermelho. A intensidade da cor e tamanho do círculo são proporcionais aos coeficientes de correlação (Figura 5). Consideramos a classificação de DANCEY; REIDY (2006) que indicam a força da correlação quando (negativo ou positivo): $r = 0,10$ até $0,30$ (fraco); $r = 0,40$ até $0,60$ (moderado); $r = 0,70$ até $1,0$ (forte). Os resultados foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DO ESTUDO DE LESÕES ULCERADAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Vinte e dois pacientes foram incluídos no estudo cuja mediana da idade foi de 39 anos, foram 16 pacientes do sexo masculino, o que corresponde a 73% da amostra do estudo. Quinze pacientes apresentaram linfadenopatia. As úlceras foram localizadas com mais frequência nos membros inferiores (86%). A duração média das úlceras foi de 43 ± 25 dias no momento do exame do paciente, com um tamanho médio de lesão de 376 ± 336 mm² (Tabela 2).

Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea em Corte de Pedra – BA, de 2009 a 2014.

<u>Características</u>	<u>Valores</u>
Número de pacientes	22
Idade (média \pm desvio padrão)	40 ± 16
Masculino	16 (73%)
Presença de linfadenopatia	15 (68%)
Local da lesão:	
Membros superiores	3 (14%)
Membros inferiores	19 (86%)
Duração da lesão em dias (média \pm desvio padrão)	43 ± 25
<u>Tamanho da lesão em mm² (média \pm desvio padrão)</u>	<u>376 ± 336</u>

As figuras 5-8 ilustram as imunomarcações de células que expressam CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD57⁺, CD68⁺, IL-1 β ⁺, TNF- α ⁺, granzima B⁺ e perforina⁺ em biópsias de pele de pacientes com LCL. As células CD8⁺ foram as mais frequentes, seguidas pelas CD68⁺, CD57⁺ e CD4. Em relação às moléculas secretadas por essas células, a IL-1 β ⁺ e o TNF- α ⁺ foram as mais expressas, seguidas pela perforina⁺ e pela granzima B⁺ (Figura 10).

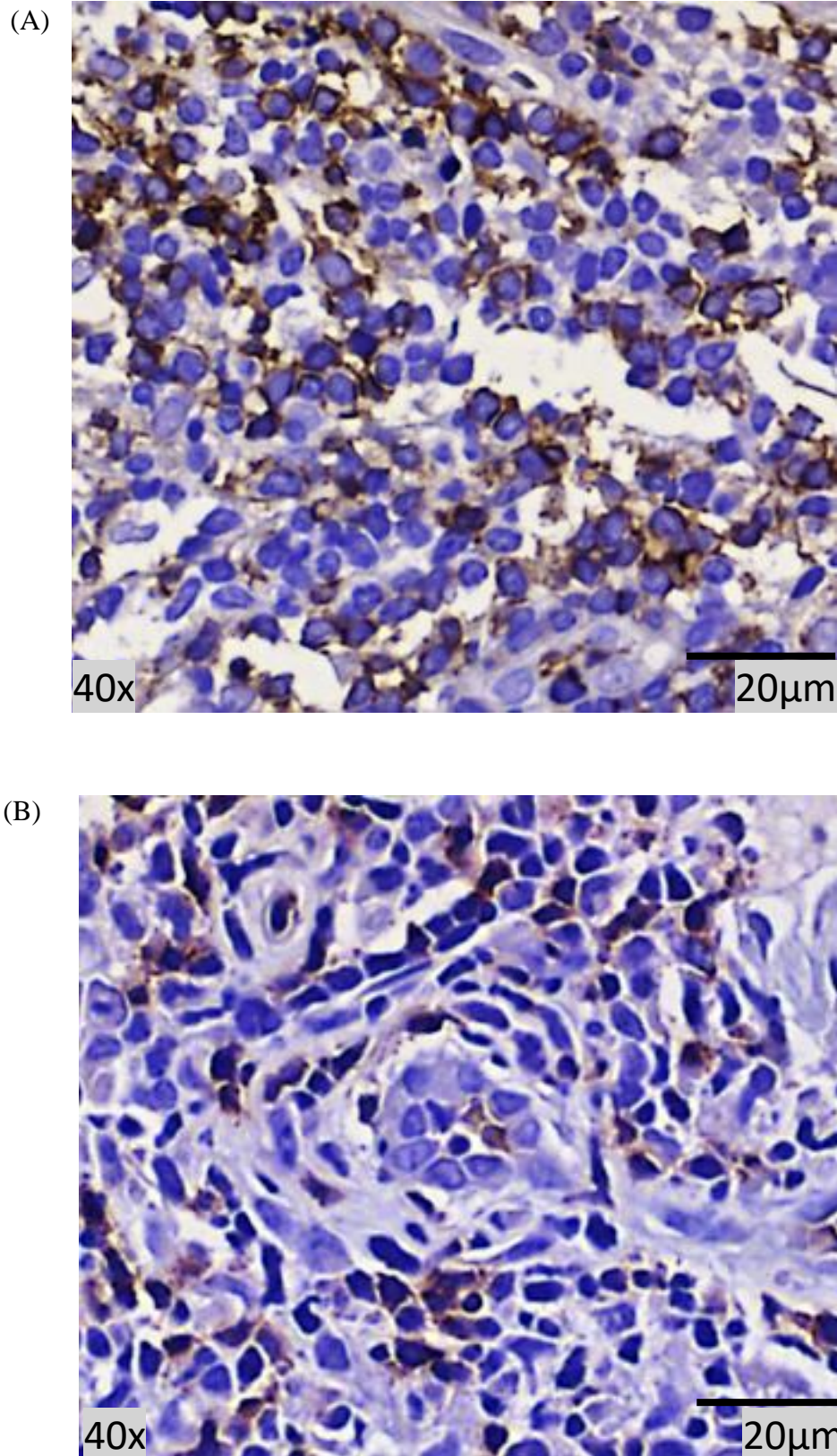


Figura 5. Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea. Células imunomarcadas em marrom com diaminobenzidina e anticorpo (A) anti-CD4 (B) anti-CD8. Amplificação digital de 40x.

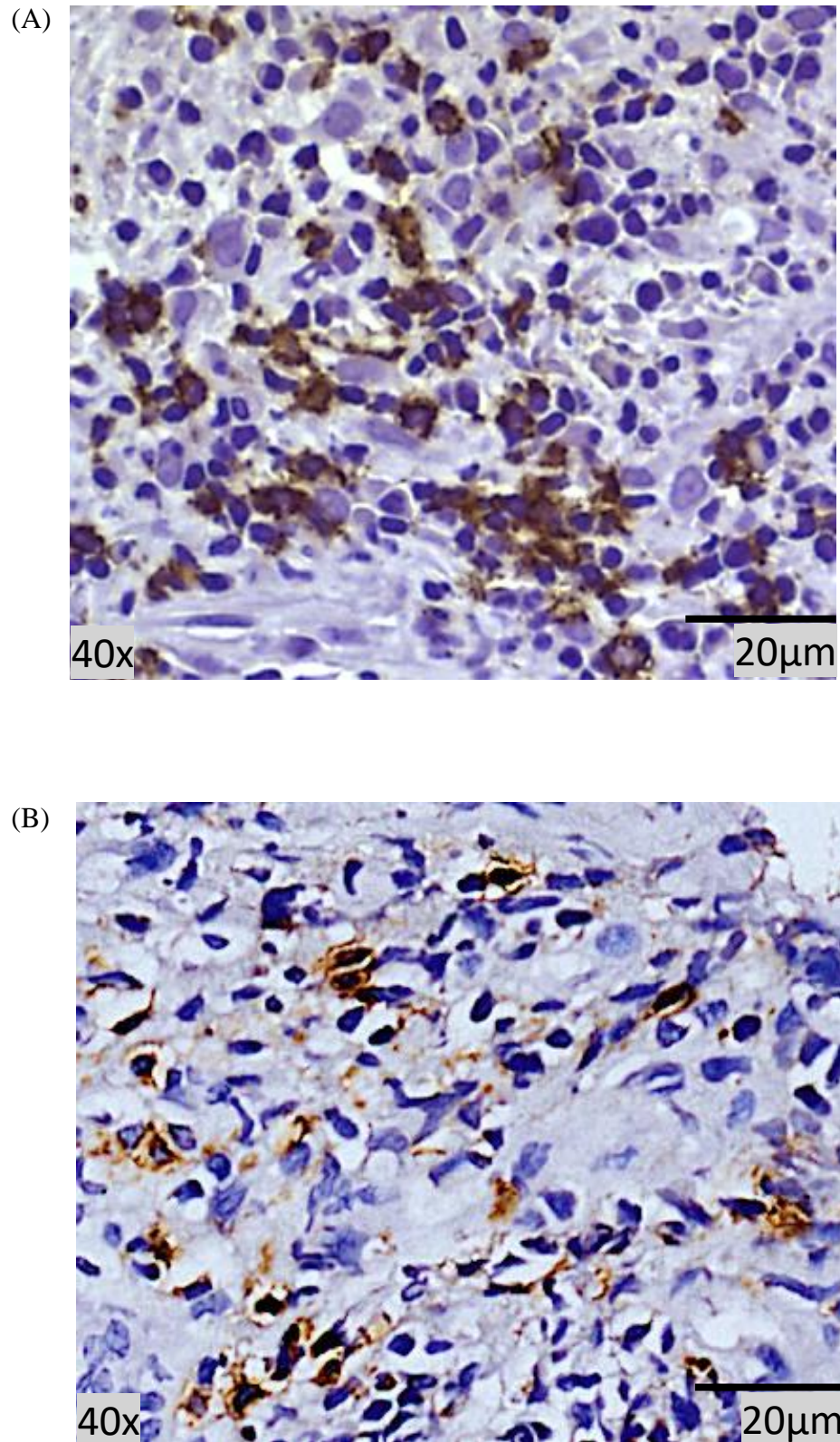


Figura 6. Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea. Células imunomarcadas em marrom com diaminobenzidina e anticorpo (A) anti-CD20 (B) anti-CD57. Amplificação digital de 40x.

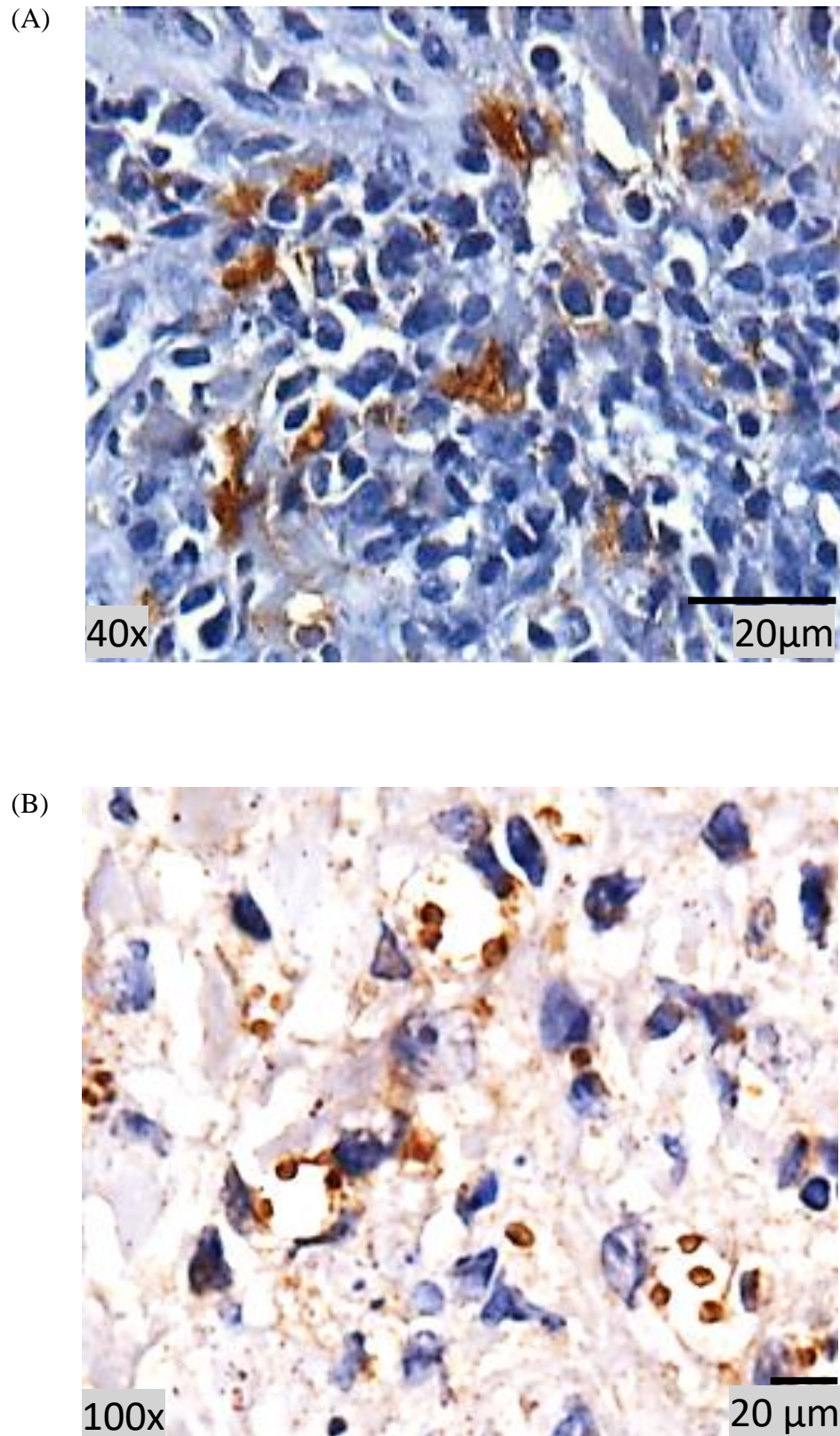


Figura 7. Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea. Células imunomarcadas em marrom com diaminobenzidina e anticorpo (A) anti-CD68 (B) anti-*Leishmania*. Amplificação digital de 40x e 100x, respectivamente.

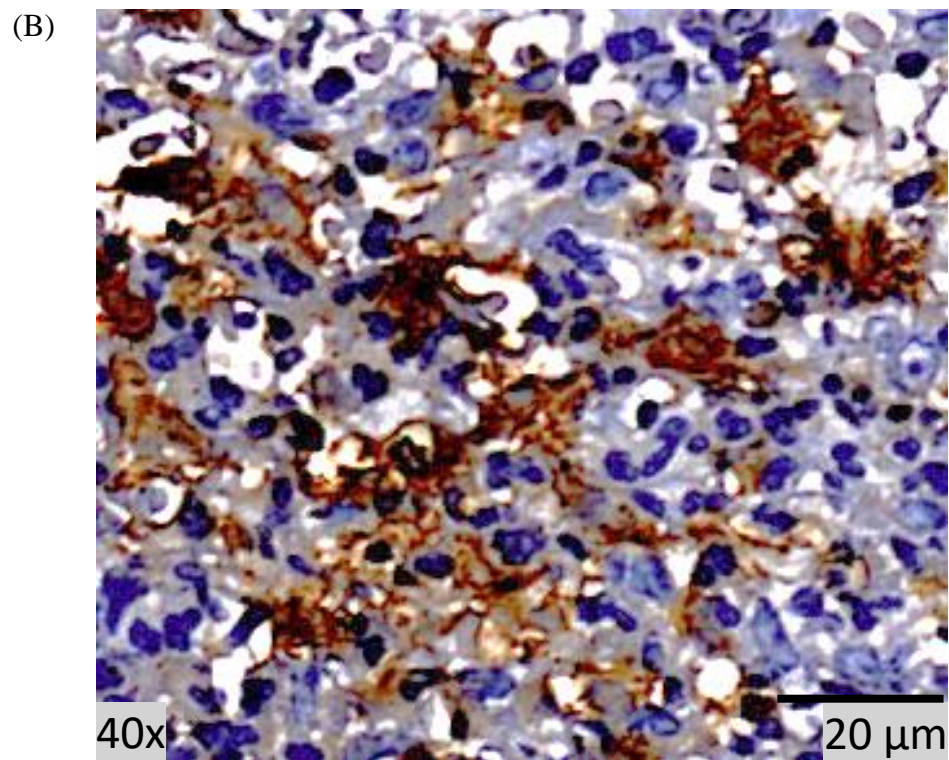
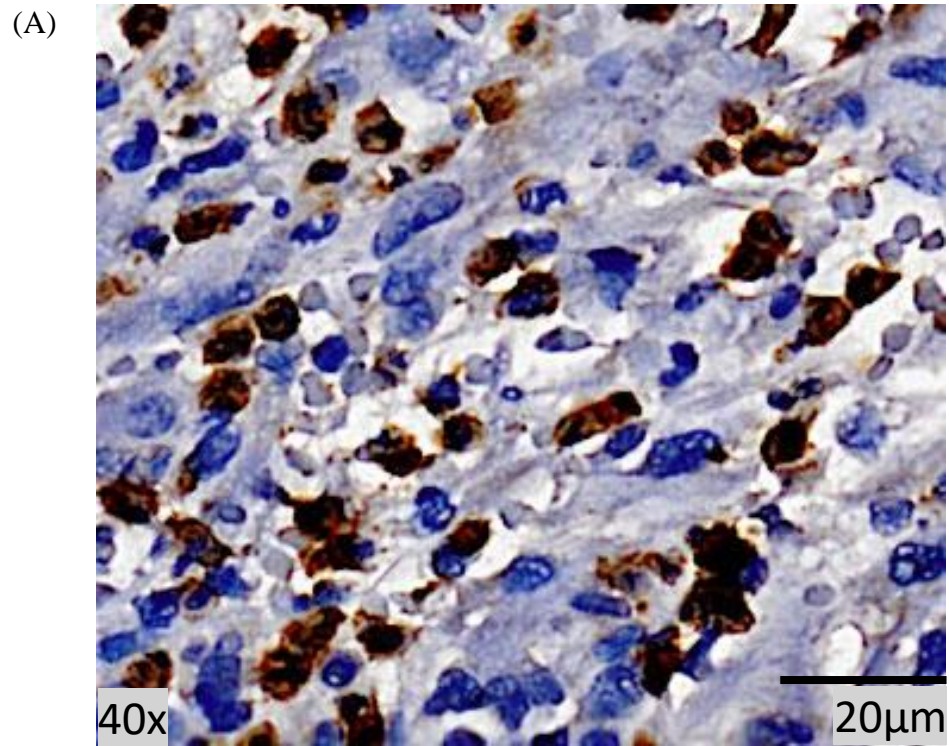


Figura 8. Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea. Células imunomarcadas em marrom com diaminobenzidina e anticorpo (A) anti-TNF- α (B) anti-IL-1 β . Amplificação digital de 40x.

