



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ASPECTOS COMPARATIVOS DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM LESÕES DE LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA LOCALIZADA E DISSEMINADA**

**Marina Loyola Dantas**

**Salvador – Bahia – Brasil  
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**ASPECTOS COMPARATIVOS DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM LESÕES DE LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA LOCALIZADA E DISSEMINADA**

Marina Loyola Dantas

Orientador: Sérgio Marcos Arruda

Co-orientador: Lucas Carvalho

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil  
2012



“Aprender é a única coisa que a mente não se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende”  
(Leonardo da Vinci).

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Arruda pelos seus conhecimentos e oportunidade de aprendizado;

Ao Prof. Dr. Lucas Carvalho, por toda instrução, disponibilidade e oportunidade;

A Prof. Dra. Sara Passos, pela colaboração ao longo da realização deste trabalho, por toda ajuda, sugestões e conselhos;

A Iukary Takenami, por todo o auxílio neste trabalho, por todos os inúmeros momentos de disposição e ajuda, pelo estímulo, pelo exemplo e pela amizade;

A Juliana Gomes, pessoa fundamental em todas as etapas de realização deste trabalho, pela ajuda incondicional, incentivo constante e amizade sincera;

A Carolina Cavalcante, Luana Góis, Fernanda Khouri, Jéssica Petrilli e Thessika Hialla, pela amizade, companhia diária e apoio em todos os momentos;

A Cláudio Figueira, por todo ensinamento, ajuda, palavras de incentivo e amizade;

Aos colegas do LASP (Laboratório Avançado de Saúde Pública);

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz e ao setor de imunistoquímica;

Ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos;

Ao Prof. Dr. Edgar Marcelino Carvalho Filho, Prof. Dr. Paulo Machado, Dr. Luiz Henrique Guimarães e Adriano Queiroz Silva;

A Rúbia Costa, Taís menezes e Giovana Bergheme por me acolherem e pela constante disposição de ajuda;

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra pela constante vontade de ajudar, e aos pacientes pela colaboração e contribuição ao conhecimento científico;

A Deus, que me dá força para continuar a caminhada em busca dos meus objetivos;

Aos meus pais, Ana Cristina e Jorge Loyola, por estar sempre ao meu lado me incentivando, pela dedicação e exemplo de determinação;

A minha irmã Luciana pela companhia em todos os momentos, pela torcida e apoio e à toda minha família;

A Danilo pela torcida e apoio mesmo com a distância;

A Laissa, Flora e Luana, amigas-irmãs, pela amizade de sempre;

E aos demais, que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURAS</b> .....	<b>Pag.</b>
Figura 1 Foto de quantificação manual do número de células CD8+ utilizando o software ImageJ (NIH) .....	25
Figura 2 Foto de quantificação manual do número de plasmócitos utilizando o software ImageJ (NIH) .....	25
Figura 3 Exemplificação da medida da extensão da inflamação utilizando o software ImageJ. (A) Biópsia de pápula com 8% de inflação (10x). (B) Biópsia de úlcera da LD com 56% de inflamação (10x) .....	26
Figura 4 Fluxograma de biópsias e métodos .....	28
Figura 5 Fluxograma de seleção de amostras avaliadas .....	28
Figura 6 Lesões por diferentes formas clínicas da LC. (A) Lesão tardia (LCL-T); (B) Lesão recente (LCL-R); (C) Lesão ulcerada da LD (LD-U); (D) Pápula da LD, lesão não-ulcerada .....	30
Figura 7 Aspectos histopatológicos presentes na epiderme. (A) Crosta fibrinoleucocitária (seta) (20x); (B) hiperqueratose (seta) (40x); (C) acantose (seta) (20x); (D) degeneração hidrópica (40x); (E) (seta) (20x); (F) exocitose (seta) (40x) .....	35
Figura 8 Aspectos histopatológicos presentes na derme. (A) Edema (20x); (B) tecido de granulação (seta) (20x); (C) granuloma (seta) (20x); (D) células gigantes (20x) (seta); (E) células gigantes (seta) (40x); (F) necrose (40x) .....	36
Figura 9 Avaliação da inflamação, em porcentagem, em cada forma clínica estudada. A média $\pm$ o desvio padrão da porcentagem de inflamação também está representada. Foi utilizado o teste ANOVA. N=10 em todos os grupos .....	39
Figura 10 Correlação linear de Pearson entre o tempo das lesões (dias) e suas áreas (mm <sup>2</sup> ) nas biópsias das lesões de LC tardia (LCL-T). N=10 .....	40
Figura 11 Perfil celular do infiltrado inflamatório no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). As barras correspondem ao número de células/15 campos $\pm$ erro padrão. N=10 em ambos os grupos .....	40
Figura 12 (A) Número de células T CD4+ (em 15 campos) por forma clínica. A média $\pm$ o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. (B) Imunomarcagem de linfócitos CD4+ (40x). N=10 em todos os grupos .....	41
Figura 13 Correlação linear de Spearman entre linfócitos T CD4+ e inflamação tecidual nos grupos LCL-R (A) e LCL-T (B) .....	42
Figura 14 Número de linfócitos T CD8+ (em 15 campos) por forma clínica. A média $\pm$ o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). (B) Imunomarcagem de linfócitos T CD8+ (40x). N=10 em todos os grupos .....	43
Figura 15 Correlação linear de Pearson entre linfócitos T CD8+ e inflamação tecidual no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). N=10 em ambos os grupos ..	44
Figura 16 Número de granzima B+ (em 15 campos) por forma clínica. A média $\pm$ o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). (B) Imunomarcagem de células granzima B+ (40x). N=10 em todos os grupos .....	45