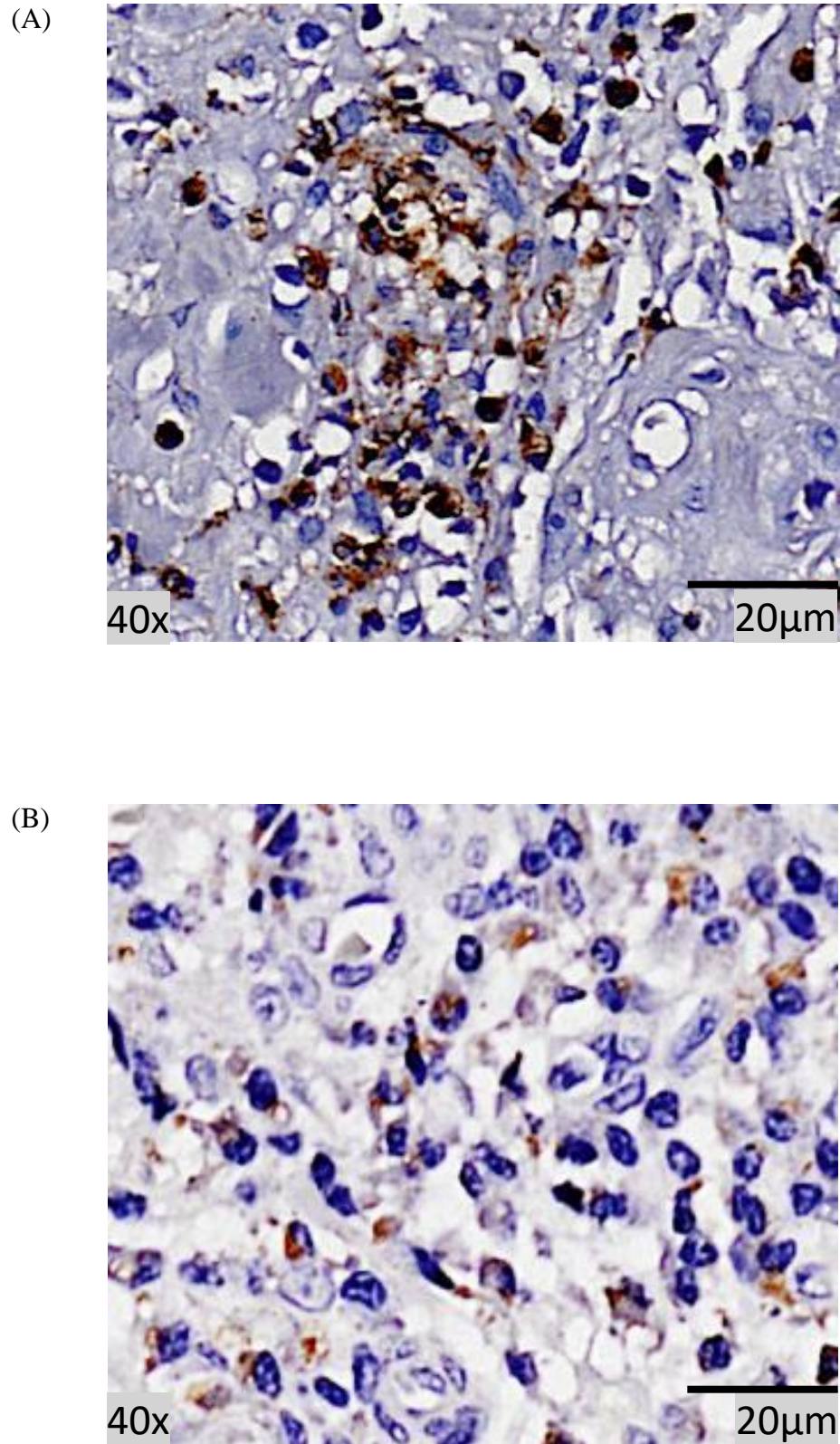


Figura 9. Imunoistoquímica em secção histológica de fragmento de pele de lesão ulcerada de paciente com leishmaniose cutânea. Células imunomarcadas em marrom com diaminobenzidina e anticorpo (A) anti-granzima B (B) anti-perforina. Amplificação digital de 40x.

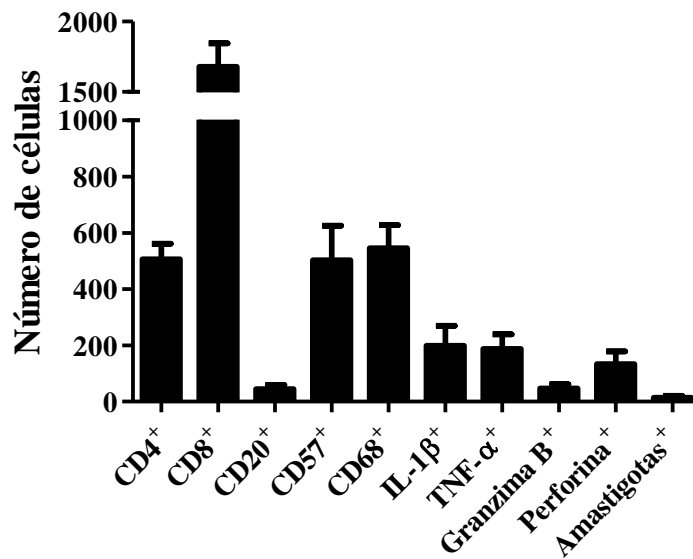


Figura 10. Perfil celular inflamatório na leishmaniose cutânea e número de amastigotas. Número de células positivas por imunistoquímica em secções histológicas de biópsias de lesões ulceradas de pacientes com leishmaniose cutânea. As barras representam o erro médio padrão (EM) (n=22).

Quinze pacientes que apresentaram linfadenopatia enquanto também apresentavam lesões ulceradas tiveram diferenças no padrão inflamatório. Foi observada uma maior frequência de células TNF α^+ (49,3 vs. 373,3; $p < 0,05$) (Figura 11 A) e IL-1 β^+ (5,5 vs. 136,1; $p < 0,05$) (Figura 11 B) nos pacientes com linfadenopatia quando comparado com os indivíduos sem linfadenopatia.

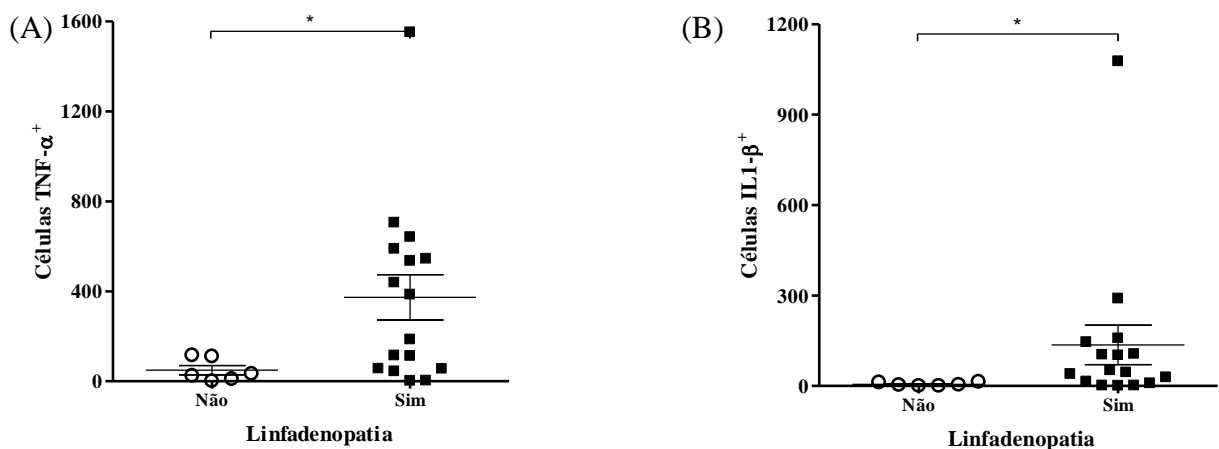


Figura 11. Comparação do número de células (A) TNF- α^+ e (B) IL-1 β^+ em pacientes com lesão ulcerada de leishmaniose cutânea que apresentaram ou não linfadenopatia. TNF- α^+ (49,3 vs. 373,3 e IL-1 β^+ (5,5 vs. 136,1), * $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t student não pareado. As barras representam a média e o erro padrão.

A figura 12 apresenta um painel de correlações entre as características histopatológicas observadas e as frequências de células e moléculas expressas por essas células, além dos valores do coeficiente de correlação.

Painel de correlações

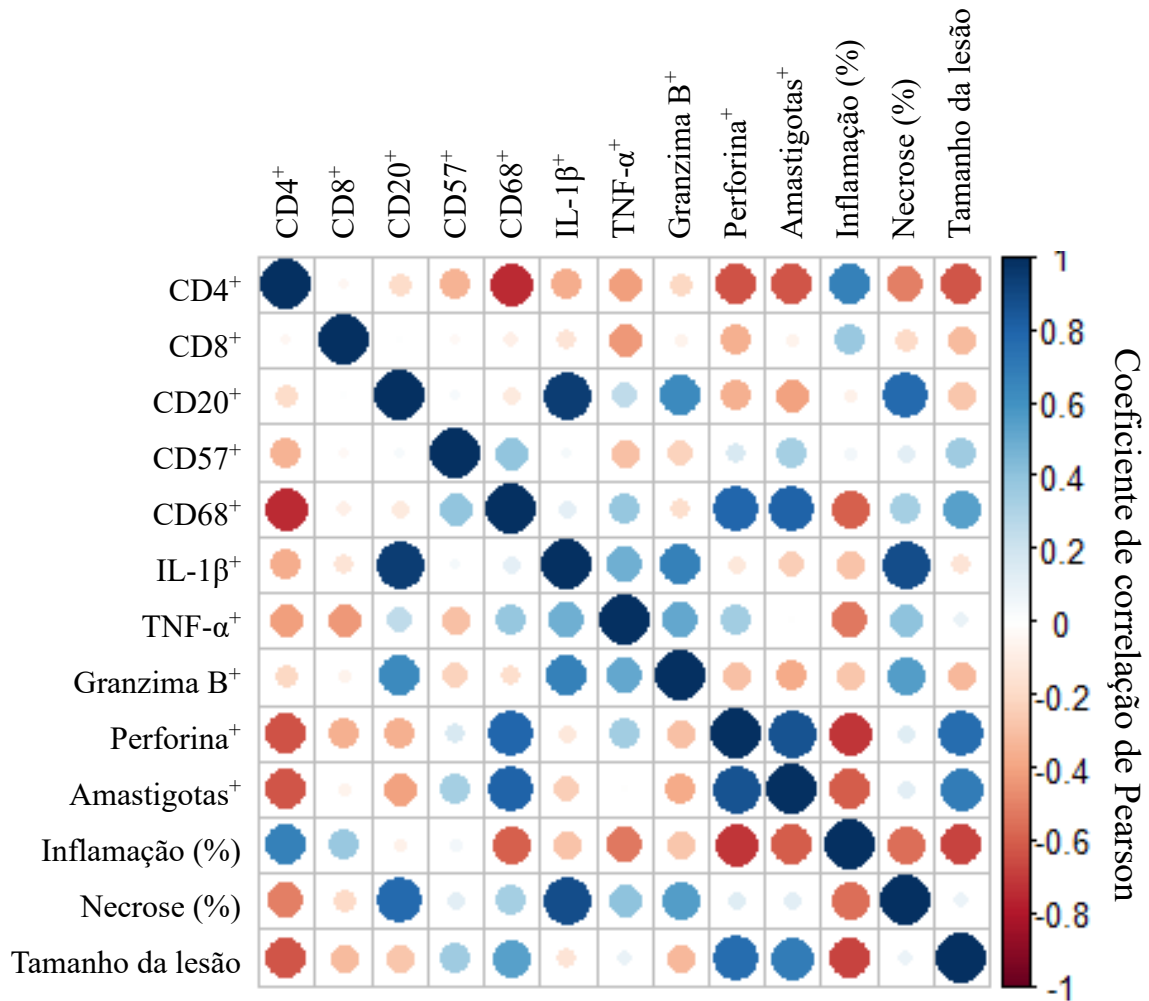


Figura 12. Correlação entre as células inflamatórias e as características clínico-histopatológicas nas biópsias de lesões ulceradas de pacientes com leishmaniose cutânea. Matriz de correlação mostrando os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis. A intensidade da cor e o tamanho dos círculos indicam a intensidade da correlação. Tons de azul, correlação positiva; tons de vermelho, correlação negativa.

A inflamação observada na LC caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares durante toda a duração da doença (DANTAS et al., 2014; FARIA et al., 2009). Observa-se aumento da infiltração, variando de leve na fase inicial de pápulas antes do aparecimento de

úlceras, que aumenta progressivamente (SALDANHA et al., 2017). Verificou-se que a inflamação estava diretamente associada à frequência das células T CD4⁺ ($R = 0,40$; $p < 0,05$) (Figura 13A). A necrose nas úlceras de LC é secundária ao dano tecidual devido à morte de macrófagos infectados por *L. braziliensis* ou à morte de células que expressam antígenos parasitários. No entanto, a extensão da necrose nas úlceras de LC foi reduzida em comparação com a área de inflamação. Não foram encontradas correlações diretas entre essas duas variáveis. No entanto, a expressão de IL-1 β ⁺ foi correlacionada com necrose ($R = 0,50$; $p < 0,001$) (Figura 13B). Curiosamente, a presença de células B também foi fortemente correlacionada com necrose ($R = 0,61$; $p < 0,0001$) (Figura 13C).

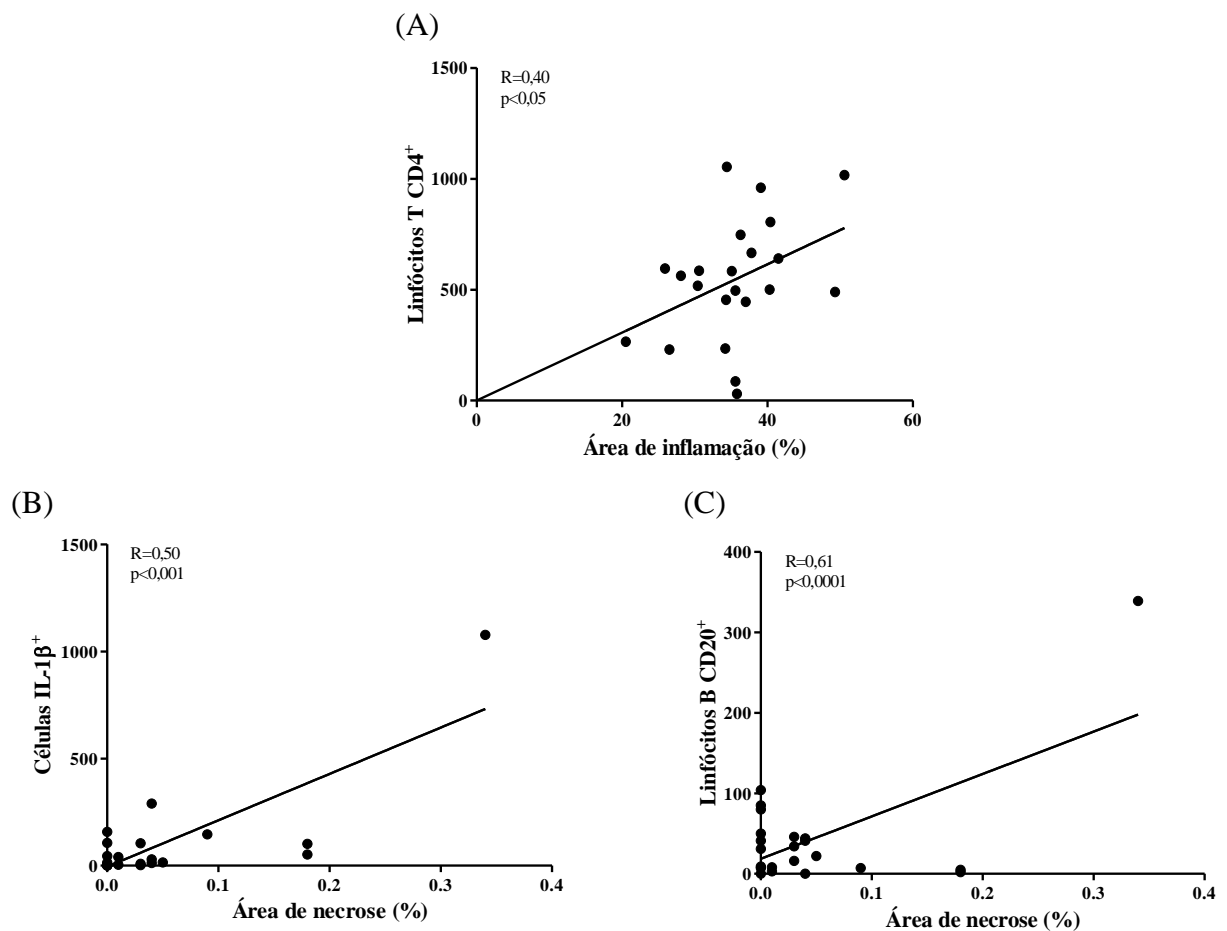


Figura 13. Correlação linear entre células e áreas de inflamação e de necrose. (A) Correlação de Pearson entre os linfócitos T CD4⁺ e a inflamação ($R = 0,40$; $p < 0,05$). (B) Correlação de Spearman entre as células IL-1 β ⁺ e a área de necrose ($R = 0,50$; $p < 0,001$) e (C) entre os linfócitos B CD20⁺ e a área de necrose ($R = 0,61$; $p < 0,001$).

A figura 14 mostram os tipos de células e moléculas mais frequentes associados à presença de amastigotas nas úlceras de LC. Como esperado, o número de parasitas foi diretamente correlacionado com a presença de macrófagos CD68⁺ ($R = 0,63$; $p < 0,0001$) (Figura 14A), bem como com a frequência de células que expressam perforina ($R = 0,68$; $p < 0,0001$) (Figura 14B).

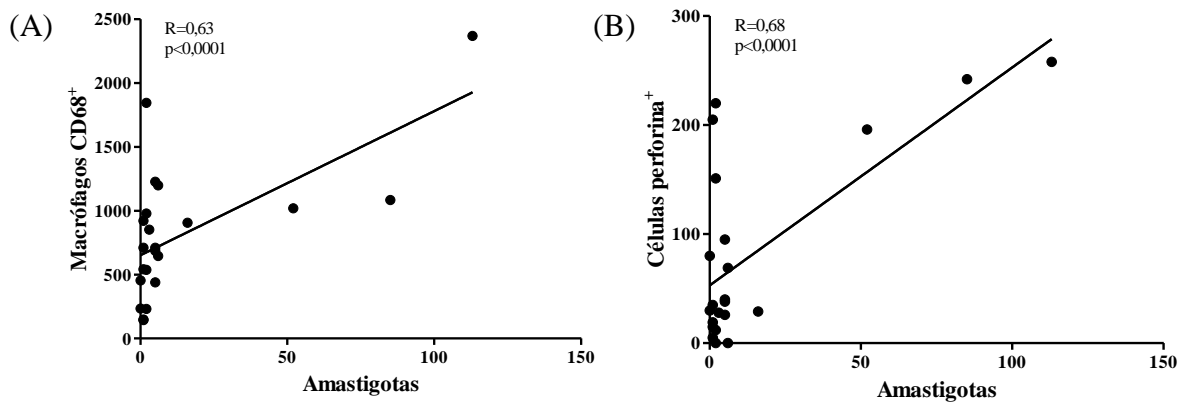


Figura 14. Correlação linear entre células e número de amastigotas. (A) Correlação de Pearson entre os macrófagos CD68⁺ e as amastigotas ($R = 0,63$; $p < 0,0001$) e (B) entre as células perforina⁺ e as amastigotas ($R = 0,68$; $p < 0,0001$).

Não houve correlação entre células CD57⁺ NK com inflamação ou necrose, mas essas células correlacionam positivamente com macrófagos CD68⁺ ($R = 0,42$; $p < 0,05$) (Figura 15 A) e números de amastigotas ($R = 0,36$; $p < 0,05$) (Figura 15 B).

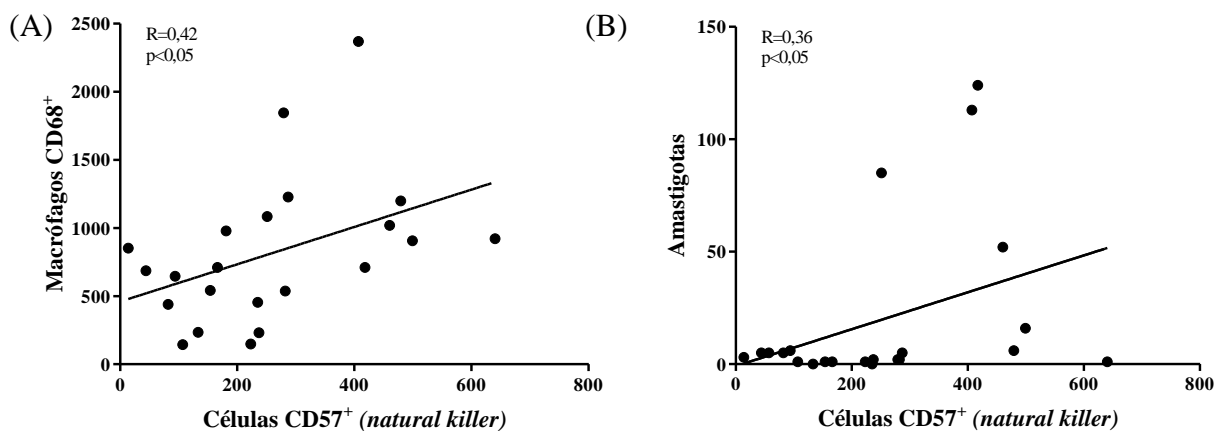
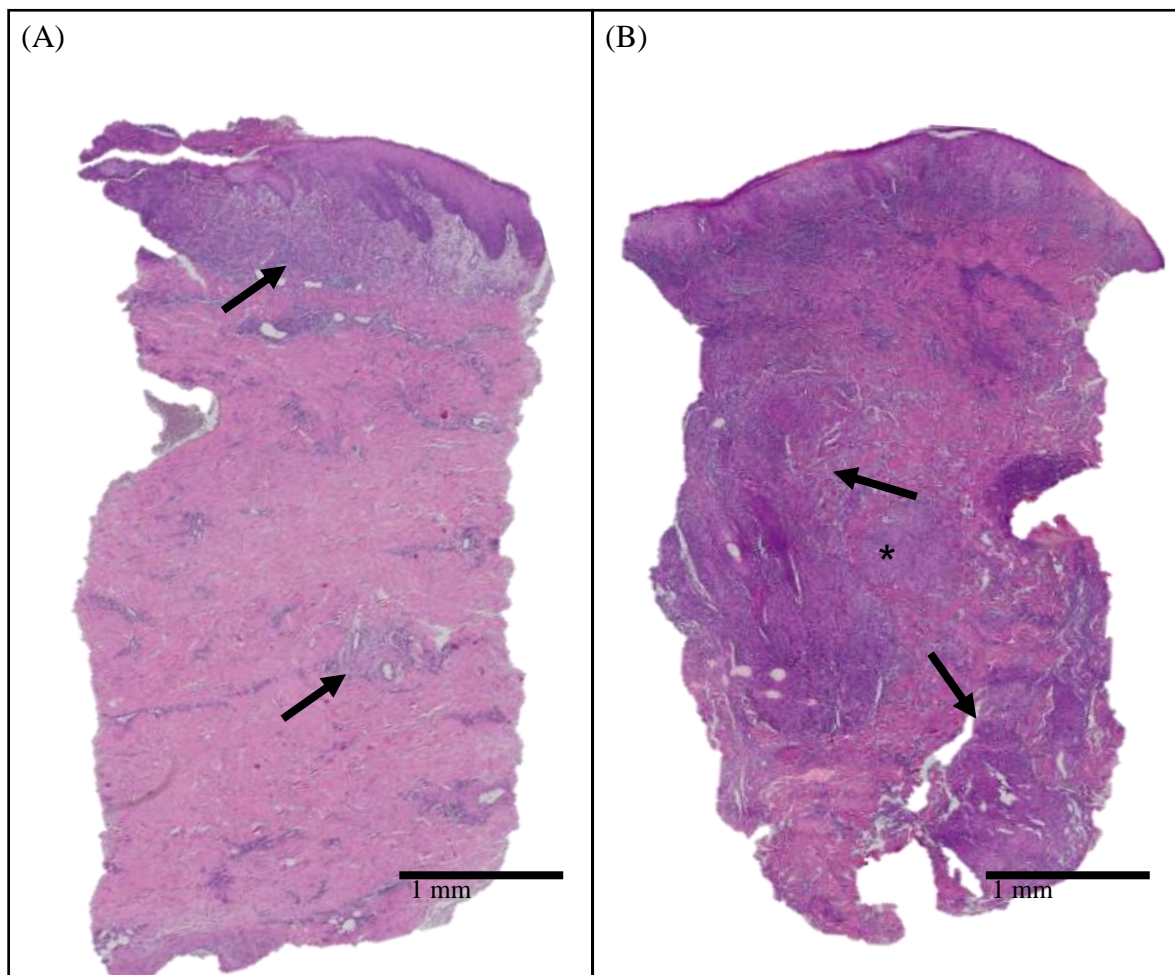


Figura 15. Correlação linear entre macrófagos, amastigotas e células natural killer. (A) Correlação de Pearson entre os macrófagos CD68⁺ e as células CD57⁺ ($R = 0,42$; $p < 0,05$) e (B) entre as amastigotas e as células CD57⁺ ($R = 0,36$; $p < 0,05$).

5.2 PERFIL CELULAR INFLAMATÓRIO DAS LESÕES DE PACIENTES COM LC COM INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO POSITIVA OU NEGATIVA

A infecção por *L. braziliensis* induziu intenso infiltrado inflamatório crônico de células composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos e necrose associada à destruição do tecido. Avaliamos a extensão da reação inflamatória, as áreas de necrose tecidual por hematoxilina e eosina (Figura 16 AB) e a composição do infiltrado celular por imunohistoquímica. A porcentagem da reação inflamatória (41,6 vs. 29,6, $p < 0,001$) e o foco de necrose (6,5 vs. 1,2, $p < 0,001$) foram menores nas biópsias negativas para IDR (Figura 16 C).



(C)

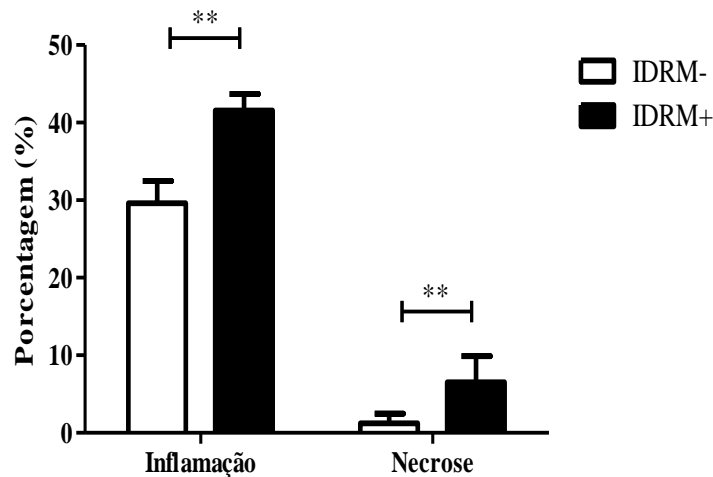
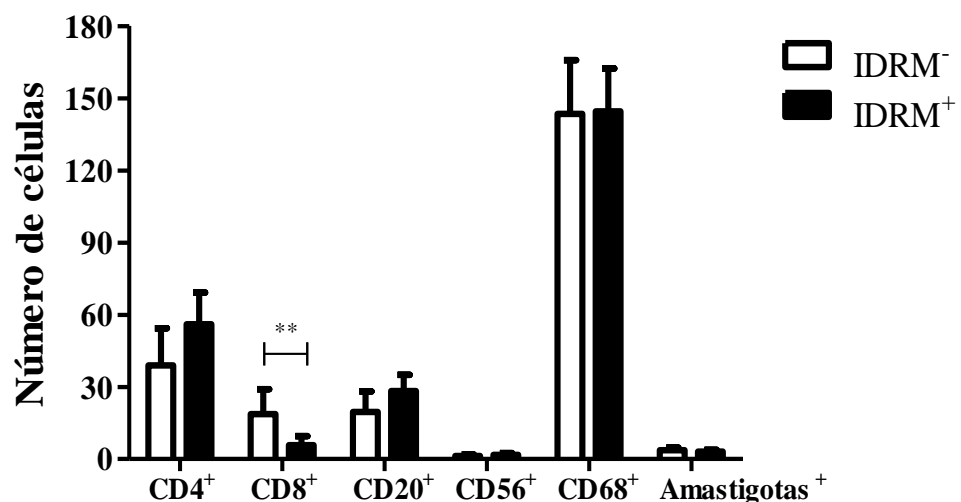


Figura 16. Áreas de inflamação e necrose nas biópsias de IDRMs⁻ e IDRMs⁺. Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina de pacientes com (A) IDRMs⁻ e (B) IDRMs⁺. Aumento digital 40x. Área de inflamação (setas/áreas roxas) e área de necrose (*asterisco). (C) Porcentagem da área da inflamação (41,6 vs. 29,6) e necrose (6,5 vs. 1,2) em pacientes que apresentaram IDRMs⁻ e IDRMs⁺. A análise estatística foi realizada usando o teste t-student não pareado. (N = 25). ** p < 0,001. As barras representam a média e o erro padrão.

Não houve diferença no número de células CD4⁺, células NK, macrófagos, amastigotas e células B entre biópsias IDRMs positivas e negativas. No entanto, o número de células CD8⁺ foi significativamente maior nas lesões de LC IDRMs negativa em comparação às biópsias IDRMs positivas (18,7 vs. 5,8, p < 0,001) (Figura 17 A). O padrão de imunomarcagem de linfócitos T CD8⁺ (Figura 17 B) e amastigotas de *Leishmania* (Figura 17 C) em pacientes com IDRMs⁻ é apresentado a seguir.

(A)



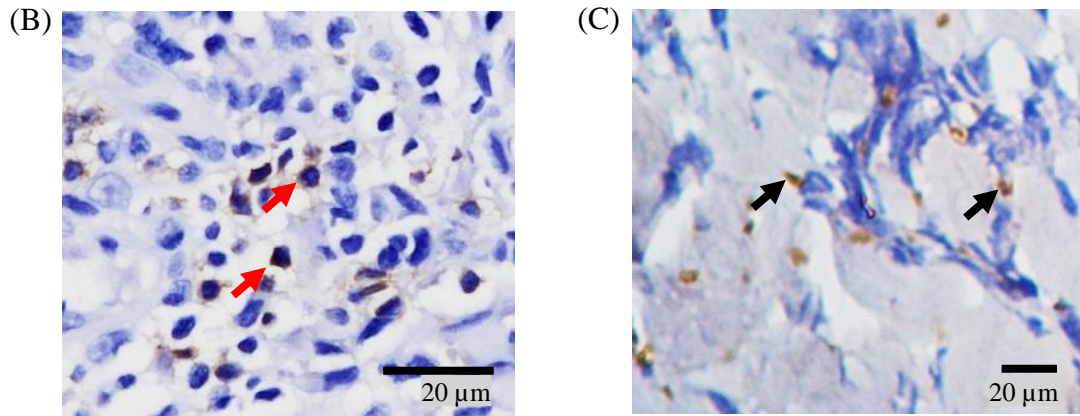


Figura 17. Células inflamatórias e amastigotas por imunistoquímica em secções histológicas de pacientes que apresentaram IDR^{M-} e IDR^{M+}. (A) Número de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), células B (CD20⁺), células NK (CD56⁺), macrófagos (CD68⁺) e amastigotas. Comparação da frequência de linfócitos T CD8⁺ em pacientes que apresentaram IDR^{M-} e IDR^{M+} (18,7 e 5,8, respectivamente). A análise estatística foi realizada usando o teste t-student não pareado. ** p < 0,001. As barras representam a média e o erro padrão. (N = 25). Imunistoquímica para (B) células T CD8⁺ (setas vermelhas), 40x e (C) amastigotas (setas pretas), 100x.

6 DISCUSSÃO

Conforme descrito na literatura, a análise histopatológica das biópsias das bordas de lesões ulceradas de pacientes com LCL revelou a presença de inflamação crônica, com predomínio de infiltrado celular mononuclear (DANTAS, 2012; FARIA et al., 2009). Na amostra do presente estudo, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram os mais frequentes. Ambas as populações de linfócitos foram associadas à proteção e patologia. As células T CD4⁺ desempenham um papel protetor através da produção de IFN- γ , a principal citocina responsável pela ativação de macrófagos, o que leva à morte intracelular de parasitas (SANTOS et al., 2013). Alternativamente, as células T CD8⁺ têm sido mais associadas a danos nos tecidos devido à atividade citotóxica (CASTRO GOMES et al., 2017; GLENNIE; SCOTT, 2016). Observamos que as células que expressam CD8⁺, CD4⁺ e CD68⁺ foram as mais frequentes nas amostras de tecido, e as células CD4⁺ também se correlacionaram positivamente com a extensão da inflamação. Um estudo anterior em pacientes com LC demonstrou uma correlação positiva entre a frequência de células T CD4⁺ no sangue periférico que expressam IFN- γ , bem como TNF- α e o tamanho da lesão (ANTONELLI et al., 2005). Sabe-se que a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ ativam monócitos/macrófagos e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, que podem contribuir para a resposta inflamatória (BACELLAR et al., 2002; CARDOSO et al., 2015; FARIA et al., 2009; SANTOS et al., 2013). No entanto, encontramos uma correlação negativa entre células CD4⁺ e macrófagos CD68⁺, células CD4⁺ e o número de amastigotas e células CD4⁺ e necrose que estão contra um papel significativo dessas células na patologia da LC. As células T CD8⁺ foram o tipo celular mais frequente nas biópsias de tecidos de pacientes com LC. Evidências indicam que essas células desempenham um papel importante na patogênese da infecção por *L. braziliensis* (DANTAS et al., 2013; NOVAIS et al., 2013). No entanto, apesar da alta frequência de células T CD8⁺ nas amostras de tecido presentes, não encontramos correlações entre essa população celular e a presença de amastigotas, nem

inflamação ou necrose. Essa aparente discrepância pode ser devido à vários fatores, como tipo de anticorpo utilizado, condições do tecido ou método de quantificação. De fato, a produção de moléculas de granzima e perforina foi mais importante que a frequência das células T CD8⁺, uma vez que estas estão diretamente envolvidas na lise do alvo. No tecido, a granzima foi positivamente correlacionada com a necrose e negativamente leve à amastigotas, tamanho da lesão e inflamação, enquanto a perforina foi associada positivamente forte com amastigotas, moderada com o tamanho da lesão e leve com a necrose e inflamação. Verificou-se uma grande porcentagem de células expressando CD57⁺, um marcador associado a células CD8⁺ ou NK altamente citotóxicas (KARED et al., 2016). Além disso, as células CD57⁺ foram as únicas cuja frequência estava diretamente correlacionada com macrófagos e amastigotas, sugerindo a participação de células CD57⁺ no mecanismo de morte de macrófagos infectados.

Como a *Leishmania* é um parasita intracelular, pouca ênfase foi dada à presença de células B e anticorpos na patogênese da doença. No entanto, as células B e as células plasmáticas são documentadas no tecido de pacientes com LC, e os anticorpos anti-*Leishmania* são altamente produzidos em casos graves de infecção pela *Leishmania* spp., como a forma visceral e lesões cutâneas difusas (BARRAL et al., 2007; RODRIGUEZ-PINTO; SARAIVA; MCMAHON-PRATT, 2014). No entanto, o papel das células B e anticorpos na patologia da LC ainda não foi bem estudado. A opsonização por anticorpos pode aumentar a captação de parasitas por macrófagos. Além disso, a deposição de complexos imunes pode contribuir para a patologia dos tecidos. Encontramos uma forte correlação direta entre a expressão de CD20⁺ e IL-1β⁺, bem como entre CD20⁺ e a extensão da necrose, o que destaca a necessidade de estudos futuros para avaliar o papel das células B e anticorpos na patogênese da LC. A morte celular necrótica pode contribuir para a formação de granuloma, inflamação e danos aos tecidos.

O papel da IL-1β⁺ e TNF-α⁺ tem sido bastante estudado em modelos de camundongos com LC, e altos níveis de ambas as citocinas são produzidos por células mononucleares do

sangue periférico em pacientes com LC (ANTONELLI et al., 2005; CAMPOS et al., 2014; PASSOS et al., 2015). Encontramos a linfadenopatia associada a uma resposta inflamatória ativa com alta produção de IL-1 β ⁺ e TNF- α ⁺. A linfadenopatia transitória é um sintoma inicial de leishmaniose cutânea podendo, inclusive, ser a única manifestação da infecção por *Leishmania braziliensis* (BARRAL et al., 1995b). Isso ocorre devido a disseminação de amastigotas da pele para os linfonodos, sendo as *Leishmanias* capazes de permanecer no sistema fagocítico-monocitário por um longo período da vida do indivíduo infectado (SANGUEZA; CARDENAS, 1981). Muitos indivíduos desenvolvem úlceras posteriormente durante o curso da infecção ou a linfadenopatia pode regredir, além disso, linfonodos regionais de locais ulcerados, também podem indicar infecções secundárias (BARRAL et al., 1995a; MORAES; CORREIA FILHO; SANTOS, 1993). A IL-1 β ⁺ pode ser produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos inflamatórios, linfócitos B, células epiteliais e NK (CARVALHO et al., 2012; NOVAIS et al., 2017). Recentemente, a IL-1 β ⁺ através da ativação do inflamassoma, bem como células T CD8⁺ citotóxicas, foram associadas a danos nos tecidos na infecção por *L. braziliensis* (NOVAIS et al., 2017). Observamos que tanto a IL-1 β ⁺ quanto TNF- α , positivamente correlacionados com a expressão de granzimas. Necrose também correlaciona fortemente com a IL-1 β ⁺, o que sugere que essas citocinas desempenham um papel fundamental na patologia da LC. A análise da expressão gênica em lesões ulcerativas biopsiadas de LC humanas revelou uma alta expressão de IL-1 β ⁺, TNF- α ⁺, granzima e perforina, além de outras moléculas (NOVAIS et al., 2017). A perforina e as granzimas produzidas pelas células NK e linfócitos T promovem a apoptose das células infectadas (TRAPANI; SMYTH, 2002). A perforina forma poros nas células alvo e participa na regulação positiva de CD8 (ZHOU, 2010), enquanto as granzimas lisam os patógenos intracelulares (ARIAS et al., 2014).