Figura 17	Correlação linear de Pearson entre linfócitos granzima B+ e inflamação tecidual no grupo LCL-R. N=10 .....	46
Figura 18	Número de macrófagos CD68+ (em 15 campos) por forma clínica. A média ± o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ). (B) Imunomarcção de macrófagos CD68+ (40x). N=10 em todos os grupos .....	47
Figura 19	Correlação linear de Spearman entre macrófagos CD68+ e inflamação tecidual no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). N=10 em ambos os grupos...	48
Figura 20	(A) Imunomarcção de células B CD20+ (40x). (B) Em HE, presença de plasmócitos no infiltrado inflamatório (40x) .....	48
Figura 21	(A) Número de linfócitos B CD20+ e (B) número de plasmócitos (em 15 campos, 40x) por forma clínica. A média ± o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA. N=10 em todos os grupos .....	49
Figura 22	(A) Número de neutrófilos (em 15 campos, 40x) em cada forma clínica estudada. (B) Em HE, presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório de biópsia. A média ± o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). N=10 em todos os grupos .....	50
Figura 23	Correlação linear de Pearson entre neutrófilos e inflamação tecidual no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). N=10 em ambos os grupos .....	51
Figura 24	Correlação linear de Pearson entre o tempo das lesões (dias) e suas áreas ( $\text{mm}^2$ ) no grupo LD-U. N=10 .....	52
Figura 25	Perfil celular do infiltrado inflamatório no grupo LD-U (úlceras) (A) e LD-P (pápulas) (B). As barras correspondem ao número de células/15 campos ± erro padrão. N=10 em ambos os grupos .....	53
Figura 26	Correlação linear de Spearman entre linfócitos T CD4+ inflamação tecidual no grupo LD-U (A) e LD-P (B). N=10 em ambos os grupos .....	53
Figura 27	Correlação linear de Pearson entre linfócitos T CD8+ e inflamação tecidual no grupo LD-U (A) e LD-P (B). N=10 em ambos os grupos .....	54
Figura 28	Correlação linear de Spearman entre macrófagos CD68+ e inflamação tecidual no grupo LD-U (A) e LD-P (B). N=10 em ambos os grupos .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELAS</b> .....	<b>Pag.</b>
Tabela 1 Relação de anticorpos utilizados .....	23
Tabela 2 Achados demográficos dos pacientes biopsiados com LCL e LD.....	31
Tabela 3 Características clínicas dos pacientes com lesões ulceradas .....	33
Tabela 4 Características clínicas das lesões secundárias nos pacientes com LD .....	34
Tabela 5 Frequência dos aspectos histopatológicos observados nas 40 biópsias de LTA, por HE .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana
- LC:** Leishmaniose Cutânea
- LCL:** Leishmaniose Cutânea Localizada
- LD:** Leishmaniose Disseminada
- LM:** Leishmaniose Mucosa
- CD:** Cluster of Differentiation
- Th:** T helper
- IFN- $\gamma$ :** Interferon-gama
- TNF:** Fator de Necrose Tumoral
- NK:** Natural Killer
- MHC:** Major Histocompatibility Complex
- IL:** Interleucina
- LCL-R:** Leishmaniose Cutânea Localizada Recente
- LCL-T:** Leishmaniose Cutânea Localizada Tardia
- LD-U:** Leishmaniose Disseminada – Úlcera
- LD-P:** Leishmaniose Disseminada – Pápula
- IDRM:** Intradermorreação de Montenegro
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- HE:** Hematoxilina e eosina
- PBS:** Tampão-fosfato salina
- DAB:** diaminobenzidina
- NIH:** National Institutes of Health
- TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- NO:** Óxido Nítrico

## RESUMO

### **Aspectos comparativos da resposta inflamatória em lesões de leishmaniose cutânea localizada e disseminada.**

A forma clínica mais frequente das leishmanioses é a leishmaniose cutânea, que acomete somente a pele e constitui um importante problema de saúde no Brasil. A leishmaniose cutânea caracteriza-se por lesão cutânea ulcerada única: leishmaniose cutânea localizada, que pode regredir espontaneamente ou se disseminar com múltiplas úlceras e pápulas e que aparecem em diferentes locais. A presença de disseminação caracteriza a leishmaniose cutânea disseminada. Investigar, no tecido, células que compõem o infiltrado inflamatório em lesões de pele na leishmaniose e caracterizar a resposta imune e sua correlação com a extensão total da inflamação *in situ* pode contribuir para aprofundar o entendimento da leishmaniose cutânea. Neste estudo, através da imunomarcagem e quantificação de células por imunistoquímica e HE, e análise da extensão da inflamação, foi comparado a histopatologia e presença de células inflamatórias CD4+, CD8+, CD68+, CD20+, plasmócitos e neutrófilos, e células granzima B+ em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea tardia (úlceras tardias e úlceras recentes) e leishmaniose disseminada (úlceras e pápulas). A análise dos padrões histomorfológicos mostrou semelhança entre os quatro grupos de biópsias analisados. Avaliando o número e tipo de células presentes, o predomínio foi de macrófagos e linfócitos. As úlceras da leishmaniose cutânea clássica e disseminada apresentaram média maior de inflamação, maior frequência de linfócitos T CD4+, T CD8+, macrófagos, linfócitos B CD20+ e plasmócitos que úlceras recentes e pápulas. Estas, por sua vez, ao contrário das úlceras tardias de ambas formas clínicas, tiveram correlação positiva entre o aumento do infiltrado inflamatório e T CD4+ e T CD8+, e não correlação com granzima B e neutrófilos. Os plasmócitos se mostraram elementos quase constantes no infiltrado das lesões em todos os grupos, e sua frequência foi maior que de linfócitos B. Seguindo o mesmo padrão descrito nos linfócitos B, os plasmócitos não apresentam correlação com o influxo de infiltrado inflamatório entre os grupos. A frequência de macrófagos é vista nos dois estágios avaliados da doença e nas duas formas clínicas de forma semelhante, porém com uma tendência para maior presença em lesões de LD. A análise de neutrófilos revelou semelhança da frequência dessas células em todos os tipos de lesões em ambas formas clínicas, com as pápulas tendendo para uma menor quantidade. Portanto, o desenvolvimento das lesões ocorrem com o influxo de células inflamatórias, como linfócitos T CD4+ e T CD8+ e a resposta imune celular é mais intensa em lesões crônicas da leishmaniose cutânea localizada e disseminada do que em lesões localizadas recentes e pápulas da leishmaniose disseminada. Diferenças *in situ* na resposta inflamatória destas duas formas clínicas e quatro espectros de lesão da leishmaniose humana podem elucidar o papel de células no local da lesão e contribuir para o entendimento da patogênese da leishmaniose.

Palavras Chaves: 1. Leishmaniose; 2. Disseminada; 3. Histopatologia; 4. Inflamação; 5. Células inflamatórias.

## ABSTRACT

### **Comparative aspects of the inflammatory response in cutaneous and disseminated leishmaniasis lesions.**

Cutaneous leishmaniasis is the most frequent clinical form of leishmaniasis, which affects only the skin and is an important health problem in Brazil. Cutaneous leishmaniasis is characterized by single ulcerated skin lesion: localized cutaneous leishmaniasis, which may regress spontaneously or spread with multiple ulcers and papules that appear in different parts of the body. The presence of dissemination features disseminated leishmaniasis. Investigate tissue cells from inflammatory infiltrate in skin lesions in leishmaniasis and characterize the immune response and its correlation with the total extent of inflammation in situ may contribute to deepen the understanding of cutaneous leishmaniasis. In this study, immunostaining and cells quantification by immunohistochemistry and HE and analysis of inflammation extension was compared with histopathology and CD4+, CD8+, CD68+, CD20+, plasma cells, neutrophils and granzyme B+ cells in biopsies of patients with localized cutaneous leishmaniasis (late ulcer and recent ulcer) and disseminated leishmaniasis (ulcers and papules). The histopathological patterns analysis was similar among the four biopsies groups analyzed. Macrophages and lymphocytes were the predominant cells. The ulcers of localized cutaneous leishmaniasis and disseminated leishmaniasis presented higher mean inflammation, increased frequency of CD4+ and CD8+ T cells, macrophages, B lymphocytes CD20+ and plasma cells than recent ulcers and papules. These, in turn, unlike late ulcers of both clinical forms, had positive correlation between the increase in inflammatory infiltrate and CD4+ and CD8+ T cells, differing in Granzyme B and neutrophils. Plasma cells were almost constant in lesion infiltrate in all groups and was higher than the frequency of B lymphocytes. Following the same pattern described in B lymphocytes, plasma cells did not show an association with the influx of inflammatory infiltrate between groups. The frequency of macrophages is seen in both stages of the disease and in the two clinical forms similarly, but with a tendency to be increased in disseminated leishmaniasis lesions. The analysis revealed similarity of neutrophils frequency in all types of lesions, with papules tending to a lesser extent. Therefore, the development of lesions occur with the influx of inflammatory cells such as CD4+ and CD8+ T cells and cellular immune response is more intense in chronic lesions of localized cutaneous leishmaniasis and disseminated leishmaniasis than recent localized lesions and papules from disseminated leishmaniasis. Differences of inflammatory response in situ in these two clinical forms and four spectra of human leishmaniasis lesions may elucidate the role of cells at the lesion site and contribute to the understanding of leishmaniasis pathogenesis.