Neste estudo mostramos que pacientes com LC causada por *L. braziliensis* e com IDRM negativa tinham úlceras cutâneas semelhantes aos pacientes com IDRM⁺. No local da lesão

ulcerada de pacientes com IDRM⁻ têm uma reação inflamatória menor e com menos foco de necrose e sem aumento do número de parasitas do que pacientes com IDRM⁺, todavia, a análise histopatológica foi muito semelhante, exceto pelo aumento na frequência das células T CD8⁺. Na IDRM⁻ apesar da ausência ou baixa produção de IFN- γ pelos linfócitos, o número de amastigotas foi semelhante ao observado em pacientes com IDRM⁺ (CARVALHO et al., 2020). Embora o uso de técnicas mais sensíveis como quantificação do DNA de *L. braziliensis* possa mostrar resultados diferentes (CARVALHO et al., 2020), não podemos descartar que o baixo número de amastigotas nesses pacientes com IDRM⁺ ocorra devido a outros mecanismos de morte da *Leishmania*, como aqueles dependentes de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio, por exemplo. A histopatologia apresentada em pacientes com IDRM⁻ foi bastante diferente daquela observada em pacientes com LC disseminada causada por *L. amazonensis*, onde há uma diminuição no número de linfócitos e uma grande quantidade de macrófagos com muitos parasitas (BARRAL et al., 2007, 1995b; SILVEIRA et al., 2009). O aspecto clínico da úlcera em pacientes com IDRM⁻ foi semelhante ao observado em pacientes com IDRM⁺ e a patologia foi observada mesmo com uma redução na produção de IFN- γ contra o papel das células CD4⁺ Th1 na doença causada por *L. braziliensis*, além da associação entre a IDRM⁻ e falha terapêutica (CARVALHO et al., 2020).

Nossos achados *in situ* em lesões de LC humanas sugerem que as associações entre células inflamatórias e a intensa produção de citocinas e produtos citotóxicos podem contribuir para a necrose e potencialmente participar da formação de úlceras na LC.

7 CONCLUSÃO

Este estudo buscou estabelecer correlações entre os parâmetros histopatológicos da LC, a fim de elucidar a patogênese desta doença. Sugerimos que, em um esforço para o controle dos parasitas, é provável que os macrófagos infectados permaneçam em um estado ativado devido a produção de citocinas pró-inflamatórias por células T CD4⁺, em particular IL-1β⁺, assim contribuindo potencialmente para a necrose tecidual. Além disso, a produção exacerbada de grânulos citotóxicos contendo perforina pelas células T CD8⁺ e células NK podem agravar a destruição, intensificando assim a formação de úlceras na pele.

8 SUMÁRIO ILUSTRATIVO DAS CONCLUSÕES DO ESTUDO

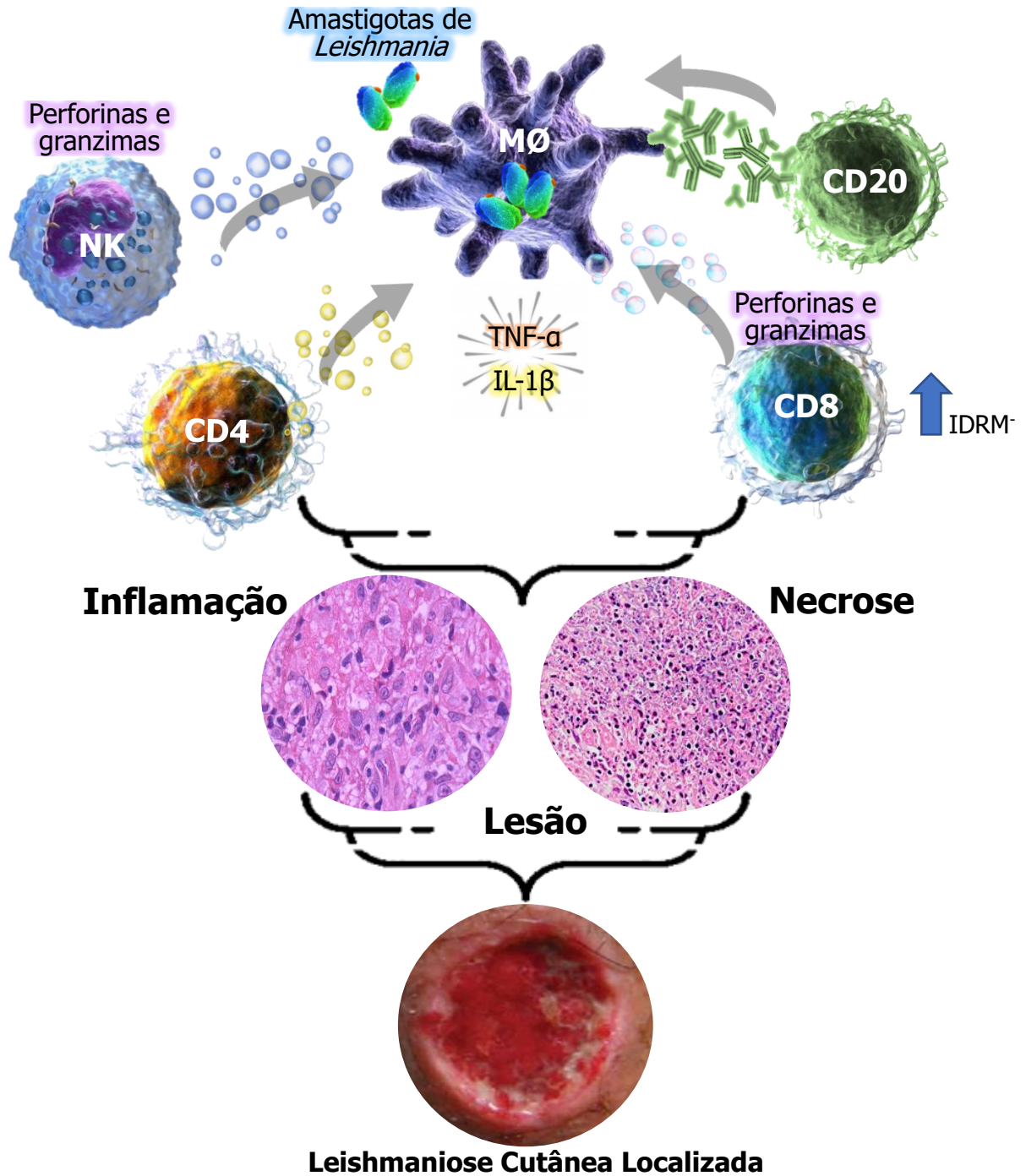


Figura 18. Esquema representativo da resposta inflamatória na leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis*. Os macrófagos são as principais células que abrigam as amastigotas de *Leishmania* e a infecção dá início a um processo inflamatório com a participação de células da resposta imune inata, como as células NK, da imune adquirida, com os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e da resposta humoral, com os linfócitos B. Estas células produzem citocinas, perforinas e granzimas que atingem as células infectadas na tentativa de eliminar os parasitas intracelulares. A resposta imune exacerbada provoca uma intensa inflamação tecidual e o surgimento de áreas de necrose, constatadas na análise histopatológica, e pode ser a causa do desenvolvimento de uma lesão ulcerada. MØ: macrófago; NK: célula *natural killer*; CD4: linfócito T CD4⁺; CD8: linfócito T CD8⁺; CD20: linfócito B CD20⁺.

9 REFERÊNCIAS

- AFONINA, Inna S. *et al.* Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . **Molecular Cell**, v. 44, n. 2, p. 265-78, 2011. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.07.037.
- ALEMAYEHU, Bereket; ALEMAYEHU, Mihiretu. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 519, 2017. DOI: 10.21767/1791-809x.1000519.
- ALEXANDER, James; BRYSON, Karen. **T helper (h)1/Th2 and Leishmania: Paradox rather than paradigm** **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.01.009.
- ANAYA J. M. *et al.* Introduction to T and B lymphocytes. *In: Autoimmunity: From Bench to Bedside*. [s.l: s.n.].
- ANTONELLI, Lis R. V. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.06.004.
- ARENAS, Roberto *et al.* **Leishmaniasis: A review** **F1000Research**, 2017. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1.
- ARIAS, Maykel A. *et al.* Elucidating Sources and Roles of Granzymes A and B during Bacterial Infection and Sepsis. **Cell Reports**, v. 8, n. 2, p. 420–429, 2014. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.012.
- BACELLAR, Olívia *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, p. 6734–6740, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002.
- BANKOTI, Rashmi *et al.* Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 8, p. 3961-71, 2012. DOI: 10.4049/jimmunol.1102880.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 1, p. 21-28, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00962.x.
- BARRAL, Aldina. *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 256 - 259, 1995. a. DOI: 10.4269/ajtmh.1995.53.256.
- BARRAL, Aldina *et al.* Manoel. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: Insights into the early phases of human disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 854 - 859, 2007. DOI: 10.4269/ajtmh.2007.77.854.

- BARRAL, Aldina *et al.* Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 7, p. 474-479, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-4362.1995.tb00613.x.
- BELKAID, Yasmine *et al.* A Natural Model of *Leishmania major* Infection Reveals a Prolonged “Silent” Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, 969-977, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.165.2.969.
- BERTHOLET, Sylvie *et al.* Antigen requirements for efficient priming of CD8⁺ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6620-6628, 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.10.6620-6628.2005.
- BOGDAN, Christian. *et al.* Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 69, 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00069.
- BOIVIN, Wendy Anne *et al.* Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: Challenging the dogma. **Laboratory Investigation**, v. 89, p. 1195 - 1220, 2009. DOI: 10.1038/labinvest.2009.91.
- BORGES, Arissa Felipe; GOMES, Rodrigo Saar; RIBEIRO-DIAS, Fátima. *Leishmania (Viannia) guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. **Pathogens and Disease**, v. 76, n. 4, p. 25, 2018. DOI: 10.1093/femspd/fty025.
- BOUSOFFARA, Thouraya *et al.* Analysis of Granzyme B Activity as a Surrogate Marker of *Leishmania*- Specific Cell-Mediated Cytotoxicity in Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 7, p. 1265–1273, 2004. DOI: 10.1086/382031.
- BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.11.006.
- BRODSKYN, C. I. *et al.* Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 9, p. 4467-4473, 1997.
- BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- CAMPOS, Taís M. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003282.
- CAMPOS, Taís M. *et al.* Granzyme B produced by natural killer cells enhances inflammatory response and contributes to the immunopathology of cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 6, p. 973-982, 2019. DOI: 10.1093/infdis/jiz538.

- CAMPOS, Taís M. *et al.* Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 11, p. 733-740, 2017. DOI: 10.1590/0074-02760170109.
- CARDOSO, Thiago Marconi *et al.* Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015. DOI: 10.1128/IAI.02404-14.
- CARVALHO, A. M. *et al.* Impaired Th1 response is associated therapeutic failure in patients with cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis - PubMed. **J Infect Dis**, jiaa374, 2020. DOI: 10.1093/infdis/jiaa374. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32620011/>.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315–325, 1994. DOI: 10.1016/0001-706X(94)90103-1.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 273–277, 1995. DOI: 10.4269/ajtmh.1995.53.273.
- CARVALHO, Lucas P. *et al.* Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, oct., p. 301, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00301. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3463898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 9 jun. 2014.
- CASTRO GOMES, Cláudia Maria *et al.* Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania (Viannia) spp.* in Amazonian Brazil. **Parasitology Research**, v. 116, n. 5, p. 1423–1431, 2017. DOI: 10.1007/s00436-017-5403-4.
- CHRISTENSEN, Stephen M. *et al.* Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, e0007152, p. 1-23, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007152.
- CONCEIÇÃO-SILVA, Fatima; MORGADO, Fernanda N. *Leishmania spp*-host interaction: there is always an onset, but is there an end? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 330, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00330.
- COSTA, J. M. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 319–323, 1986.
- COSTA, Jackson M. L. *et al.* Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Barsil. **Gazeta Médica da Bahia**, p. 70–83, 2009.
- COUTINHO, S. G. *et al.* Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 139-142, 1998. DOI: 10.1590/S0100-879X1998000100019.
- DA-CRUZ, A. M. *et al.* Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of

human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614-2618, 1994.

DA-CRUZ, A M. *et al.* Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **The British journal of dermatology**, v. 153, n. 3, p. 537–43, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2005.06647.x.

DA-CRUZ, Alda Maria *et al.* G. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 251-256, 2002. DOI: 10.1128/CDLI.9.2.251-256.2002.

DANCEY, Christine P.; REIDY, Jonh. **Estatística sem matemática para psicologia**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

DANTAS, Marina Loyola. **Aspectos comparativos da resposta inflamatória em lesões de leishmaniose cutânea localizada e disseminada**. 2012. 93 fls. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, 2012.

DANTAS, Marina Loyola *et al.* Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 202–209, 2014. DOI: 10.1590/0074-0276130312.

DANTAS, Marina Loyola *et al.* CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 728–734, 2013. DOI: 10.1590/0037-8682-0174-2013.

DAVIES, C. R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: An epidemiological study of infection and immunity. **Epidemiology and Infection**, v. 114, n. 2, p. 297-318, 1995. DOI: 10.1017/S0950268800057964.

DE VRIES, Henry J. C. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015. DOI: 10.1007/s40257-015-0114-z.

DEY, Ranadhir *et al.* Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134-143, 2018. DOI: 10.1016/j.chom.2017.12.002.

EGUI, Adriana *et al.* Phenotypic and functional profiles of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells associated with infection control in patients with cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 393, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00393.

ELMAHALLAWY, Ehab Kotb *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014. DOI: 10.3855/jidc.4310.

ESTERRE, P. *et al.* Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: A light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 95, n. 2, p. 209-216, 1992. DOI: 10.1007/BF01611181.

EVANS, Thomas G. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 5, p. 1124-1132, 1992. DOI: 10.1093/infdis/166.5.1124.

FARIA, D. R. *et al.* Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2009.01125.x.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, Edith A. *et al.* Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 β . **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e15332012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001533.

FOLLADOR, Ivonise *et al.* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 11, p. E54-8 2002. DOI: 10.1086/340261.

GAAFAR, A. *et al.* The pathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 5, p. 438-442 1995. DOI: 10.4269/ajtmh.1995.52.438.

GIBSON-CORLEY, Katherine Nicole; JONES, Douglas E.; HOSTETTER, Jesse M. **Understanding the role of B cells during *Leishmania amazonensis* infection by Tese.** (Mestrado) - 2010. Paper 11418. <http://lib.dr.iastate.edu/etd/11418>.

GLENNIE, Nelson D.; SCOTT, Phillip. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 50–54, 2016. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.07.010.

GORAK, Patricia M. A.; ENGWERDA, Christian R.; KAYE, Paul M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–695, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<687::AID-IMMU687>3.0.CO;2-N.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010. DOI: 10.1586/eri.10.19.

GUPTA, Gaurav; OGHUMU, Steve; SATOSKAR, Abhay R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *In: Advances in Applied Microbiology*, v. 82, p. 155-184, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3.

HERNÁNDEZ-RUIZ, Joselín *et al.* CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: The latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000871.

HERNANDEZ SANABRIA, Mayra X.; VARGAS-INCHAUSTEGUI, Diego A.; XIN, Lijun; SOONG, Lynn. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, 5100-5109, 2008. DOI: 10.1128/IAI.00438-08.

- HIEBERT, Paul R.; GRANVILLE, David J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 732-741, 2012. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.09.009.
- JERONIMO, Selma M. B. *et al.* An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 386-388, 1994. DOI: 10.1016/0035-9203(94)90393-X.
- JORDAN, Kimberly A.; HUNTER, Christopher A. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 318–325, 2010. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.05.008.
- KARED, Hassen *et al.* CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, p. 441-452, 2016. DOI: 10.1007/s00262-016-1803-z.
- KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 65, p. 441-452, 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2608.
- KHAN, I. A.; SMITH, K. A.; KASPER, L. H. Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 141, n. 10, p. 3600-3605, 1988.
- LAINSON, Ralph. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, vol. 1, n. 2, p. 13-32, 2010. DOI: 10.5123/s2176-62232010000200002.
- LAINSON, Ralph; SHAW, Jeffrey J. New World Leishmaniasis. *In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, [S.l.: s.n.], 2005. DOI: 10.1002/9780470688618.taw0182.
- LANIER, Lewis L. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 495-502, 2008. DOI: 10.1038/ni1581.
- LAURENTI, M. D. *et al.* The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 3, p.323-325, 1999. DOI: 10.1590/S0100-879X1999000300012.
- LIMA-JUNIOR, Djalma S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909-15, 2013. DOI: 10.1038/nm.3221.
- LIU, Dong; UZONNA, Jude E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 83, 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00083.
- MACHADO, Paulo *et al.* Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. E69-73, 2002. DOI: 10.1086/340526.
- MANSUETO, Pasquale *et al.* **Leishmaniasis in travelers: A literature review** *Travel*

Medicine and Infectious Disease, v. 12, n. 6 Pt A, p. 563-581, 2014. DOI: 10.1016/j.tmaid.2014.09.007.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.

MARSDEN, Philip Davis. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L (V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 2, p. 93–101, 1994.

MAURER, Marcus; DONDJI, Blaise; VON STEBUT, Esther. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 3, p. 137-146, 2009. DOI: 10.1007/s00430-009-0114-9.

MCCORMICK, T. S.; STEVENS, S. R.; KANG, K. Macrophages and cutaneous inflammation. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 25+, 2000. DOI: 10.1038/71879.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014. DOI: 10.1093/qjmed/hct116.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2 ed. atual. Brasília. DOI: 10.1590/S0036-46651991000400018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l.: s.n.].

MONTOYA, Jose G. *et al.* Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 176–181, 1996. DOI: 10.1128/iai.64.1.176-181.1996.

MORAES, Mário A. P.; CORREIA FILHO, Dalmo; SANTOS, João Barberino. Linfadenopatias na leishmaniose tegumentar americana: considerações sobre dois casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n.3, p.181-185, 1993. DOI: 10.1590/s0037-86821993000300008.

MORGADO, F. N. *et al.* Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **British Journal of Dermatology**, v. 158, p. 50-58, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08255.x.

MUKBEL, Rami; PETERSEN, Christine A.; JONES, Douglas E. Soluble factors from *Leishmania major*-specific CD4+T cells and B cells limit *L. amazonensis* amastigote survival within infected macrophages. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 9–10, p. 2547-2555, 2006. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.07.005.

NAIK, Shruti *et al.* Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1115-1119, 2012. DOI: 10.1126/science.1225152.

NAOUAR, Ikbel *et al.* Hechmi. Involvement of different CD4+ T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. **Mediators of Inflammation**, 2014:636039, 2014 . DOI: 10.1155/2014/636039.