Keywords: 1. Leishmaniasis; 2. Disseminated leishmaniasis; 3. Histopathological aspects; 4. Inflammation; 5. Inflammatory cells.



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 ASPECTOS GERAIS	11
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	12
1.2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA	13
1.2.2 LEISHMANIOSE DISSEMINADA	14
1.3 PATOLOGIA	15
1.4 RESPOSTA IMUNE	16
<b>2 OBJETIVOS</b>	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	20
<b>4 BIÓPSIAS E MÉTODOS</b>	21
4.1 ÁREA DE ESTUDO	21
4.2 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	21
4.3 BIÓPSIA: PROCEDIMENTO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS LÂMINAS	22
4.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	22
4.5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA	23
4.5.1 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CELULAR	23
4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXTENSÃO DA INFLAMAÇÃO	26
4.5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	26
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4.8 DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO	28
<b>5 RESULTADOS</b>	29
5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	29
5.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA	34
5.2.1 Aspectos Histopatológicos	34
5.2.2 Resposta Inflamatória	39
5.3 LEISHMANIOSE DISSEMINADA	51
5.3.1 Aspectos Histopatológicos	51
5.3.2 Resposta Inflamatória	52
<b>6 DISCUSSÃO</b>	56
<b>7 CONCLUSÕES</b>	65
<b>REFERÊNCIAS</b>	66
<b>ANEXOS</b>	75
PLANILHAS DE AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	76
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	78
ARTIGO SUBMETIDO	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* que, durante seu ciclo de vida, alterna entre duas formas principais e distintas: flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, e outra aflagelada denominada amastigota. A forma amastigota é a forma do parasito intracelular que sobrevive no interior das células do sistema fagocitário mononuclear.

O homem representa um dos hospedeiros e tem papel importante na perpetuação dos parasitos na natureza. Nesses casos a morfologia observada da *Leishmania* sp. é tipicamente a forma amastigota constituída por um corpo oval ou arredondado, com membrana delgada (GONTIJO, 2003).

Como hospedeiros invertebrados são identificados, exclusivamente, fêmeas de insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* conhecidos como flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae* da subfamília *Phlebotominae*) (SALOMÓN, 2009).

A transmissão homem-flebótomo-homem ocorre através da picada do inseto que injeta saliva contendo promastigotas de *Leishmania*, no momento da hematofagia; em uma picada o flebótomo injeta cerca de 10 a 100 parasitos, o suficiente para já induzir uma lesão (GREVELINK; LERNER, 1996). O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de poucas semanas a anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 88 países apresentam alguma forma da leishmaniose, com uma prevalência de até 12 milhões de pessoas. Estima-se que ocorram anualmente cerca de 2 milhões de novos casos, porém, apenas cerca de 600 mil são identificados (ASHFORD; DESJEUX; DERAADT, 1992). A OMS considera a leishmaniose tegumentar americana (LTA) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pela capacidade de produzir deformidades (como desfiguração facial extensa) e disseminação, além de potenciais consequências no desenvolvimento socioeconômico, debilitando e incapacitando pacientes que resultam

em redução da força de trabalho (DESJEUX, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; WHO, 2001).

No Brasil, casos de leishmaniose são notificados por todas as regiões. Entre 1985 e 2005 foram registrados 28.568 casos autóctones de leishmaniose, com a região nordeste contribuindo com o maior número de casos (38,8%), destacando-se os estados do Ceará, Maranhão e Bahia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Casos de LTA vêm sendo relatados na Bahia desde o início do século XIX. Atualmente, a LTA é endêmica praticamente em todo o estado, com transmissão ativa e surtos epidêmicos registrados em várias localidades, com destaque para os municípios de Laje, Três Braços, Corte de Pedra e Vale do Jiquiriça (COSTA et al., 1988; FOLLADOR et al., 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

## 1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A leishmaniose pode se manifestar na forma tegumentar, que abrange a forma cutânea e mucocutânea, ou visceral, que compromete vísceras, como fígado, baço, etc. Essa diferença na manifestação clínica da doença depende do sistema imune do hospedeiro e das características do parasito *Leishmania*, que apresenta mais de 20 espécies. Nas Américas, as espécies de *Leishmania* pertencem a dois subgêneros – *Viannia* e *Leishmania* - que subdividem em várias espécies, como a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses*, que são as mais frequentemente relacionadas à LTA no Brasil (YONEYAMA et al., 2007).

A forma clínica da leishmaniose mais frequentemente encontrada é a leishmaniose cutânea (LC), que acomete somente a pele. A LC constitui um importante problema de saúde no Brasil com mais de 30.000 casos detectados anualmente ao Ministério da Saúde (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989). Esta forma clínica caracteriza-se por lesão cutânea ulcerada única – Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) –, em geral em membros inferiores, e que pode regredir espontaneamente ou disseminar com múltiplas úlceras e pápulas que aparecem em diferentes locais, distantes do sítio de lesão primária. A presença de disseminação caracteriza a Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD) (COSTA et al., 1986; TURETZ et al., 2002). Outras formas cutâneas, que não apresentam úlceras, como formas difusas,

verrucosas, esporotricóide e lupóide são também vistas nas áreas endêmicas. Assim, a LTA tem manifestações clínicas variáveis (CARVALHO et al., 1994; MACHADO et al., 2002).

Já a Leishmaniose Mucocutânea (LM) é uma forma com maior destruição tecidual que compromete, além da pele, mucosas nasal e faríngea, palato ou lábio superior. Cerca de 5% dos pacientes infectados com *Leishmania* apresentam comprometimento de mucosas (MARSDEN, 1986).

### *1.2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA*

Após a inoculação da promastigota de *Leishmania* ocorre uma série de eventos celulares surgindo, inicialmente, um pequeno nódulo ou pápula bem delimitada, algumas vezes arredondada, outras vezes acuminada, recoberta por pele eritematosa e que pode ser ou não pruriginosa. Geralmente é uma lesão indolor e pode progredir ou não para úlcera em sua evolução (WEIGLE; SARAVIA, 1996).

A úlcera cutânea típica da LCL é em geral única, poucas vezes múltiplas, com duas ou mais lesões. A lesão tem forma habitualmente arredondada ou ovóide, tamanho variável de alguns milímetros até alguns centímetros, com bordas elevadas, eritematosas, fundo granuloso e avermelhado e, geralmente, autolimitada. A presença de pus e bordas amareladas é indicativo de presença de bactérias (GUIMARÃES et al., 2005; WEIGLE; SARAVIA, 1996).

Embora essas úlceras possam curar espontaneamente sendo substituída por tecido de cicatrização, quase sempre se faz necessário o uso de no mínimo um ciclo do tratamento com antimonial pentavalente (MACHADO et al., 2002). Diagnóstico precoce, mesmo em áreas endêmicas, é difícil já que os pacientes apenas procuram o posto de saúde já apresentando lesões com mais de 30 dias de evolução. Assim, avaliar as manifestações iniciais da doença para tentar entender o estabelecimento, evolução e patogênese da LC se torna um trabalho difícil.

### 1.2.2 LEISHMANIOSE DISSEMINADA

LD é uma forma rara da leishmaniose descrita inicialmente na Bahia por Torres (TORRES, 1920). Na década de 80, esta era responsável por 0,2% de todos os casos de LC identificados na área endêmica. Já nos anos 90, houve um aumento para 1,9%, indicando que LD estava se tornando mais prevalente e era uma forma emergente da leishmaniose. Desde então vêm sendo realizadas diversas pesquisas para entender tanto as descrições clínicas e aspectos histopatológicos, como as características da resposta imunológica e parasitológica (CARVALHO et al., 1994; JONES et al., 1987; TURETZ et al., 2002).

Relatos iniciais sobre a LD ocorreram em diversos países e foi demonstrado que diferentes espécies de *Leishmania* estavam associadas com esta forma clínica (COSTA et al., 1986). No Brasil, a LD está presente exclusivamente no norte e nordeste, sendo a *Leishmania braziliensis* a espécie mais associada como patógeno (GUIMARÃES et al., 2005).

As lesões cutâneas de LD são múltiplas e distantes do local da picada do flebótomo, distribuindo-se por duas ou mais áreas do corpo. Além de úlcera primária, LD caracteriza-se por lesões papulosas, acneiformes e menos comumente ulceradas, com diversos tamanhos e localização como face, tronco e membros, podendo variar de 75 a 800 lesões; porém há casos de LD com menor número de lesões (CARVALHO et al., 1994; TURETZ et al., 2002).

Esta forma clínica de leishmaniose acontece após o aparecimento de uma lesão inicial única ulcerada em uma extremidade corpórea, seguida, após um período que pode levar poucos dias ou meses, por lesões disseminadas que ocorrem de forma súbita e podendo se associar com manifestações clínicas de febre e astenia (CARVALHO et al., 1994; GUIMARÃES et al., 2005). Apesar de apresentar inicialmente com uma única úlcera, a LD é distinta da LC e, apesar de ainda não bem esclarecidas, sugere-se que a disseminação ocorra de forma hematogênica (CARVALHO et al., 1994; COSTA et al., 1986); podendo também apresentar ou não comprometimento mucoso.

### 1.3 PATOLOGIA

Variações na histopatologia nas leishmanioses também dependem da cepa da *Leishmania*, do tamanho do inóculo inicial e local acometido (derme ou subcutâneo) e também da resposta imunológica do hospedeiro (WEIGLE; SARAVIA, 1996). Vários relatos histológicos sobre a patologia da leishmaniose com objetivo de estabelecer um padrão morfológico das lesões relacionados com achados clínicos, duração da doença e resposta terapêutica já foram realizados (AZULAY, 1960; MAGALHÃES et al., 1986a; RIDLEY et al., 1980; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

Analisando os aspectos microscópicos das bordas das úlceras de leishmaniose, encontram-se alterações histopatológicas características, porém não exclusivas ou patognomônicas destes tipos de lesões. Magalhães e colaboradores (1982) descreveram as alterações histopatológicas de lesões agudas e crônicas e em ambas observaram a presença de características como crosta, acantose, hiperqueratose, parakeratose, espongirose e exocitose na epiderme, e na derme observaram edema, ninhos de células epitelióides, células gigantes, fibrose e necrose. Quando a resposta imunológica do hospedeiro ocorre de forma efetiva, há formação de granulomas, intensa presença de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e com poucos parasitos (SILVA, 1999).

O infiltrado inflamatório presente nas lesões de pele da leishmaniose segue um padrão difuso presente na derme superficial, e uma distribuição multifocal na derme profunda. A inflamação também pode apresentar um padrão perivascular e perianaxial (SILVA, 1999).

Nas lesões de LC ocorre um mecanismo do tipo hipersensibilidade mediada por células caracterizada por uma reação tecidual granulomatosa que pode apresentar dois padrões: desorganizada e muitas vezes associada à necrose tissular, e outra mais rara que normalmente aparece em casos de longa duração, com granulomas bem organizados, circunscritos – tipo tuberculóide (BITTENCOURT & ANDRADE, 1967; MAGALHÃES et al., 1986; RIDLEY; RIDLEY, 1983; RIDLEY, 1979). Os granulomas descritos na leishmaniose cutânea são compostos por macrófagos epitelióides, células gigantes multinucleadas e linfócitos (SILVA, 1999).

Lesões em estágios iniciais, entre suas diversas formas como nódulo ou úlcera superficial, também foram descritas por Machado e colaboradores (2002), ao exame

histopatológico. Estas lesões apresentavam vasculite, infiltrado de macrófagos, necrose lítica, amastigotas, ausência de granulomas e hiperplasia da epiderme.

Distúrbios vasculares também podem estar envolvidos na patogênese da doença. Silva (1999), ao avaliar lesões de LTA, observou células endoteliais altas, com células inflamatórias aderidas ou em transmigração, e por outras vezes presença de necrose fibrinóide da parede dos vasos, trombose, depósitos hialinos perivasculares e eventuais granulomas perivasculares, fenômenos que podem participar do mecanismo de ulceração.

Nas lesões localizadas de LC as amastigotas são raras e pode ser difícil sua identificação nas colorações por hematoxilina e eosinas de rotina. A escassez das formas amastigotas sugere uma menor participação do parasito na formação das lesões típicas da doença (BITTENCOURT & ANDRADE, 1967).

Embora a forma disseminada já tenha sido clinicamente caracterizada desde 1986 por Costa e colaboradores, apenas em 1994 descrições da morfopatologia e resposta imune da doença foram mais detalhadamente investigadas (CARVALHO et al., 1994). Estes autores descreveram a histologia de pápulas da LD, que apresentavam infiltrado mononuclear com predomínio de plasmócitos, reação granulomatosa e perifoliculite.