NOVAIS, Fernanda O. *et al.* Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003504.

NOVAIS, Fernanda O. *et al.* CD8+T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006196, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006196.

NOVAIS, Fernanda O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288–1296, 2014. DOI: 10.1093/infdis/jiu013.

NOVOA, R. *et al.* IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 2, p. 132-136, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2010.01256.x.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 551–61, 2012. DOI: 10.1111/pim.12007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23009296>. Acesso em: 16 jul. 2014.

O'NEIL, C. E.; LABRADA, M.; SARAVIA, N. G. *Leishmania* (Viannia) panamensis-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 181-188, 1993. DOI: 10.4269/ajtmh.1993.49.181.

OMOTO, Youichi *et al.* Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, n. 2, p. 129-35, 2010. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.05.004.

PACE, David. Leishmaniasis. **The Journal of infection**, v. 69 Suppl 1, p. S10-8, 2014. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.07.016.

PAN-AMERICANA DA SAÚDE, Organização. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. Dezembro 2019.

PASSERO, Luiz Felipe Domingues *et al.* Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania* (Viannia) shawi. **Parasitology International**, v. 59, n. 2 , p. 159-165, 2010. DOI: 10.1016/j.parint.2009.12.010.

PASSOS, Sara *et al.* Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *leishmania braziliensis* infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 274–282, 2015. DOI: 10.1093/infdis/jiu439.

PIPKIN, Matthew E.; LIEBERMAN, Judy. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 301-308, 2007. DOI: 10.1016/j.coi.2007.04.011.

- PURNER, Matthew B. *et al.* CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p. 4330–4338, 1996. DOI: 10.1128/iai.64.10.4330-4338.1996.
- RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p. 937-954, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000700001.
- REITHINGER, Richard *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581-596, 2007. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.
- RIBEIRO-DE-JESUS, A. *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998. DOI: 10.1590/S0100-879X1998000100020.
- RODRIGUES DE SANTANA, Fabiana *et al.* Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30cH. **Homeopathy**, v. 103, n. 4, p. 264–274, 2014. DOI: 10.1016/j.homp.2014.08.006.
- RODRIGUEZ-PINTO, Daniel; SARAIVA, Nancy G.; MCMAHON-PRATT, Diane. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania* (Viannia) infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 108, 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-108.
- ROQUE, André Luiz R.; JANSEN, Ana Maria. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.3, n.3, p.251-262, 2014. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004.
- ROSTAMI, Mahmoud Nateghi *et al.* CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e845, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000845.
- RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 671–678, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2007.00991.x.
- SALDANHA, Maíra G. *et al.* Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 645–652, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0539. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/lookup/doi/10.4269/ajtmh.16-0539>.
- SANGUEZA, P.; CARDENAS, F. Leishmaniasis cutanea y cutaneo-mucosa. Nuevos aportes sobre el tema. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 9, p. 25-34, 1981.
- SANTOS, Claire Da Silva *et al.* CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–40, 2013. DOI: 10.1038/jid.2013.4. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3667352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 9 jun. 2014.

SCHARTON, Tanya M.; SCOTT, Phillip. Natural killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to leishmania major in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 567-577, 1993. DOI: 10.1084/jem.178.2.567.

SCHNORR, Daniel *et al.* IFN- γ Production to Leishmania Antigen Supplements the Leishmania Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. e1947, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001947.

SCORZA, Breanna M.; CARVALHO, Edgar M.; WILSON, Mary E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 129, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061296.

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

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.72.

SILVA-BARRIOS, Sasha; CHARPENTIER, Tania; STÄGER, Simona. The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155-171, 2017. DOI: 10.1016/j.pt.2017.10.001.

SILVA, Juliana *et al.* Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in northeast Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, e0006015, 2017.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x.

SOUSA-ATTA, Maria L. B. *et al.* Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 101-104, 2002. DOI: 10.1128/CDLI.9.1.101-104.2002.

SOUZA, Linton Wallis Figueiredo; SOUZA, Simone Vilas Trancoso; BOTELHO, Ana Cristina Carvalho. Comparative analysis of the geographic distribution of the histopathological spectrum and *Leishmania* species of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n.3, p.369-374, 2012. DOI: 10.1590/s0365-05962012000300003.

STRAZZULLA, Alessio *et al.* Mucosal leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International**, v. 6, p. 805108, 2013. DOI: 10.1155/2013/805108.

TRAPANI, Joseph A. Granzymes: A family of lymphocyte granule serine proteases. **Genome Biology**, v. 2, n. 12, p. reviews3014, 2001. DOI: 10.1186/gb-2001-2-12-reviews3014.

TRAPANI, Joseph A.; SMYTH, Mark J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 735-747, 2002. DOI: 10.1038/nri911.

VEGA-LÓPEZ, Francisco. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003. DOI: 10.1097/00001432-200304000-00006.

WANASEN, Nanchaya; XIN, Lijun; SOONG, Lynn. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 3-4, p. 417-429, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.08.010.

WOELBING, Florian *et al.* Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 1, p. 177-188, 2006. DOI: 10.1084/jem.20052288.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 949, n. xii-xiii, p. 1-186, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro1766.

ZAMBONI, Dario S.; SACKS, David L. Inflammasomes and *Leishmania*: in good times or bad, in sickness or in health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 70-76, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.05.005.

ZHOU, Fang. Perforin: more than just a pore-forming protein. **International Reviews of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 56-76, 2010. DOI: 10.3109/08830180903349644.

APÊNDICES

ARTIGO PUBLICADO: TISSUE DAMAGE IN HUMAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: CORRELATIONS BETWEEN INFLAMMATORY CELLS AND MOLECULE EXPRESSION



ORIGINAL RESEARCH
published: 14 July 2020
doi: 10.3389/fcimb.2020.00355



Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression

Maira Garcia Saldanha¹, Carla Pagliari², Adriano Queiroz¹, Paulo Roberto Lima Machado³, Lucas Carvalho^{1,3}, Phillip Scott⁴, Edgar M. Carvalho^{1,3} and Sérgio Arruda^{1,5*}

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil, ²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁴Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States, ⁵Departamento de Ciências de Vida, Universidade Estadual da Bahia, Salvador, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Javier Moreno,
Instituto de Salud Carlos III
(ISCIII), Spain

Reviewed by:

Fenato Augusto DaMatta,
State University of the North
Fluminense Darcy Ribeiro, Brazil
Clairissa Romero Teixeira,
Oswaldo Cruz Foundation
(FIOCRUZ), Brazil

*Correspondence:

Sérgio Arruda
sa@bahia.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and Infection
Microbiology

Received: 06 December 2019

Accepted: 09 June 2020

Published: 14 July 2020

Citation:

Saldanha MG, Pagliari C, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho L, Scott P, Carvalho EM and Arruda S (2020) Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:355. doi: 10.3389/fcimb.2020.00355

Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by the bite of the infected sand fly, which inoculates parasites of *Leishmania* spp and triggers an immune response. An exacerbated cutaneous inflammatory response is crucial for controlling parasite burden but can also promote tissue damage. This study aimed to characterize the populations of natural killer (NK), CD57⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells, as well as CD68⁺ macrophages, in biopsies of ulcerated CL lesions, and quantify the production of perforin⁺, granzyme B⁺, interleukin 1 beta (IL-1β⁺) and Tumor Necrosis Factor (TNF-α⁺ cells). We then correlated these parameters with necrosis, inflammation and the number of amastigotes. CD4⁺ T cells were positively correlated to the extent of inflammation, B cells and IL-1β⁺ were associated with the extent of necrosis, CD68⁺ macrophages and perforin were correlated with the number of amastigotes, and CD57⁺ NK cells was correlated to CD68⁺ macrophages and amastigotes. In sum, the finding suggests that the production of cytotoxic granules and cytokines by inflammatory cells contributes to tissue damage in CL lesions.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, inflammatory cells, necrosis, amastigotes, tissue damage

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical form presented by individuals infected by protozoa of the genus *Leishmania*. After inoculation of *Leishmania Viannia braziliensis* in the skin by sandflies, a nodular lesion and an exuberant satellite lymphadenopathy is documented (Bomfim et al., 2007; Wind et al., 2014). The classical CL ulcers caused by *L. braziliensis* appear about 2–4 weeks after the presence of nodular lesions and are characterized by well-defined ulcer with raised borders. The evolution of CL is characterized by an exacerbated inflammatory response (Costa et al., 2018). In most infectious diseases, early treatment increases cure rates and decreases healing time; however, the introduction of therapy soon after infection in CL, i.e., prior to the appearance of ulcers, has been associated with a high rate of therapeutic failure (Machado et al., 2002; Unger et al., 2009; Khouri et al., 2014).

The main host defense mechanism against intracellular protozoa is the activation of macrophages by IFN- γ , mainly produced by CD4⁺ T cells (Santos et al., 2013). However as *Leishmania* are able to escape this killing mechanism, the persistence of the parasite and leishmanial antigens induce a marked inflammatory response that is associated with tissue damage and the development of skin ulcers (Santos et al., 2013). Several molecules have been associated with the pathology of *L. braziliensis* infection. Neutrophils are the cells that initially migrate after parasite inoculation, followed by macrophages (Novais et al., 2009; Conceição et al., 2016). The production of IFN- γ by NK cells may contribute to parasite killing, or may be cytotoxic, thereby contributing to this pathology (Muniz et al., 2016; Campos et al., 2017). Subsequently, the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells is observed. T cell activation and the production of cytokines by these cells is determinant in the outcome of infection. An impairment in the host's Th1 immune response results in diffuse CL, which is characterized by multiple nodular lesions consisting predominantly of macrophages with a high parasite burden (Silveira et al., 2004). Alternatively, a normal Th1 immune response induces an exacerbated inflammatory response, leading to the presence of ulcerating lesions in CL (Bacellar et al., 2002; Antonelli et al., 2005; Castro Gomes et al., 2017).

IL-1 β and TNF- α are highly expressed in CL ulcers, and may be involved in the tissue damage arising from *L. braziliensis* infection (Cardoso et al., 2015; Novais et al., 2017). The production of IL-1 β by peripheral blood mononuclear cells is associated with ulcer size (Santos et al., 2013). Treatment with pentoxifylline, a drug that decreases TNF- α production, in combination with meglumine antimoniate, is more effective than antimony alone. Combined therapy not only reduces healing time in patients with mucosal leishmaniasis (ML), but also cures ML patients refractory to antimony therapy alone (Cuba et al., 1984; Lessa et al., 2001; Machado et al., 2002). Further data has indicated the participation of monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, in the pathogenesis of CL, due to increased frequencies of intermediate monocytes referred to as an inflammatory monocyte subset. In CL and ML, macrophages present increased TLR expression, enhanced respiratory burst and produce higher levels of pro-inflammatory cytokines compared to cells from healthy subjects or individuals with subclinical *L. braziliensis* infection (Giudice et al., 2012; Carneiro et al., 2016; Muniz et al., 2016). With regard to the adaptive immune response, the size of CL ulcers is directly correlated with the frequencies of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ and CD69, an early marker of T cell activation (Antonelli et al., 2005). More recently, the role of CD8⁺ T cells has been documented in the pathology of *L. braziliensis* in both mice and humans (Santos et al., 2013; Cardoso et al., 2015; Novais et al., 2018). Studies have shown that the killing of *L. braziliensis*-infected cells by CD8⁺ T cells leads to the increased production of IL-1 β through the activation of the inflammasome, which may exacerbate tissue damage (Santos et al., 2013; Cardoso et al., 2015; Novais et al., 2018). However, most of these studies were conducted in mice or in human peripheral blood mononuclear cells, i.e., there is a paucity of data regarding the cells and molecules that

participate in the pathogenesis of ulcer formation at the lesion site. Accordingly, the present study evaluated cell frequencies and quantified proinflammatory molecules in CL ulcer biopsies in an attempt to contribute to the knowledge surrounding the immunopathogenesis of CL lesions caused by *L. braziliensis*.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study included 22 biopsies from 22 CL patients obtained punch biopsy samples (4 mm) after anesthesia from the border of ulcer and immediately fixed in 10% formalin-buffered solution. CL diagnosis was done by the presence of amastigotes in these biopsies, as well as the detection of *L. braziliensis* DNA by PCR. Patient demographic characteristics, illness duration and lesion size were documented. All patients were subsequently treated with meglumine antimoniate (Glucantime[®], Sanofi Aventis, Gentilly, France) at a dose of 20 mg/Kg.

Immunohistochemistry

Deparaffinization and rehydration of 5- μ m thick sections was performed using xylene and alcohol PA, followed by antigen retrieval with buffer pH 9.0 at 96°C for 20 min. Immunohistochemistry was conducted after blocking peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide for 10 min, and protein activity with Protein Block Serum-Free (DAKO, California, USA) for 15 min. All slides were incubated at 4°C with the following antibodies: Monoclonal Mouse anti-CD57, clone Ab-1, Monoclonal Mouse anti-Perforin, clone 5B10 (ThermoFisher, Massachusetts, USA); Polyclonal Rabbit anti-TNF- α , clone orb129752 (Biorbyt, Cambridge, UK); Monoclonal Mouse anti-IL-1 β , clone 3AC (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA); Polyclonal Rabbit anti-Granzyme B, clone EP230, Monoclonal Mouse anti-CD4, clone EP204, Monoclonal Mouse anti-CD8, clone C8/144B (Cell Marque, California, USA); Monoclonal Mouse anti-CD68, clone PG M1, Monoclonal Mouse anti-CD20, clone L26 (Dako, California, USA); Polyclonal Rabbit anti-*Leishmania* (in house) (Schubach et al., 2001). A Mouse and Rabbit Peroxidase Kit HorseRadish KP500 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) was used to perform reactions according to manufacturer recommendations. All slides were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated and then mounted using Permount (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) on glass coverslips.

Quantitative Analysis

A Nikon 90i Eclipse microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) was coupled to a DS-Fi1 digital camera system (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). All slides were photographed (five randomized fields from each section) at 40 \times and visualized with Nis-Elements software (v. 3.1). In each field, the number of positive cells was counted using the semiautomatic quantification feature of ImageJ software v. 1.48 (National Institutes of Health, Maryland, USA). Positive cells were identified via the amplified molecules that reacted with the chromogenic substrate DAB (eBioscience, California, USA). For all reactions, a preselected pattern was used as a positive control and sections that had

not been incubated with the primary antibody were used as negative controls.

Morphometry of Inflammation and Necrosis Areas

The histological sections stained with hematoxylin and eosin were scanned by an optical microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan). The total extension of these sections as well as the areas of inflammatory infiltrate and necrosis was measured by Image J 1.48v (National Institutes of Health). The total length of the biopsy fragment and the sum of the areas of inflammation and necrosis are shown in mm^2 . The percentage (%) of inflammation and necrosis in the biopsies were calculated by dividing total extension of inflammation and necrosis in mm^2 by the total extension of the biopsy fragment multiplied by 100.

Heatmap and Correlation Matrices

Language R through the RStudio interface (v1.2.5019) was used for plotting heatmaps and correlation matrices between the parameters and markers observed. The functions *corrplot* and *corrgram* was used to track the heatmaps and correlation matrices, respectively, using Pearson's statistical method. Positive correlations are displayed in blue and negative correlations in red

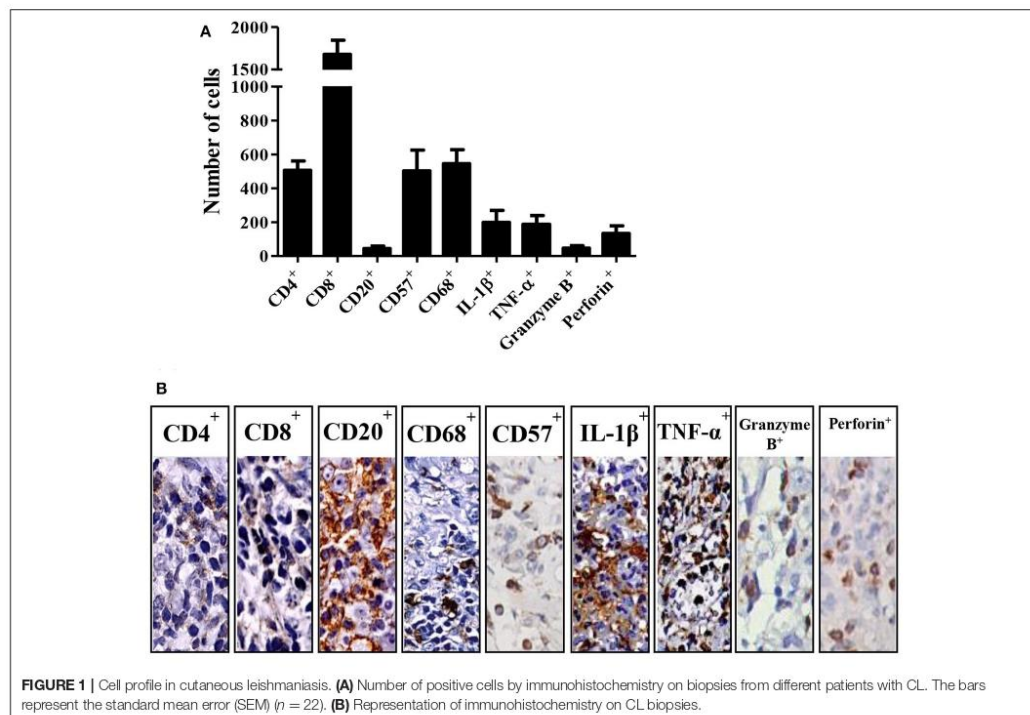
color. Color intensity and the size of the circle are proportional to the correlation coefficients.

RESULTS

A total of 22 patients were enrolled with mean age of 40 years and 16 were male, corresponding to 73% of the study sample. Fifteen patients presented lymphadenopathy and lesions were more frequent in the lower limbs (86%) than the upper limbs (14%). The average duration of ulcers was 43 ± 25 days at the time of patient examination, with an average lesion size of $376 \pm 336 \text{ mm}^2$.

Figure 1 illustrates the frequencies of cells expressing CD4^+ , CD8^+ , CD20^+ , CD57^+ , CD68^+ , $\text{IL-1}\beta^+$, $\text{TNF-}\alpha^+$, granzyme B^+ and perforin $^+$ in tissue biopsies from CL patients. CD8^+ cells were the most frequent, followed by CD68^+ , CD57^+ , and CD4^+ (**Figure 1A**). Regarding the molecules secreted by these cells, $\text{IL-1}\beta^+$ and $\text{TNF-}\alpha^+$ were found to be the most highly expressed, mainly in individuals with lymphadenopathy, followed by perforin $^+$ and granzyme B^+ (**Figure 1B**).

Figure 2 depicts correlations between the observed histopathological features and the frequencies of cells and molecules expressed by these cells, in addition to associated R values (**Figure 2A**). The inflammation seen in CL is characterized



by the infiltration of mononuclear cells throughout the duration of the illness (Faria et al., 2009; Dantas et al., 2014). Increased infiltration is seen, ranging from mild in the early phase of disease, before the appearance of ulcers, which increases during ulcer development (Saldanha et al., 2017). Inflammation was found to be directly associated with the frequency of CD4⁺ T cells ($R = 0.40$; $P = 0.05$; **Figure 2B**).

Necrosis in CL ulcers are secondary to tissue damage due to the killing of macrophages infected with *L. braziliensis*, or the killing of cells expressing parasite antigens. However, the extent of necrosis in CL ulcers was reduced compared to the area of inflammation. No direct correlations were found between these two variables. However, IL-1 β ⁺ expression was strongly correlated with necrosis ($R = 0.79$; $P < 0.0001$; **Figure 2C**). Interestingly, the presence of B cells was also strongly correlated with necrosis ($R = 0.61$; $P < 0.0001$; **Figure 2D**).

Figures 2E,F shows the most frequent cells type and molecules associated with the presence of amastigotes in CL ulcers. As expected, the number of parasites was directly correlated with the presence of CD68⁺ macrophages ($R = 0.63$; $P < 0.0001$), as well as with the frequency of cells expressing perforin ($R = 0.68$; $P < 0.0001$).

Furthermore, there was no correlation of CD57⁺ NK cells with inflammation or necrosis, but these cells were positively correlated to CD68⁺ macrophages ($R = 0.42$; $P < 0.05$) and amastigotes numbers ($R = 0.36$; $P < 0.05$; **Figures 2G,H**).

DISCUSSION

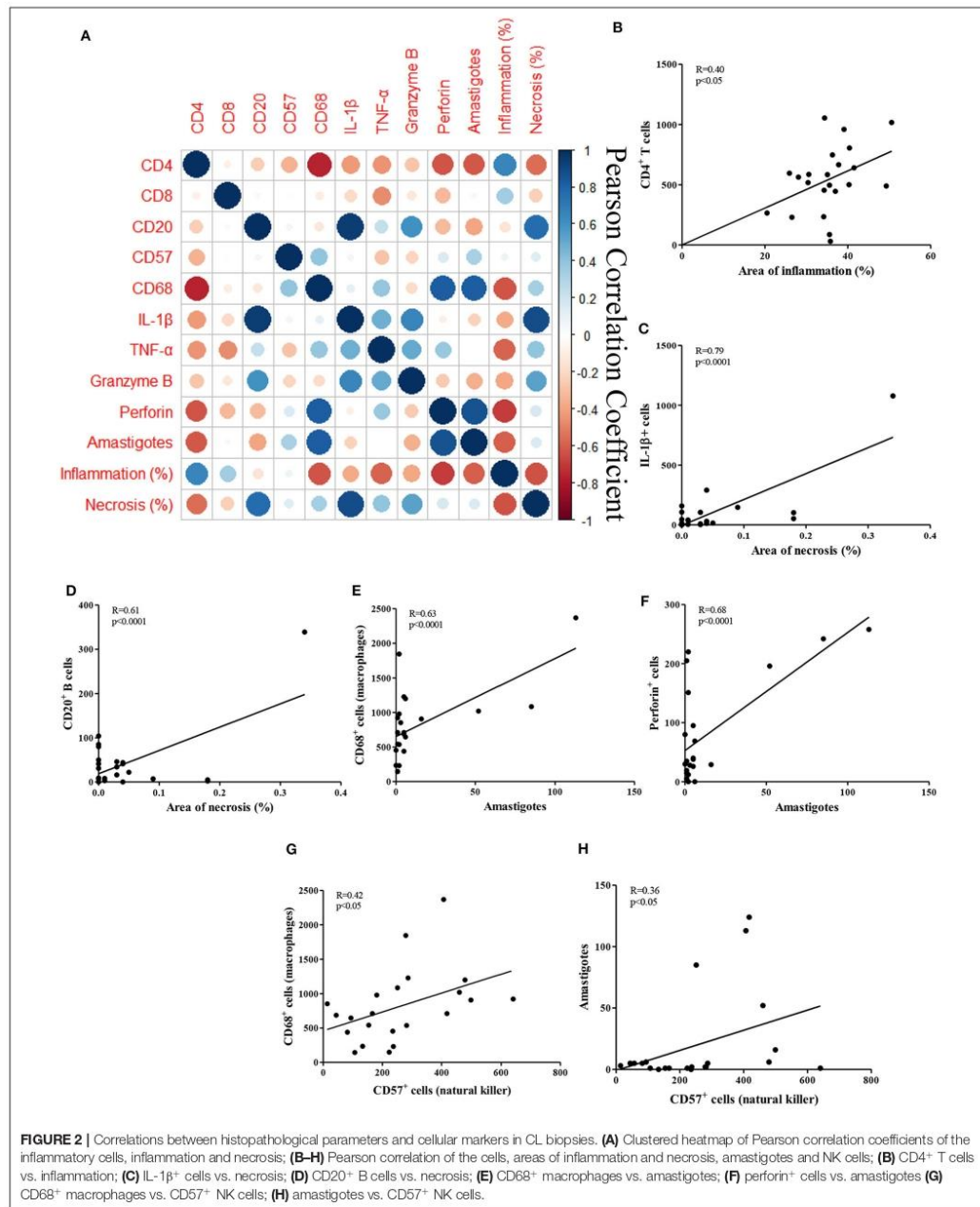
The histological analysis of ulcerated lesions from patients with CL indicated chronic inflammation, with a predominance of mononuclear cellular infiltrate (Faria et al., 2009; Dantas, 2012). In the present study sample, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes were highly expressed in ulcerative lesion biopsies. Both of these lymphocyte populations have been associated with protection and pathology. CD4⁺ T cells play a protective role through the production of IFN- γ , the main cytokine responsible for the activation of macrophages, which leads to intracellular parasite killing (Santos et al., 2013). Alternatively, CD8⁺ T cells have been more associated with tissue damage due to cytotoxic activity (Glennie and Scott, 2016; Castro Gomes et al., 2017). Here, we found cells expressing CD8⁺, CD4⁺ and CD68⁺ were the most frequent in tissue samples, and CD4⁺ cells were also positively correlated with the extent of inflammation. A previous study in CL patients demonstrated a direct correlation between the frequency of peripheral blood CD4⁺ T cells expressing IFN- γ , as well as TNF- α , and lesion size (Antonelli et al., 2005). It is well known that the production of IFN- γ by CD4⁺ T cells activates monocytes/macrophages and enhances the production of pro-inflammatory cytokines, which may contribute to the inflammatory response (Bacellar et al., 2002; Faria et al., 2009; Santos et al., 2013; Cardoso et al., 2015). Nonetheless, we found a negative correlation between CD4⁺ cells and CD68⁺ macrophages, CD4⁺ cells and the number of amastigotes and CD4⁺ cells and necrosis that are against a significant role of these cells in the pathology of CL.

CD8⁺ T cells were the most frequent cell type found in tissue biopsies from CL patients. Evidence indicates that these cells play an important role in the pathogenesis of *L. braziliensis* infection (Dantas et al., 2013; Novais et al., 2013). However, despite the high frequency of CD8⁺ T cells in the present tissue samples, we found no correlations between this cell population and the presence of amastigotes, nor inflammation or necrosis. This apparent discrepancy may be due to several factors. In fact, the production of granzyme and perforin molecules is more important than the frequency of CD8⁺ T cells, since these are directly involved in the lysing of target. In the tissue, granzyme was positively associated with necrosis and slightly negatively associated with amastigotes and inflammation, while perforin was strongly positively associated with amastigotes and slightly with necrosis, yet slightly negatively associated with inflammation. A large percentage of cells were found to express CD57⁺, a marker associated with highly cytotoxic CD8⁺ or NK cells (Kared et al., 2016). Moreover, CD57⁺ cells were the only cell type whose frequency was directly correlated with macrophages and amastigotes, suggesting the participation of CD57⁺ cells in killing infected macrophages.

Since *Leishmania* is an intracellular parasite, little emphasis has been placed on the presence of B cells and antibodies in the pathogenesis of the disease. However, B cells and plasma cells are documented in the tissue of CL patients, and anti-leishmanial antibodies are highly produced in severe of *Leishmania* spp. infection, such as the visceral form and diffuse cutaneous lesions (Bomfim et al., 2007; Rodriguez-Pinto et al., 2014). Nonetheless, the role of B cells and antibodies in the pathology of CL has not been well-studied. Oponization by antibodies may enhance parasite uptake by macrophages. In addition, form immune complex deposition can contribute to tissue pathology. Here we found a strong direct correlation between CD20⁺ and IL-1 β ⁺ expression, as well as between CD20⁺ and the extent of necrosis, which highlights the need for future study to evaluate the role of B cells and antibodies in the pathogenesis of CL.

Necrotic cell death may contribute to granuloma formation, inflammation and tissue damage. The role of IL-1 β ⁺ and TNF- α ⁺ has been well studied in in CL mouse models, and high levels of both cytokines are produced by peripheral blood mononuclear cells in CL patients (Antonelli et al., 2005; Campos et al., 2014; Passos et al., 2015). IL-1 β ⁺ can be produced by a variety of cells, including inflammatory monocytes, B lymphocytes, and epithelial and NK cells (Carvalho et al., 2012; Novais et al., 2017). Recently, IL-1 β ⁺, through inflammasome activation, as well as cytotoxic CD8⁺ T cells have both been associated with tissue damage in *L. braziliensis* infection (Novais et al., 2017). Here IL-1 β ⁺ and TNF- α ⁺ were both more frequent in patients with lymphadenopathy, and were positively correlated with granzyme expression, and necrosis was also strongly directly correlated with IL-1 β ⁺, which suggests that this cytokines plays a key role in the pathology of CL.

Gene expression analysis in biopsied human CL ulcerative lesions revealed high expression of IL-1 β ⁺, TNF- α ⁺, granzyme and perforin, as well as other molecules (Novais et al., 2017). The perforin and granzymes produced by NK cells and T lymphocytes promote the apoptosis of infected cells (Trapani and Smyth,



2002). Perforin forms pores in target cells and also participates in the upregulation of CD8 (Zhou, 2010), while granzymes lyse intracellular pathogens (Arias et al., 2014). Our *in situ* findings in human CL lesions suggest that the associations between inflammatory cells and the intense production of cytokines and cytotoxic products may contribute to necrosis and potentially participate in the formation of CL ulcers.

CONCLUSION

This study attempted to establish correlations between histopathological CL parameters in order to elucidate the pathogenesis of this disease. We suggest that, in an effort to control parasites, infected macrophages are likely to remain in an activated state due to the production of proinflammatory cytokines by CD4⁺ T cells, in particular IL-1β⁺, thus potentially contributing to tissue necrosis. In addition, the exacerbated production of cytotoxic granules containing perforin by CD8⁺ T cells and NK cells can aggravate tissue destruction, thereby intensifying skin ulcer formation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/supplementary material.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board (Instituto Gonçalo Moniz—IGM-FIOCRUZ, no. 533.032/2014). The

patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, SA, EC, and CP planned research and coordinated the study. MS, CP, and LC performed the experiments. PM and AQ provided the clinical samples. MS, EC, PS, and SA analyzed the data. MS and SA wrote the manuscript with contributions from EC, PS, and CP. All authors read and approved the submitted version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by National Institutes of Health (grant AI088650) and Conselho Nacional de Pesquisa Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia—Doenças Tropicais (project no. 573839/2008-5). The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or manuscript preparation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Mirian Nacagami Sotto and her staff for their assistance and for providing services at the Communicable Diseases Pathology Laboratory of the São Paulo University Medical School. We also thank Cristiano Sampaio Franco for his assistance in the preparation of the manuscript. The authors are grateful to Andris K. Walter for English revision and copyediting services.

REFERENCES

- Antonelli, L. R. V., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., and Gollob, K. J. (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 101, 226–230. doi: 10.1016/j.imlet.2005.06.004
- Arias, M. A., JiménezdeBagües, M. P., Aguiló, N., Mena, S., Hervás-Stubbs, S., de Martino, A., et al. (2014). Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. *Cell Rep.* 8, 420–429. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.012
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., et al. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 70, 6734–6740. doi: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
- Bomfim, G., Andrade, B. B., Santos, S., Clarêncio, J., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2007). Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: Insights into the early phases of human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 854–859. doi: 10.4269/ajtmh.2007.77.854
- Campos, T. M., Costa, R., Passos, S., and Carvalho, L. P. (2017). Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 733–740. doi: 10.1590/0074-02760170109
- Campos, T. M., Passos, S. T., Novais, F. O., Beiting, D. P., Costa, R. S., Queiroz, A., et al. (2014). Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e3282. doi: 10.1371/journal.pntd.0003282
- Cardoso, T. M., Machado, A., Costa, D. L., Carvalho, L. P., Queiroz, A., Machado, P., et al. (2015). Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect. Immun.* 83, 898–906. doi: 10.1128/IAI.02404-14
- Carneiro, P. P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhães, V., Carvalho, E. M., and Bacellar, O. (2016). The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE* 11:e148084. doi: 10.1371/journal.pone.0148084
- Carvalho, L. P., Passos, S., Schriefer, A., and Carvalho, E. M. (2012). Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front. Immunol.* 3:301. doi: 10.3389/fimmu.2012.00301
- Castro Gomes, C. M., Sousa, M. G. T., Menezes, J. P. B., Batista, M. C., Lima, A. C. S., Belda, W., et al. (2017). Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania (Viannia) spp.* in Amazonian Brazil. *Parasitol. Res.* 116, 1423–1431. doi: 10.1007/s00436-017-5403-4
- Conceição, J., Davis, R., Carneiro, P. P., Giudice, A., Muniz, A. C., Wilson, M. E., et al. (2016). Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004715. doi: 10.1371/journal.pntd.0004715
- Costa, R. S., Carvalho, L. P., Campos, T. M., Magalhães, A. S., Passos, S. T., Schriefer, A., et al. (2018). Early cutaneous leishmaniasis patients infected with *leishmania braziliensis* express increased inflammatory responses after antimony therapy. *J. Infect. Dis.* 217, 840–850. doi: 10.1093/infdis/jix627
- Cuba, C. C., Llanos-Cuentas, E. A., Barreto, A. C., Magalhães, A. V., Lago, E. L., Reed, S. G., et al. (1984). Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 17, 161–167. doi: 10.1590/S0037-86821984000400002

- Dantas, M. L. (2012). *Aspectos Comparativos da Resposta Inflamatória em Lesões de Leishmaniose Cutânea Localizada e Disseminada* (Salvador: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz).
- Dantas, M. L., de Oliveira, J. M. G. C., Carvalho, L., Passos, S. T., Queiroz, A., Guimarães, L. H., et al. (2014). Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 202–209. doi: 10.1590/0074-0276130312
- Dantas, M. L., Oliveira, J. C., De Carvalho, L., Passos, S. T., Queiroz, A., Machado, P., et al. (2013). Major Article CD8⁺ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 728–734. doi: 10.1590/0037-8682-0174-2013
- Faria, D. R., Souza, P. E. A., Durães, F. V., Carvalho, E. M., Gollob, K. J., MacHado, P. R., et al. (2009). Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31, 432–439. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01125.x
- Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L. P., Delavechia, T., Carvalho, E. M., et al. (2012). Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect. Dis.* 12:75. doi: 10.1186/1471-2334-12-75
- Glennie, N. D., and Scott, P. (2016). Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. *Cell. Immunol.* 309, 50–54. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.010
- Kared, H., Martelli, S., Ng, T. P., Pender, S. L. F., and Larbi, A. (2016). CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 441–452. doi: 10.1007/s00262-016-1803-z
- Khourri, R., Santos, G. S., Soares, G., Costa, J. M., Barral, A., Barral-Netto, M., et al. (2014). SOD1 plasma level as a biomarker for therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 210, 306–310. doi: 10.1093/infdis/jiu087
- Lessa, H. A., Machado, P., Lima, F., Cruz, Á. A., Bacellar, O., Guerreiro, J., et al. (2001). Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 87–89. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.87
- Machado, P., Araújo, C., Da Silva, A. T., Almeida, R. P., D'Oliveira A. Jr., Bittencourt, A., et al. (2002). Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin. Infect. Dis.* 34, E69–E73. doi: 10.1086/340526
- Muniz, A. C., Bacellar, O., Lima Lago, E., Carvalho, A. M., Carneiro, P. P., Guimarães, L. H., et al. (2016). Immunologic markers of protection in leishmania (viannia) braziliensis infection: a 5-year cohort study. *J. Infect. Dis.* 214, 570–576. doi: 10.1093/infdis/jiw196
- Novais, F. O., Carvalho, A. M., Clark, M. L., Carvalho, L. P., Beiting, D. P., Brodsky, I. E., et al. (2017). CD8⁺ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog.* 13:e1006196. doi: 10.1371/journal.ppat.1006196
- Novais, F. O., Carvalho, L. P., Graff, J. W., Beiting, D. P., Ruthel, G., Roos, D. S., et al. (2013). Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 9:e1003504. doi: 10.1371/journal.ppat.1003504
- Novais, F. O., Santiago, R. C., Báfica, A., Khourri, R., Afonso, L., Borges, V. M., et al. (2009). Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J. Immunol.* 183, 8088–8098. doi: 10.4049/jimmunol.0803720
- Novais, F. O., Wong, A. C., Villareal, D. O., Beiting, D. P., and Scott, P. (2018). CD8⁺ T Cells Lack local signals to produce IFN- γ in the skin during leishmania infection. *J. Immunol.* 13:e1006196. doi: 10.4049/jimmunol.1701597
- Passos, S., Carvalho, L. P., Costa, R. S., Campos, T. M., Novais, F. O., Magalhães, A., et al. (2015). Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in leishmania braziliensis infections. *J. Infect. Dis.* 211, 274–282. doi: 10.1093/infdis/jiu439
- Rodriguez-Pinto, D., Saravia, N. G., and McMahon-Pratt, D. (2014). CD4 T cell activation by B cells in human Leishmania (Viannia) infection. *BMC Infect. Dis.* 14:108. doi: 10.1186/1471-2334-14-108
- Saldanha, M. G., Queiroz, A., Machado, P. R. L., de Carvalho, L. P., Scott, P., de Carvalho Filho, E. M., et al. (2017). Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16:0539. doi: 10.4269/ajtmh.16-0539
- Santos, C., da, S., Boaventura, V., Ribeiro Cardoso, C., Tavares, N., Lordelo, M. J., et al. (2013). CD8⁺ Granzyme B \pm mediated tissue injury vs. CD4⁺IFN γ ⁺-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1533–1540. doi: 10.1038/jid.2013.4
- Schubach, A., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A. V., Sartori, A., De Oliveira-Neto, M. P., Mattos, M. S., et al. (2001). Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 987–996. doi: 10.1590/S0074-02762001000700018
- Silveira, F. T., Lainson, R., and Corbett, C. E. P. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 239–251. doi: 10.1590/S0074-02762004000300001
- Trapani, J. A., and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735–747. doi: 10.1038/nri911
- Unger, A., Angeles, L., Neal, S. O., Sam, S. W., Park, J., Or, P., et al. (2009). Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 574–579. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.574
- Wind, B. S., Guimarães, L. H., and Machado, P. R. L. (2014). Erythema exudativum multiforme after a Leishmania skin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 587–588. doi: 10.4269/ajtmh.13-0166
- Zhou, F. (2010). Perforin: more than just a pore-forming protein. *Int. Rev. Immunol.* 29, 56–76. doi: 10.3109/08830180903349644