O estudo das alterações morfológicas da leishmaniose cutânea podem contribuir para um melhor conhecimento sobre sua patogênese e assim auxiliar no diagnóstico e tratamento a ser adotado em cada forma clínica.

#### *1.4 RESPOSTA IMUNE*

O principal mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro contra a *Leishmania*, já descrito inicialmente por estudos experimentais (BRYCESON et al., 1970; SCOTT; FARRELL, 1998), depende da imunidade celular tardia, mediada por linfócitos CD4+, associados com citocinas, que contrapõem a virulência do patógeno, e assim impedem a multiplicação do parasito e a progressão das lesões cutâneas (CARVALHO et al., 1992).

Nos indivíduos infectados que apresentam lesões localizadas ou não desenvolvem a doença, a resposta imune expressa um padrão do tipo Th1, com forte

produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4+, ativação de macrófagos e produção de TNF detectados no sangue periférico, o que corresponde a um bom prognóstico da doença (CARVALHO et al., 1985).

IFN- $\gamma$  é a principal citocina ativadora da atividade leishmanicida de macrófagos induzindo a produção de metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio. IFN- $\gamma$  atua também na ativação de células NK e T CD8+ citolíticas, e aumenta a expressão de MHC classe I e II. Porém, IFN- $\gamma$  e TNF em níveis elevados estão relacionados também com destruição tecidual e formação de úlceras com maiores diâmetros (ANTONELLI et al., 2005; DA-CRUZ et al., 1996). Assim, embora a resposta imune celular seja importante para controle da infecção, uma reação inflamatória intensa pode contribuir com a ulceração, perdendo seu poder de cura e predominando a destruição e imunopatologia da doença.

No tecido acometido, nas lesões de LCL observa-se uma reação inflamatória local composta em sua maioria por plasmócitos, macrófagos e linfócitos (MAGALHÃES et al., 1986). Linfócitos T CD4+ e CD8+ são importantes para a resposta imune contra a infecção por *Leishmania*. Estudos experimentais avaliaram a atuação tanto de linfócitos T CD4+ quanto de T CD8+ e suas contribuições no processo de resolução e resistência à infecção (MILON; DEL GIUDICE; LOUIS, 1995; MÜLLER et al., 1994; SCOTT; FARRELL, 1998), mostrando a importância de avaliar ambas populações na leishmaniose. Em humanos, vários estudos avaliaram o padrão da frequência dessas células, em sangue periférico ou em tecido, na LTA (ANTONELLI et al., 2005; CAMPANELLI et al., 2006; CARVALHO et al., 1994; DA-CRUZ et al., 1994; DIAZ et al., 2002; MORGADO et al., 2008; SILVA, 1999; UYEMURA et al., 1993). Já foi visto que pacientes com doença ativa apresentam maiores níveis de linfócitos CD4+, enquanto pacientes curados apresentaram níveis semelhantes de células CD4+ e CD8+ no sangue periférico (COUTINHO et al., 1996). Porém, o papel das células T CD4+, assim como de T CD8+, na leishmaniose ainda não está completamente esclarecido.

Alguns estudos têm demonstrado a presença de atividade citotóxica dos linfócitos em lesões de LTA, porém ainda não foi bem esclarecido seu papel na infecção, podendo estar relacionado com o controle da infecção, mas também podem contribuir para a lesão tecidual (FARIA et al., 2009; MACHADO et al., 2002).

A presença de uma resposta com predomínio Th2, com maior produção de IL-4, ocorre naqueles indivíduos que evoluem com formas mais severas de LTA, como a



forma mucosa e difusa (PIRMEZ et al., 1993). A grande destruição tecidual presente nestas formas da leishmaniose, está geralmente relacionada a uma resposta imune celular exacerbada com grande produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 (KHARAZMI et al., 1999; UYEMURA et al., 1993).

Citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) são comuns em processos alérgicos e na proteção contra agentes extracelulares como as parasitoses, mas também possuem funções inibidoras da resposta imune Th1 e envolvimento na ativação de linfócitos B para a produção de anticorpos, promovendo uma ajuda eficiente para a resposta humoral (MCSORLEY et al., 1996; SCOTT, 1990). Para alguns autores, a resposta humoral na leishmaniose parece não ser essencial para desenvolvimento de uma imunidade protetora (MCSORLEY et al., 1996). Porém, estudos realizados em camundongo mostraram que depleção de células B causaram exacerbação da doença, indicando que linfócitos B são necessários para geração de células T que intermediam a cura das lesões. Estes achados sugerem um papel da resposta humoral no desenvolvimento de imunidade protetora para essas células (SCOTT; NATOVITZ; SHER, 1986).

Comparando a resposta imune envolvida na LCL e LD, há indícios de que na LCL ocorre uma resposta mais eficiente, com maior produção de IFN- $\gamma$  e TNF, estando essas características mais relacionadas com o hospedeiro do que com a cepa do parasito (GUIMARÃES et al., 2005; TURETZ et al., 2002).

A produção de IFN- $\gamma$  na LCL pode resultar na contenção do crescimento parasitário no local da picada e assim prevenir sua disseminação (VIEIRA et al., 2002). Já a resposta imune celular na forma disseminada parece se assemelhar com a resposta observada na leishmaniose difusa, onde há menor produção de IFN- $\gamma$  e disseminação do parasito (GUIMARÃES et al., 2005). Há relatos na literatura que pacientes com LD têm altos níveis de anticorpos séricos, baixa de CD4<sup>+</sup> e diminuição de resposta imune (CARVALHO et al., 1994).

Porém, a distinção entre a resposta imune na forma localizada e disseminada que contribui ou não para a proteção/resistência contra o parasita da leishmaniose ainda não está completamente esclarecida.

## **2 OBJETIVOS**

### *2.1 OBJETIVO GERAL*

Comparar a histopatologia e presença de células inflamatórias CD4+, CD8+, CD68+, CD20+, plasmócitos e neutrófilos, e células granzima B+ em biópsias de úlceras tardias e úlceras recentes de pacientes com leishmaniose cutânea e em biópsias de úlceras e pápulas de pacientes com leishmaniose disseminada.

### *2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

- Avaliar as características histopatológicas em lesões recentes e tardias da LCL.
- Avaliar as características histopatológicas de lesões ulceradas e papulosas na LD.
- Quantificar a extensão da inflamação entre as biópsias das lesões em ambas formas clínicas citadas.
- Quantificar células inflamatórias imunes (CD4+, CD8+, CD68+, CD20+, plasmócitos e neutrófilos) nas formas clínicas da LCL e LD citadas acima.
- Correlacionar o número de células nas biópsias das lesões nas diferentes formas clínicas com a extensão da inflamação medida.
- Comparar a presença das células inflamatórias imunes CD4+, CD8+, CD68+, CD20+, plasmócitos e neutrófilos, entre as formas clínicas descritas da leishmaniose.