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Saldanha, Pagliari, Queiroz, Machado, Carvalho, Scott, Carvalho and Arruda. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTIGO PUBLICADO: CHARACTERIZATION OF THE HISTOPATHOLOGIC FEATURES IN PATIENTS IN THE EARLY AND LATE PHASES OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Am. J. Trop. Med. Hyg., 96(3), 2017, pp. 645–652
doi:10.4269/ajtmh.16-0539
Copyright © 2017 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis

Máira G. Saldanha,¹ Adriano Queiroz,¹ Paulo Roberto L. Machado,² Lucas P. de Carvalho,^{1,2} Phillip Scott,³ Edgar M. de Carvalho Filho,^{1,2} and Sérgio Arruda^{1*}

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil; ²Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; ³Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

Abstract. Cutaneous leishmaniasis (CL), characterized by an ulcerated lesion, is the most common clinical form of human leishmaniasis. Before the ulcer develops, patients infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis* present a small papule at the site of the sandfly bite, referred to as early cutaneous leishmaniasis (E-CL). Two to four weeks later the typical ulcer develops, which is considered here as late CL (L-CL). Although there is a great deal known about T-cell responses in patients with L-CL, there is little information about the in situ inflammatory response in E-CL. Histological sections of skin biopsies from 15 E-CL and 28 L-CL patients were stained by hematoxylin and eosin to measure the area infiltrated by cells, as well as tissue necrosis. *Leishmania braziliensis* amastigotes, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, and CD68⁺ cells were identified and quantified by immunohistochemistry. The number of amastigotes in E-CL was higher than in L-CL, and the inflammation area was larger in classical ulcers than in E-CL. There was no relationship between the number of parasites and magnitude of the inflammation area, or with the lesion size. However, there was a direct correlation between the number of macrophages and the lesion size in E-CL, and between the number of macrophages and necrotic area throughout the course of the disease. These positive correlations suggest that macrophages are directly involved in the pathology of *L. braziliensis*-induced lesions.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a broad term for anthropological zoonotic diseases caused by trypanosomes of the genus *Leishmania*. American tegumentary leishmaniasis (ATL) is characterized by a spectrum of clinical features, including asymptomatic infection, cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis, and disseminated leishmaniasis. CL is the main clinical form of the disease and it is characterized by one or more well-limited ulcers with raised borders, which develop at the site of the bite of infected sandfly. However, before the classical ulcer appears, patients often develop a lymphadenopathy in the lymph nodes draining the infection site, followed by the appearance of a nodule with a small superficial ulceration, which characterizes early CL (E-CL).^{1,2} The initial lesion increases in size and depth and between 4 and 6 weeks after the sandfly bite eventually forms an ulcer, the primary feature of late CL (L-CL). After the parasites are inoculated into the host, they interact with several different cell types, including macrophages, the major cell that harbors the parasite. Activation of macrophages by interferon (IFN)- γ produced by CD4⁺ T cells contribute to control parasite growth,^{3,4} whereas CD8⁺ T cells have been associated with pathology.^{5–7} Histopathological studies in ulcers of L-CL patients show an increase in inflammatory response, with the participation of T cells, B cells, plasma cells, macrophages, and the development of a granuloma.^{8–11} Although an intense lymphocyte proliferation and production of IFN- γ and tumor necrosis factor is induced on *Leishmania* antigen stimulation of peripheral blood mononuclear cells from patients with L-CL,¹² in the preulcerative phase of the disease, lymphocyte proliferation, and cytokine production is lower than in patients with L-CL.¹³ Nevertheless, when compared with healthy subjects,

E-CL patients exhibit an increase in the frequency of inflammatory or intermediate monocytes, produce higher levels of proinflammatory cytokines, and exhibit substantial transcriptional changes at the infection site.^{2,14} However, the histopathological features of E-CL have not been described. Therefore, in this study, we compared the histopathological features of biopsies from patients with E-CL and L-CL. We found that there are more parasites in biopsies from E-CL patients as compared with L-CL. Interestingly, there was no correlation between the number of parasites and the amount of inflammation or size of the lesions. However, there was a direct correlation between the number of macrophages with the area of necrosis and size of the ulcers.

METHODS

Study design. This is a cross-sectional study aimed to compare the histopathological features of skin biopsies from patients with E-CL and L-CL. Patients were attended in the Health Post of Corte de Pedra, Bahia, Brazil, reference center in the treatment of tegumentary leishmaniasis. All patients included in the study were adult. The study was carried out from April 2009 to May 2014. For every E-CL case selected and biopsied, two patients with L-CL were recruited by matching by age ± 5 years. All patients denied previous history of CL and were clinically examined before therapy. After CL diagnosis, all were treated with intravenous glucantime 20 mg/kg/weight for 20 days as per the recommendation of Brazilian Ministry guidelines for CL. The clinical information used in this study was obtained from a public health clinic located in the rural countryside of the state of Bahia. Unfortunately, some data were incompletely recorded on the patient charts and, consequently, some analyses had data missing. The relevant sample size is consistently referenced in figures, tables, and descriptive texts.

Biopsies and case definition. E-CL is defined by the presence of a papular lesion occurring, according to patient reporting, within approximately 30 days of being bit by a

*Address correspondence to Sérgio Arruda, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Brazil CEP, 40296-710. E-mail: sa@bahia.fiocruz.br

phlebotomine.¹ Patients with early cutaneous leishmaniasis seek medical attention due to the presence of a papular lesion associated with a painful regional lymphadenopathy. Ulcers typically appear 1–2 weeks after the appearance of papular lesions, which develop approximately 1–2 weeks after being bit by a sandfly.

Fifteen biopsies from E-CL and 28 from L-CL patients were analyzed. E-CL was defined by the presence of a papular lesion with less than 30 days of illness and a positive polymerase chain reaction (PCR) for *Leishmania braziliensis*. L-CL was defined by the presence of one ulcerated lesion with raised borders and a positive PCR for *L. braziliensis*. Only one skin fragment was obtained from each patient, and they were performed with a 4-mm punch. This fragment was divided in two parts, one for processing, and histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H and E) and for immunohistochemical analysis, and other fragment was reserved in RNA for the quantitative PCR later.¹⁵

Ethical considerations. This study was approved by the Human Ethics Committee of the Research Center Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia, protocol number 533.032/2014, and the Institutional Review Board of the Faculdade de Medicina da Bahia, Federal University of Bahia. A signed informed consent was obtained from all patients included in this study.

Immunohistochemistry. Skin biopsies were fixed in buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Embedded tissue was cut in 5- μ m thick sections, deparaffinized, and rehydrated. Antigens retrievals were performed using the Trilogy™ 1:100 (Cell Marque, Darmstadt, Hesse, Germany) at 96°C. Peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes and antibody nonspecific binding was blocked by the addition of serum-free protein (DakoCytomation, Carpinteria, CA) for 10 minutes. The slides were incubated at 25°C for 1 hour with the following monoclonal mouse anti-human antibodies and dilutions: anti-CD4, clone 4B12, 1:50 (DakoCytomation); anti-CD8, clone C8/144B, 1:200 (Cell Marque, Darmstadt); anti-CD20, clone L26, 1:200 (Dako Cytomation); anti-CD68, clone M0814, 1:200 (DakoCytomation, Carpinteria, CA), and anti-*L. braziliensis* 1:1000 (in-house CPqGM Fiocruz).¹⁶ Peroxidase Kit and Rabbit mouse/horseradish peroxidase KP500 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA) and 3,3-diaminobenzidine tetrahydroxy-

chloride was used to develop the antigen antibody reaction. All slides were counterstained by Harris hematoxylin, dehydrated, and mounted in Canada balsam and glass coverslips.

Quantitative analysis. The cells quantification was performed using an optical microscope BX51 (Olympus, Center Valley, PA) coupled with digital camera system Q5 (Olympus) and imaging software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD) to the micrograph of the slides was used. Ten random fields of each section with the respective antibodies were photographed using a magnifying power $\times 400$. In each field, the number of positive cells was quantified using the counting feature of the semiautomatic software ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Positivity was defined with the identification of cells that reacted with the chromogenic substrate.

Morphometry of inflammation and necrosis areas. The histological sections stained with H and E were scanned by an optical microscope BX61VS (Olympus, Center Valley, PA). The total extension of these sections as well as the areas of inflammatory infiltrate and necrosis was measured by Image J 1.48v (National Institutes of Health). The total length of the biopsy fragment and the sum of the areas of inflammation and necrosis are shown in mm². The percentage (%) of inflammation and necrosis in the biopsies were calculated by dividing total extension of inflammation and necrosis in mm² by the total extension of the biopsy fragment multiplied by 100.

Statistical analysis. For variables with normal distribution, we used the Student *t* test and post two-way analysis of variance test. For non-normal distribution, the nonparametric Mann-Whitney test was used. For correlations of normally distributed variables and non-normal, we used Pearson and Spearman tests, respectively. The strength of correlation was classified as: weak ($r = 0.10$ – 0.30), moderate ($r = 0.40$ – 0.60), and strong ($r = 0.70$ – 1). For comparison of the proportions, we used the Fisher's exact and χ^2 test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 1.5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The results were considered statistically significant for $P < 0.05$.

RESULTS

Sociodemographic and clinical aspects. The sociodemographic and clinical features of the participants were

TABLE 1
Sociodemographic and clinical data of patients with E-CL and L-CL

	E-CL (N = 15)	L-CL (N = 28)	P
Age (years)*	36.9 \pm 3.0	39.3 \pm 2.9	ns‡
Gender n (%)			ns§
Female	5 (33.3)	6 (21.4)	
Male	10 (66.7)	22 (78.6)	
Lesion site n (%)			ns¶
Lower limbs	13 (86.7)	24 (85.7)	
Upper limbs	1 (6.7)	3 (10.7)	
Others	1 (6.6)	1 (3.6)	
Lymphadenopathy n (%)†			ns¶
Yes	14 (93.3)	17 (63.0)	
No	1 (6.7)	10 (37.0)	
Skin test (mm ²)*	129.5 \pm 15.4	196.9 \pm 22.8	< 0.05‡
Size of lesion (mm ²)*¶	52.1 \pm 11.1	346.8 \pm 60.0	< 0.0001‡
Time of lesion (days)*	17.4 \pm 1.6	40.6 \pm 4.4	< 0.0001‡

E-CL = early cutaneous leishmaniasis; L-CL = late cutaneous leishmaniasis; ns = not significant.

*Mean \pm SEM (standard error of the mean).

†Data missing; one less lymphadenopathy in L-CL and one less size of lesion in E-CL measurements.

‡Student's *t* test.

§Chi-squared test.

¶Fisher's exact test.

D

EARLY AND LATE PHASES OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

647

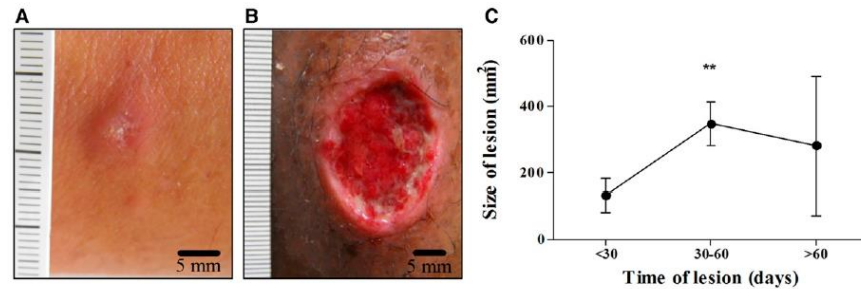


FIGURE 1. Differences between E-CL and L-CL lesions. (A) Papular lesion picture in E-CL compared with (B) L-CL ulcerated lesion caused by *Leishmania braziliensis*. (C) Size of skin lesions (mm²) according to duration of the disease ($N = 43$). ** $P < 0.001$ Kruskal–Wallis test. The bars represent standard error. To correlate the size of the lesion with the illness duration, we divided the sample into three groups. In the first group, we included patients with less than 30 days of illness; the second between 30 and 60 days; and the last over 60 days. E-CL = early cutaneous leishmaniasis; L-CL = late cutaneous leishmaniasis.

stratified according to disease stage and are shown in Table 1. The age distribution was similar in the two groups. Males were more affected by the disease than women and the predominant localization of the lesions was in the lower limbs in both in E-CL and L-CL. The size of the *Leishmania* skin test was greater in patients with L-CL than in E-CL ($P < 0.05$) as well as the duration of the illness ($P < 0.0001$). Pictures of an E-CL lesion and a classical ulcer from L-CL are shown in Figure 1A and B, respectively, and the size of lesions in different periods of the disease is shown in Figure 1C. The increase in the size and depth of the initial lesion occurred mainly in the first 30 days of the disease from 52.1 ± 11.1 up to 346.8 ± 60.0 mm².

Identification of amastigotes and relationship between *L. braziliensis* amastigotes with illness duration and lesion size. Confirming what was observed in H and E (Figure 2A), tissue amastigotes were detected by immunohistochemistry using anti *L. braziliensis* IgG antibody (Figure 2B). In biopsies from E-CL analyzed by TEM, amastigotes were seen within macrophages (Figure 2C). Amastigotes were found mainly in the parasitophorous vacuole of macrophages, at the upper region of the dermis adjacent to the epidermis,

as well as in areas of necrosis. No correlation was found between the number of amastigotes and areas of inflammation and necrosis (data not shown).

The relationship between the parasite load with phase of the disease, duration of illness, and lesion size is shown in Figure 3. The parasitism was more intense in recent lesions than in classical ulcers. The number of parasites on 10 random fields under an optical microscope had a mean \pm standard error of mean of 150 ± 56.6 for the E-CL and only 21 ± 8.0 in L-CL, $P < 0.01$ (Figure 3A). The relationship between the number of amastigotes and illness duration and size of the lesion is shown in Figure 3B and C. The number of amastigotes decreased with the illness duration and with the lesion size but did not reach statistical significance. The number of amastigotes was higher in papular lesions and decreased at the time of the ulceration indicating that ulcer formation is associated with a reduced parasite burden in the site.

Inflammatory cell profile. The inflammatory profile in both groups revealed a predominance of lymphocytes and CD68⁺ macrophages. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were present throughout the sample from the dermal-epidermal

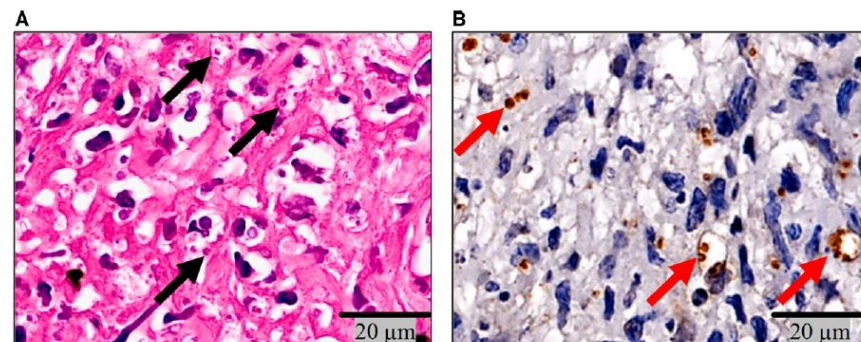


FIGURE 2. Amastigotes of *Leishmania braziliensis* in macrophages of E-CL. Amastigotes of *L. braziliensis* (A) in H and E ($\times 40$) (black arrows) and (B) immunostained with polyclonal antibody (red arrows) ($\times 40$). E-CL = early cutaneous leishmaniasis; L-CL = late cutaneous leishmaniasis; H and E = hematoxylin and eosin.

648

SALDANHA AND OTHERS

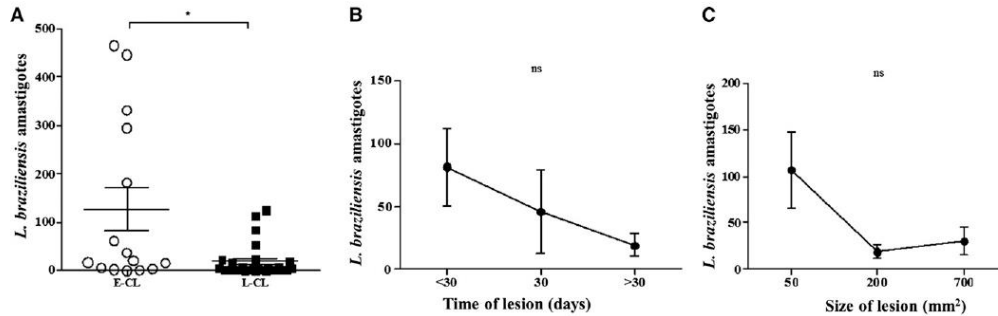


FIGURE 3. Number of amastigotes in E-CL and L-CL lesions. (A) Number of amastigotes of *Leishmania braziliensis* for 10 randomized fields of the histological sections from E-CL ($N = 15$) and L-CL ($N = 28$). * $P < 0.01$. The bars represent the mean and standard error. Statistical analysis was performed using the Student's t test. (B) Number of amastigotes according to the time of lesion and (C) according to lesion size. $P =$ not significant (ns). Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test. E-CL = early cutaneous leishmaniasis; L-CL = late cutaneous leishmaniasis.

junction and in granulomas. CD20⁺ B lymphocytes predominated in the middle portion of the dermis. The number of CD20⁺ cells did not differ significantly between early and late lesions, while there was an increase in the number of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in L-CL lesions compared with E-CL (Figure 4). Macrophages were observed infiltrating the dermis at the junction of the epidermis and dermis up to hypodermis (Figure 5A,B). Together with lymphocytes they were also present in areas of necrosis. Plasma cells, giant cells, and granulomas were seen. Vasculitis near the necrotic areas was also detected. Was observed a positive correlation observed between the number of macrophages and lesion size in E-CL (Figure 5C and D), there was no correlation between the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and lesion size in E-CL ($P > 0.05$).

Areas of inflammation and necrosis. The area of inflammation and necrosis in E-CL and L-CL and the relationship between them with the size of the lesions are shown in Figure 6. As might be expected, the area of inflammation in E-CL ($28.4\% \pm 4.2$) was lower than in L-CL ($49.8\% \pm 3.8$) (Figure 6A). Lytic necrosis was seen in small areas. There was no difference between area of necrosis in both groups analyzed (Figure 6B). There was also no correlation between

the percentage of the areas of inflammation and necrosis in both groups (data not shown).

Although there was no association between CD68⁺ cells with the area of inflammation, there was a positive and significant correlation between the frequency of CD20⁺ B cells and the inflammation ($R = 0.51$; $P < 0.05$) (data not shown). There was a direct correlation between the number of CD68⁺ cells and the area of necrosis in both phases of the disease (E-CL and L-CL) (Figure 7A and B). Finally, we found a direct correlation between the frequency of T and B cells and inflammation, but no correlation between the number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells with the number of amastigotes, the lesion size, or the area of necrosis.