### 3. JUSTIFICATIVA

O estudo da resposta inflamatória *in situ* da leishmaniose é de grande importância para aprofundar o conhecimento sobre a imunopatogênese das leishmanioses. Entender e descrever as características morfológicas e composição celular tecidual de cada forma clínica e em diferentes estágios da doença, pode auxiliar no diagnóstico e escolha da conduta terapêutica a ser adotada em cada caso e contribuir para o entendimento da patogênese da leishmaniose.

A detecção de células e moléculas pela técnica de imunoistoquímica permite investigar, no tecido, células que compõem o infiltrado inflamatório em lesões de pele na leishmaniose. Neste contexto, caracterizar a resposta inflamatória e sua correlação com a extensão total da inflamação *in situ* pode contribuir para aprofundar o entendimento da leishmaniose cutânea.

Devido as diferentes manifestações clínicas de leishmaniose que acomete a pele, incluindo lesões que ulceram ou regridem sem processo ulcerativo (pápulas), há a hipótese de que o infiltrado inflamatório nos quatro tipos de lesões diferencie, podendo estar relacionado com características da resposta inflamatória do hospedeiro.

Assim, com o presente trabalho objetivamos realizar um estudo comparativo entre biópsias de pacientes com a forma localizada recente e tardia, comparando também com biópsias de pacientes com a forma disseminada que apresentam úlcera e pápula concomitantemente.

## 4 BIÓPSIAS E MÉTODOS

### 4.1 *ÁREA DE ESTUDO*

Biópsias de pacientes atendidos pelo Programa de Leishmaniose do Serviço de Imunologia no Hospital Universitário Professor Edgar Santos foram coletadas em Corte de Pedra, distrito pertencente ao município de Tancredo Neves. Corte de Pedra está localizada na região sudeste do Estado da Bahia, Brasil, a 280 km da capital Salvador, às margens da BR 101. Por ser uma área endêmica, estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das leishmanioses cutânea e mucosa vêm sendo realizados desde 1975. O Posto de Saúde em Corte de Pedra é centro de referência para diagnóstico e tratamento das leishmanioses que abrange uma área de aproximadamente 7000 km<sup>2</sup> e atende uma população de mais de 500.000 pessoas (TURETZ et al., 2002).

### 4.2 *CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA*

Neste estudo foram avaliados 30 pacientes distribuídos em 4 grupos: 10 pacientes com lesões cutâneas diagnosticados com LCL recente (LCL-R; até 20 dias depois do aparecimento da primeira lesão), 10 pacientes com LCL tardia (LCL-T; lesões com mais de 30 dias), e 10 pacientes com LD, que apresentavam úlcera (LD-U) e pápula (LD-P) concomitantemente, resultando em duas biópsias por paciente. As lesões consideradas recentes, além do tempo reportado pelo paciente, se apresentavam com menor diâmetro, com menos presença de infecção por bactérias e bordas menos elevadas. Já as lesões consideradas tardias se apresentavam bem evoluídas, com maior tamanho e fundo granuloso.

As biópsias foram realizadas com objetivo diagnóstico e selecionadas por conveniência seguindo os critérios especificados acima. As variáveis analisadas foram obtidas através de prontuários. Biópsias de pacientes diagnosticados com LCL que reportaram tempo de lesão entre 21 e 29 dias não foram selecionadas, deixando um intervalo de confiança.

O diagnóstico de leishmaniose foi concluído pelos critérios clínicos, positividade para Intradermoreação de Montenegro (IDRM), cultivo do parasita, PCR para *Leishmania braziliensis* e análise histopatológica. Coloração Grocott para diagnóstico diferencial para fungos e imunoistoquímica com anticorpo policlonal anti-*Leishmania* foi realizada quando necessária para confirmação.

#### 4.3 BIÓPSIA: PROCEDIMENTO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS LÂMINAS

Os fragmentos de pele das bordas das úlceras ou de pápulas dos grupos referidos acima foram obtidos com “punch” de 4 mm, sob anestesia local. Os fragmentos obtidos foram fixados em formol a 10% por 48 horas e processados no Serviço de Histotecnologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Após inclusão em parafina, foram feitas secções de 5µm de espessura para coloração por hematoxilina e eosina (HE) e para reação de imunoistoquímica. As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio NIKON E400.

#### 4.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Secções de 5 µm de espessura foram aderidas sobre lâminas previamente tratadas com silano com o objetivo de evitar descolamento dos cortes durante a reação. Na primeira etapa os cortes de tecido sofreram desparafinização em 3 banhos de xilol por 3 minutos cada e re-hidratação com banhos em concentrações decrescentes de álcool: absoluto, 70% e 50%, por 5 minutos cada. Após lavagem em água destilada, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 vol. por 5 minutos.

O kit utilizado foi o KP500 (Peroxidase Mouse & Rabbit Kit), da DBS, com sistema completo de amplificação. O protocolo utilizado segue as recomendações do fabricante e as lavagens são realizadas utilizando PBS 1x com adição de Tween 20.

Lâminas foram incubadas com anticorpos em câmara úmida por 30 minutos, 1 hora ou durante a noite, a depender do anticorpo, e diluídos em solução diluente (DAKO) conforme descrito na Tabela 1.

Na etapa de revelação da reação foi utilizada diaminobenzidina (DAB) (Spring) e interrompida por lavagens com água destilada e água corrente.

Cortes foram contracorados em hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, clarificados em xilol e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá.

Cortes controles, sem adição de anticorpo primário, foram utilizados como controle negativo em todas as reações.

**Tabela 1.** Relação de anticorpos utilizados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
CD4	Linfócitos T CD4	1:50	Spring
CD8	Linfócitos T CD8	1:100	Spring
CD20	Linfócitos B	1:50	DBS
CD68	Macrófagos	1:500	Dako
Granzima B	Granzima	1:150	Spring