DISCUSSION

The cutaneous ulcer with raised borders is the most common presentation of CL occurring in more than 90% of patients infected with *Leishmania Viannia braziliensis*. However, before the ulcer appears in the skin, patients often present with a lymphadenopathy usually with a mild skin desquamation at the site of the parasite inoculation. This is followed by the development of a nodule that leads to a detectable ulcer. This initial phase of the disease characterizes E-CL. Although the immunopathology of the classical ulcerated lesion, a feature of L-CL, is well described, there is a lack of information about the histopathology in E-CL. In this study, we showed that parasite load is higher in E-CL than L-CL, but the parasite load is neither associated with the size of the ulcers or with ulcer development. Alternatively, there was a direct correlation between the frequency of macrophages with the area of necrosis and ulcer size.

Different from CL caused by other *Leishmania* species in which parasites are easily found in the skin lesion,¹⁷ in *L. braziliensis* ulcers, amastigotes are scarce or even absent under light microscopy examination. Here we showed that the amount of amastigotes was higher in E-CL than in L-CL biopsies. As expected, amastigotes were predominantly found inside macrophages, but parasites were also found outside of these cells and in the collagen of dermis. The absence of association between the parasite load and the

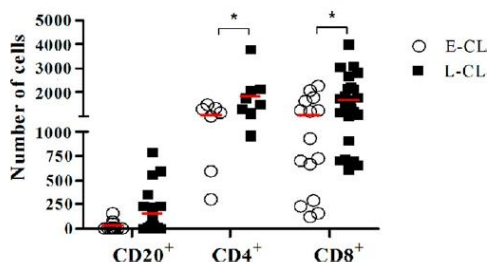


FIGURE 4. The number of B and T cells between E-CL and L-CL. Comparison of number of CD20⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells in 10 microscopic fields of E-CL and L-CL histological sections. The bars represent mean. * $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using t student, post two-way ANOVA.

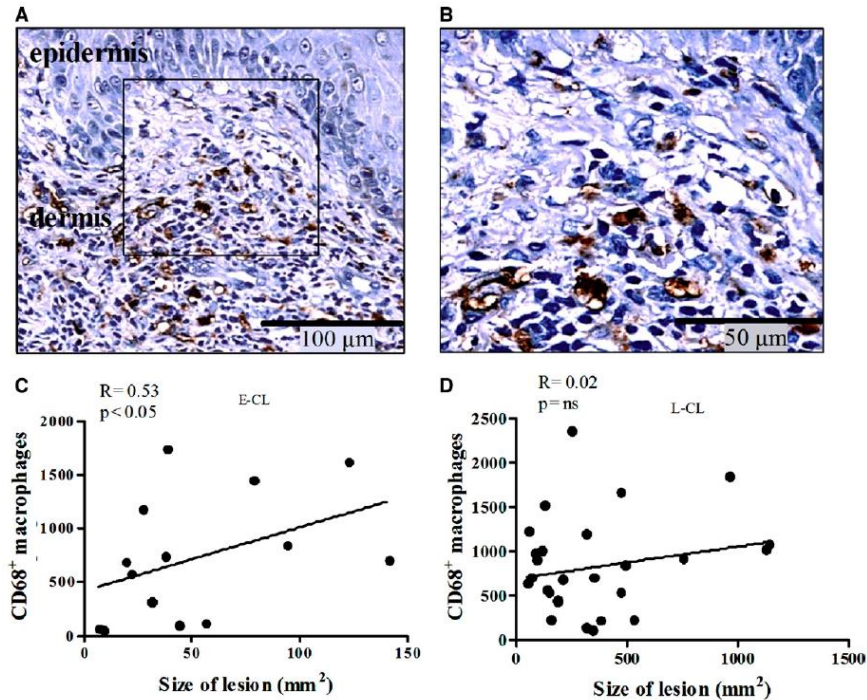


FIGURE 5. Correlation between CD68⁺ macrophages in histological section and correlated with size of lesion in E-CL and L-CL. (A) Macrophages immunostaining with monoclonal antibody anti-CD68 in E-CL (x10) (B) In detail CD68⁺ cells are grouped near epidermis and in close contact with other mononuclear cells (x20). Linear correlation between the number of CD68⁺ macrophages and size of the lesions in mm² (C) in the E-CL (N = 14) and (D) L-CL (N = 28). Statistical analysis was performed using the Spearman correlation test. E-CL = early cutaneous leishmaniasis; L-CL = late cutaneous leishmaniasis.

area of inflammation, area of necrosis, and size of the ulcer suggest that the parasite load does not play a direct role in lesion development. This finding is in agreement with a previous report of a disparity between parasite numbers and the intensity of the inflammatory and necrotic events in L-CL.¹⁸ As macrophages are the main cells responsible for *Leishmania* killing, one could expect an inverse correlation between the numbers of CD68⁺ cells and amastigotes. Interestingly, we found a direct correlation between the frequency of CD68⁺ cells and number of amastigotes and there was an association between macrophages number and the area of necrosis in both E-CL and L-CL and between majority and size of the ulcer and CL. It has been shown that macrophages from CL patients exhibit an enhanced inflammatory profile, but are less able to kill *Leishmania*.^{19–21} Therefore, it is likely that parasite survival and leishmania antigen derived from dead parasites stimulate the adaptive immune response, thereby enhancing the inflammatory reaction.

The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the pathogenesis of L-CL is well documented. Although the T-cell response is important to prevent parasite dissemination, an exaggerated inflammatory response is associated with pathology.^{22,23} We

have previously shown a direct correlation between the frequency of CD4⁺ T cells expressing IFN and TNF, and CD4⁺ T cells expressing lymphocyte activation markers with the lesion size.^{22,24} CD8⁺ T cells also play a role in the pathology.^{4,25} Although there was no association between CD8⁺ T cells expressing granzyme and the area of inflammation in E-CL, there was a correlation between the frequency of CD8⁺ T cells expressing granzyme and the intensity of the inflammatory reaction in L-CL.²⁶ Moreover, although CD8⁺ T cells kill *L. braziliensis*-infected cells, they have an impairment in parasite killing.^{4,5,23} The inflammatory reaction in both E-CL and L-CL is composed of CD68⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as B cells. As T cells and macrophages are responsible for the granuloma formation, the role of these cells in the pathogenesis of CL has been well studied. In contrast, little emphasis is given for the role of B cells in the pathogenesis of *L. braziliensis* infection. B cells are found in high frequency in tissue of CL patients.^{27,28} Here we showed that CD20⁺ B cells are also observed in E-CL and the correlation between the frequency of B cells and the inflammation area pointed out the need for future studies to determine the participation of antibodies in the control of the infection or in the pathology of CL.

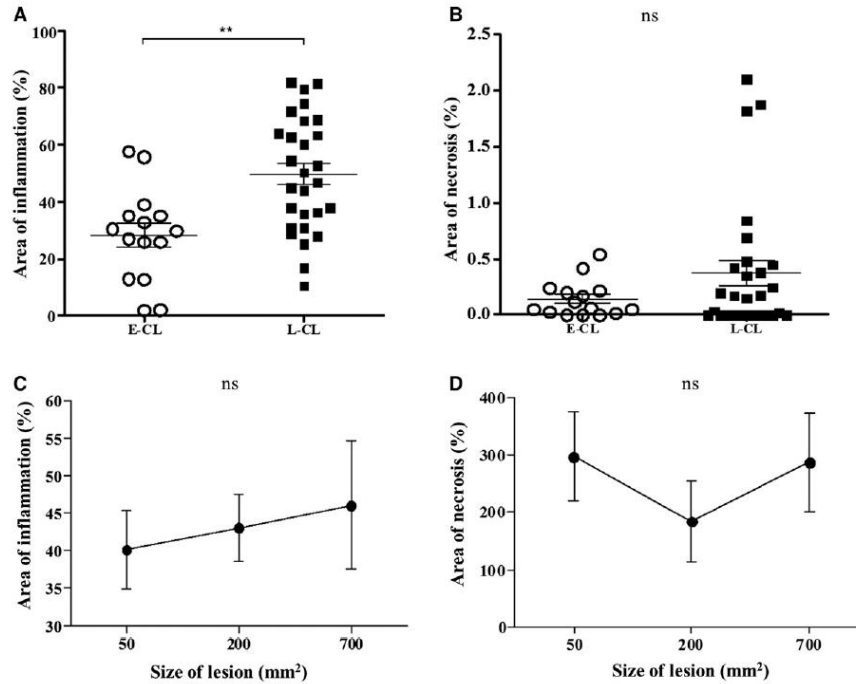


FIGURE 6. The area of inflammation and necrosis in E-CL and L-CL. (A) Evaluation of the area of inflammation to the total area of the histological section from E-CL and L-CL biopsies. ** $P < 0.001$. (B) Evaluation of area of necrosis to the total area of the histological section from E-CL and L-CL biopsies. $P =$ not significant (ns). Statistical analysis was performed using the Student's t test, post-Mann-Whitney test. The bars represent mean and standard error. (C) Area of inflammation according to the size of lesion and (D) area of necrosis according to the size of the lesion. $P =$ ns. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test. E-CL = early cutaneous leishmaniasis ($N = 15$); L-CL = Late cutaneous leishmaniasis ($N = 28$).

Although the area of inflammation was greater in L-CL than in E-CL biopsies, there was no difference between the area of necrosis in the two phases of the disease. The size of the lesion directly correlated with illness duration and similarly

the area of inflammation was greater in L-CL than in E-CL. However, there was no correlation between inflammation and size of the lesions and there was also no correlation between the inflammatory and areas of necrosis. Necrosis seen in our

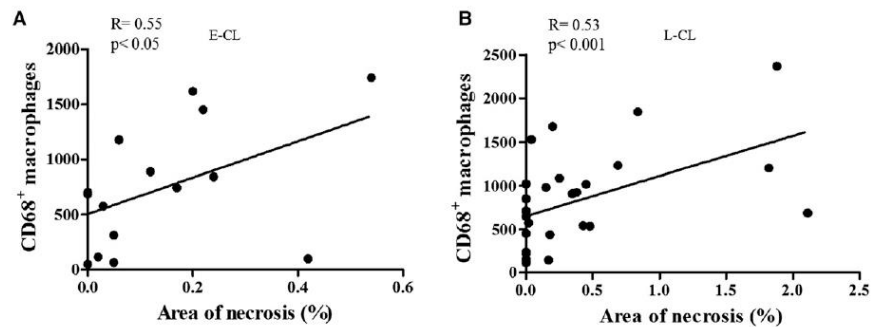


FIGURE 7. Number of macrophages CD68⁺ according to area of necrosis. Linear correlation between the number of CD68⁺ macrophages and area of necrosis in mm² (A) in the E-CL ($N = 15$) and (B) in the L-CL ($N = 28$). Statistical analysis was performed using the Spearman test. E-CL = early cutaneous leishmaniasis; L-CL = late cutaneous leishmaniasis.

study was small and focal in the majority of the biopsies. The pathogenic mechanisms leading to necrosis during CL are not well elucidated. Likely, this process is multifactorial, including vessel obliteration induced by vasculitis,^{1,29} killing of macrophages and epithelial cells expressing *Leishmania* antigen, and tissue injury by the inflammatory response.^{30–32} It is known that metalloproteinase (MMP) genes are highly expressed in the tissue of CL patients and that monocytes secrete high levels of MMP-9.^{33–35} MMP expression by macrophages may explain our findings of a direct correlation between macrophages and the area of necrosis in CL throughout the disease. Additional studies should be performed to identify if a programmed necrosis by activity of protein kinase RIPK3 is occurring.³⁶

We recognize that the limited sample size in our study may have prevented a better correlation between some variables and inflammation or the area of necrosis. Although longitudinal studies using biopsies of the same patients in the two phases of the disease could help to better understand the dynamics of the immunopathology, this is not possible as patients are treated upon diagnosis. Despite a few limitations, our immunopathologic study comparing biopsies from patients with E-CL versus L-CL contributes to the understanding of host and parasite factors in the pathogenesis of *L. braziliensis* and emphasizes the participation of macrophages in the development of CL ulcers.

We have previously shown that although macrophages from patients with CL have an impairment in *Leishmania* killing, they produce high levels of proinflammatory cytokines, such as TNF and the chemokines CXCL9 and CXCL10.¹⁹ These molecules contribute to necrosis and cell recruitment to the site of infection. Monocytes and macrophages are heterogeneous subpopulations, with killing, inflammatory, and regulatory profiles.³⁴ Previous studies have shown a high frequency of monocytes with inflammatory profile in E-CL,¹⁴ and there is a direct correlation between the frequency of monocytes expressing toll-like receptor⁹ with ulcer size in CL.³⁷ Moreover, no production rather than protection is associated with pathology in *L. braziliensis* infection.³⁸ It is clear that monocytes and macrophages have also protective function killing intracellular pathogens. However, while *Leishmania* killing is mediated by classical monocytes, secretion of proinflammatory cytokine is produced mainly by the inflammatory monocytes.^{3,14} Therefore, the increase in proinflammatory monocytes in CL and even in E-CL may explain the intense inflammatory reaction and parasite persistence. Because of the plasticity of monocyte population and limited numbers of cells obtained in the biopsies, studies on monocyte subsets in tissue are limited. However, our documentation that macrophages number correlates with the necrosis area and lesion size in E-CL indicates that in addition of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, macrophages play a role in ulcer development in CL due to *L. braziliensis*.

ATL is one of the best examples about the tenuous line that separate protection from pathology. Here, although we showed that parasite burden was not associated with inflammation and ulcer size, it was clear that pathology due to inflammation and necrosis occurred due to an attempt of the host to eliminate parasites. Different from many other infectious diseases in which early therapy is associated with a high rate of cure and acceleration of the healing time,

patients with E-CL have a high rate of failure to antimony therapy in comparison with L-CL. The documentation of high number of amastigotes early in the infection and a progressive inflammatory reaction with illness duration indicate that in addition to parasite killing, a down modulation of the inflammatory reaction should be attempted in the treatment of patients with E-CL.

Received January 30, 2016. Accepted for publication September 11, 2016.

Published online January 23, 2017.

Acknowledgments: We thank Luiz Antônio Rodrigues de Freitas for the suggestions to improve the manuscript and for providing the anti-CD4 monoclonal antibody and Cristiano Franco for his assistance in the preparation of the manuscript.

Financial support: This work was supported by National Institutes of Health (grant AI088650) and Conselho Nacional de Pesquisa Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia—Doenças Tropicais (grant 573839/2008-5).

Disclaimer: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Authors' addresses: Maira G. Saldanha, Adriano Queiroz, and Sérgio Aruda, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Candeal, Salvador, Brazil, E-mails: mairagsaldanha@gmail.com, adrianoqs@gmail.com, and sa@bahia.fiocruz.br. Paulo Roberto L. Machado, Lucas P. de Carvalho, and Edgar M. de Carvalho Filho, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, E-mails: plmachado@hotmail.com, carvalholp76@gmail.com, and edgar@ufba.br. Phillip Scott, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, E-mail: pscott@vet.upenn.edu.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

REFERENCES

- Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira A Jr, Bittencourt A, Carvalho EM, 2002. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis* 34: E69–E73.
- Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM, 2009. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 80: 574–579.
- Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, Carvalho EM, Scott P, 2014. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis* 209: 1288–1296.
- Santos Cd S, Boaventura V, Cardoso CR, Tavares N, Lordelo M.J., Noronha A, Costa J, Borges VM, Oliveira CI, Weyenberg JV, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI, 2013. CD8+Granzyme B+ mediated tissue injury versus CD4+IFN γ mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 133: 1533–1540.
- Cardoso TM, Machado A, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, Scott P, Carvalho EM, Bacellar O, 2015. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun* 83: 898–906.
- Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, Oliveira CI, Scott P, 2013. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 9: e1003504.
- Nylen S, Eidsmo L, 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 34: 551–561.
- Dantas ML, Oliveira JM, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Guimarães LH, Machado P, Carvalho E, Arruda S, 2014.

- Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 202–209.
9. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM, 2012. Up regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734–6740.
 10. Moriarty PL, Grimaldi G Jr, Galvão-Castro B, de Oliveira Neto MP, Marzochi MC, 1982. Intralesional plasma cell and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 47: 59–64.
 11. Bittencourt AL, Barral A, 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 51–56.
 12. Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 153: 537–543.
 13. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimarães LH, Lago EL, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM, 2012. IFN- γ production to *Leishmania* antigen supplements the *Leishmania* skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1947.
 14. Passos S, Carvalho LP, Costa RS, Campos TM, Novais F, Magalhães A, Machado PRL, Betting D, Moser D, Carvalho EM, Scott P, 2015. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response and *L. braziliensis* infections. *J Infect Dis* 211: 274–282.
 15. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME, 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* 49: 3892–3904.
 16. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJS, Haddad F, Perez MA, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, Marzochi MCA, Marzochi KBF, Costa SCG, 2001. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 987–996.
 17. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP, 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239–251.
 18. Shirian S, Oryan A, Hatam G-R, Panahi S, Daneshbod Y, 2014. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med* 138: 235–240.
 19. Campanelli AP, Brodskyn CI, Boaventura V, Silva C, Roselino AM, Costa J, Saldanha AC, de Freitas LA, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Silva JS, Barral A, 2010. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol* 71: 1220–1227.
 20. Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O, 2012. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect* 12: 75.
 21. Ramirez C, Diaz-Toro Y, Tellez J, Castilho TM, Rojas R, Ettinger NA, Tikhonova I, Alexander ND, Valderrama L, Hager J, Wilson ME, Lin A, Zhao H, Saravia NG, McMahon-Pratt D, 2012. Human macrophage response to *L. (Viannia) panamensis*: microarray evidence for an early inflammatory response. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1866.
 22. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ, 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101: 226–230.
 23. Dantas ML, de Oliveira JC, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P, Carvalho E, Arruda S, 2013. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 728–734.
 24. Keesen TSL, Antonelli LRV, Faria DR, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ, 2011. CD4+ T cells defined by their V β T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 165: 338–351.
 25. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Betting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, Oliveira CI, Scott P, 2013. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *Plos Pathogen* 9: e1003504.
 26. Faria DR, Souza PE, Duraes FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO, 2009. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 432–439.
 27. Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Netto M, Barral A, 2002. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 979–983.
 28. Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarencio J, Barral-Netto M, Barral A, 2007. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg* 77: 854–859.
 29. Fraga CA, Oliveira MV, Alves LR, Viana AG, Sousa AA, Carvalho SF, de Paula AMB, Botelho ACC, Guimarães ALS, 2012. Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol* 87: 709–713.
 30. Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA, 1994. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg* 50: 743.
 31. Martins ALGP, Barreto JA, Lauris JRP, Martins ACGP, 2014. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *An Bras Dermatol* 89: 52–58.
 32. Oliveira CI, Brodskyn CI, 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol* 3: 145.
 33. Maretta-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N, 2011. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 119: 160–164.
 34. Campos TM, Passos ST, Novais FO, Betting DP, Costa RS, Queiroz A, Mosser D, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP, 2014. Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3282.
 35. Ziegler-Heitbrock L, 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81: 584–592.
 36. Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, Komuves L, Ferrando RE, French DM, Webster J, Roose-Girma M, Warming S, Dixit VM, 2014. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* 343: 1357–1360.
 37. Vieira EL, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ, 2013. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol* 35: 65–72.
 38. Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O, 2016. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PLoS One* 11: e0148084.