#### *4.5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA*

##### *4.5.1 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CELULAR*

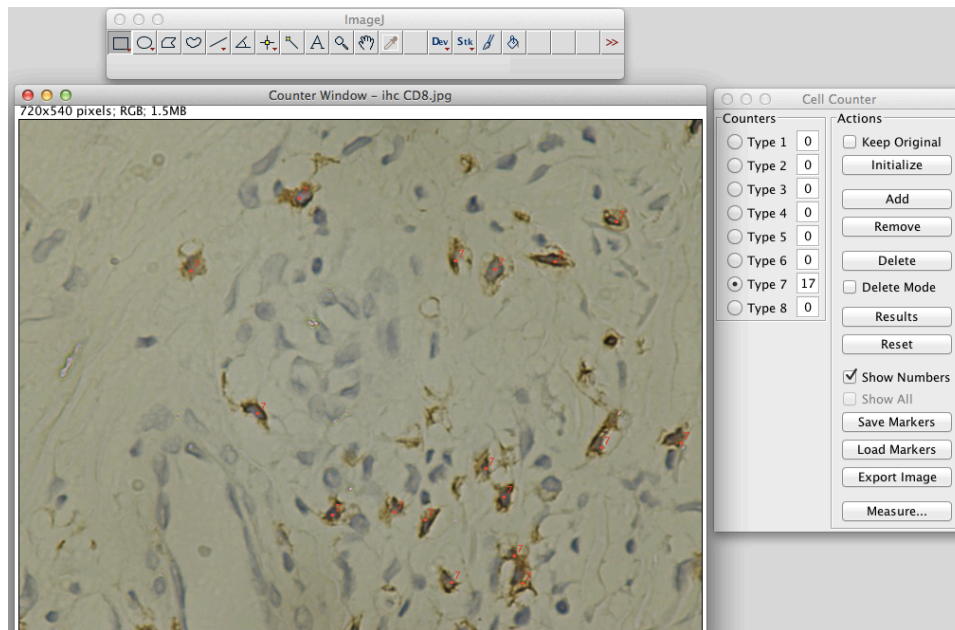
Para avaliação das populações celulares presentes no tecido, as secções histológicas foram analisadas em microscópio óptico com câmera (NIKON DXM1200F) acoplada ao computador. Utilizando o software NIKON ACT-1 v.2.70, foram fotografadas 15 imagens aleatórias referentes a 15 campos diferentes do fragmento, em um aumento de 400x, integrando a objetiva de 40x.

A presença das diferentes células foi avaliada de forma quantitativa. A quantificação do número de células CD4+, CD8+, CD20+, CD68+ e granzima B+ por fragmento se deu através das fotos obtidas e foi realizada manualmente, utilizando o

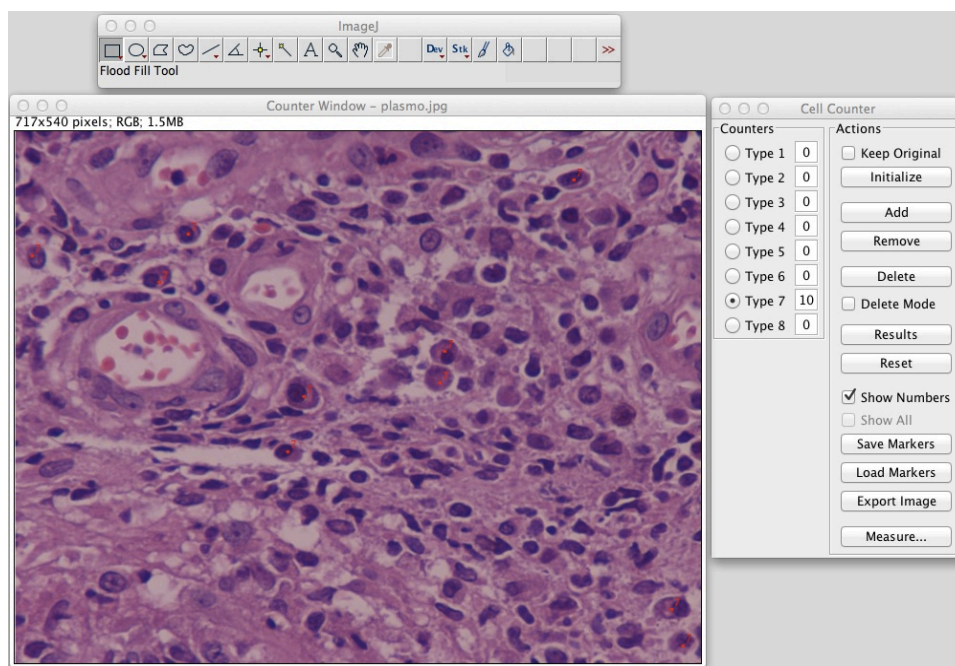
software ImageJ (NIH), o qual permite selecionar as células que apresentem cor acastanhada, indicando sua positividade para o marcador (Figura 1).

Neutrófilos e plasmócitos presentes nos fragmentos, por serem células de fácil visualização e distinção, foram quantificado diretamente da análise dos fragmentos corados por HE seguindo a mesma metodologia utilizada para células marcadas por imunohistoquímica (Figura 2).

O número obtido das contagens é em valor absoluto (número de células/15 campos).



**Figura 1.** Foto de quantificação manual do número de células CD8+ utilizando o software ImageJ (NIH).

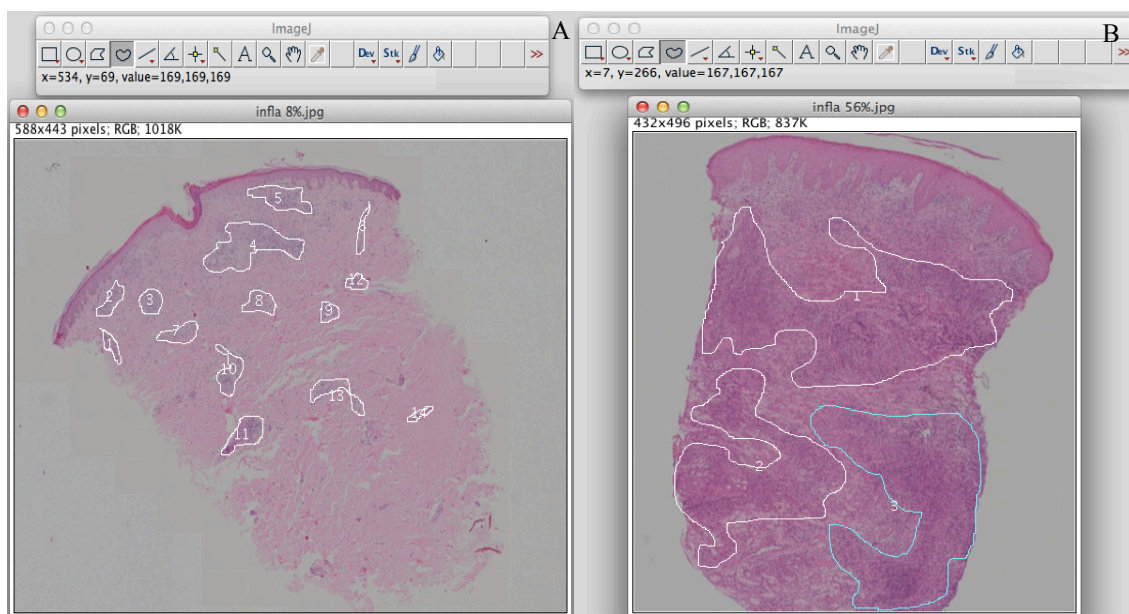


**Figura 2.** Foto de quantificação manual do número de plasmócitos utilizando o software ImageJ (NIH).



#### 4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXTENSÃO DA INFLAMAÇÃO

Para avaliar a extensão da inflamação, o software NIKON ACT-1 também foi utilizado para captura de imagens para a análise morfométrica dos fragmentos de tecido corados por HE. Esta avaliação foi realizada considerando a medida da área total do fragmento e da extensão da inflamação ( $\mu\text{m}^2$ ), utilizando o software ImageJ. Assim, foi possível determinar a proporção em porcentagem (%) da inflamação/área total do fragmento (Figura 3A e 3B). Foi considerada área de inflamação os focos de infiltrado inflamatório, excluindo as áreas nas quais as células inflamatórias se apresentavam de forma difusa.



**Figura 3.** Exemplificação da medida da extensão da inflamação utilizando o software ImageJ. (A) Biópsia de pápula com 8% de inflação (10x). (B) Biópsia de úlcera da LD com 56% de inflamação (10x).

#### 4.5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica foi realizada em todos os fragmentos corados por HE e por dois observadores concomitantemente, em microscópio multi-observacional.

As características morfológicas de cada biópsia eram avaliadas quanto sua presença (+) ou ausência (0) e relatadas em uma planilha (em anexo). Foram observadas alterações na epiderme, como crosta fibrinoleucocitária (correspondente à “casca” da ferida, com presença de hemácias), hiperkeratose (queratinização anormal), acantose (espessamento da epiderme), degeneração hidrópica (acúmulo de água no espaço intracelular), espongióse (ruptura da camada basal) e exocitose (presença de células inflamatórias), e na derme: edema (acúmulo de líquido no espaço intersticial), tecido de granulação (formação de um novo tecido, com formação de novos vasos), granulomas, células gigantes (fusionamento de células epitelióides) e necrose lítica.

#### *4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do CPqGM/FIOCRUZ, conforme o parecer número 321/2009. Seguindo as normas básicas do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (CEP), todos os indivíduos envolvidos foram informados sobre o trabalho em execução e sua importância para o diagnóstico e para o entendimento da doença. Não foi oferecida nenhuma compensação financeira. Os voluntários receberam uma explicação verbal detalhada sobre o estudo, e ao aceitarem participar do estudo, assinaram e receberam uma cópia do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – modelo em anexo). Os critérios de exclusão foram: suspeita de outro tipo de leishmaniose que não cutânea, lesões em face, crianças menores de 4 anos e pacientes que não concordaram em assinar o TCLE.

#### *4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA*

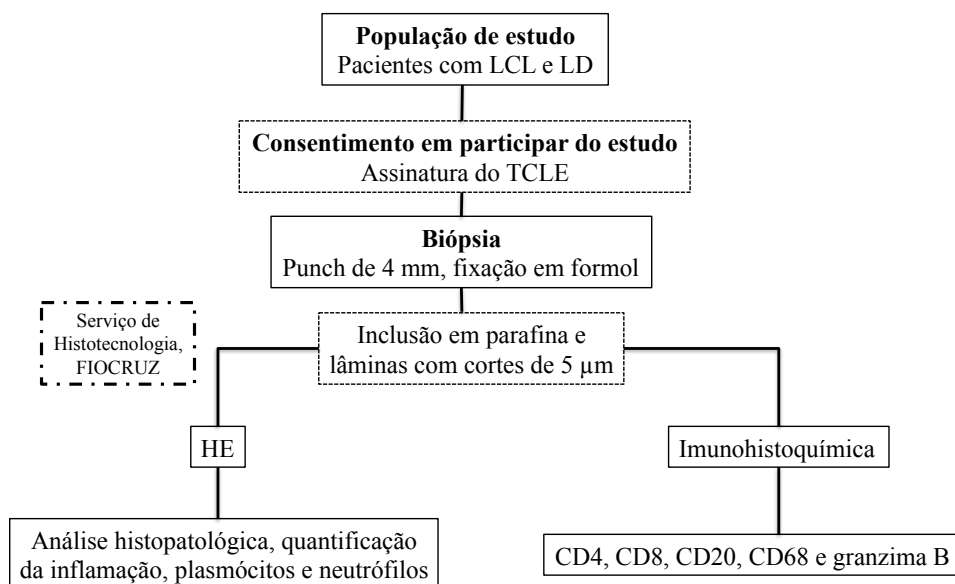
Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Foram calculadas frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas apresentados em tabelas. Para variáveis que seguem distribuição normal utilizou-se o teste paramétrico One-way ANOVA e foram descritas pela média e desvio-

padrão, para comparação entre os grupos. As variáveis com distribuição não-normal foram expressas pela mediana, utilizando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis.

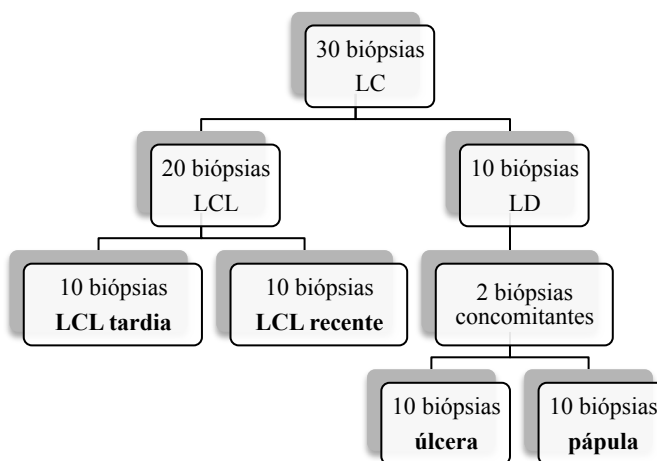
Para análises das correlações foram utilizados testes de Pearson e Spearman para variáveis com distribuição normal e não-normal, respectivamente. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $p \leq 0.05$ .

Para comparação das frequências entre variáveis em amostras independentes foi realizado o teste Qui-quadrado.

#### 4.8 DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO



**Figura 4.** Fluxograma de biópsias e métodos.



**Figura 5.** Fluxograma de seleção de amostras avaliadas.

## 5 RESULTADOS

### *5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS*

Neste estudo foram avaliados 30 pacientes que compuseram diferentes grupos. Entre eles, 20 pacientes tinham LCL que foram sub-divididos de acordo com duração da lesão: LCL-T (tardia) (Figura 6A), para aqueles com lesões que tinham mais de 30 dias, e LCL-R (recente) (Figura 6B) quando, ao serem diagnosticados, tinham lesão com 20 dias ou menos. Os outros 10 pacientes apresentavam leishmaniose disseminada e todos tinham lesão primária ulcerada (LD-U) (Figura 6C) e lesões secundárias à disseminação (LD-P) (Figura 6D) no mesmo momento, formando portanto, um quarto grupo composto pelos mesmo pacientes. O perfil clínico dos pacientes é mostrado na Tabela 2.



**Figura 6.** Lesões por diferentes formas clínicas da LC. (A) Lesão tardia (LCL-T); (B) Lesão recente (LCL-R); (C) Lesão ulcerada da LD (LD-U); (D) Pápula da LD, lesão não-ulcerada.

**Tabela 1.** Achados clínicos e laboratoriais dos 30 pacientes de leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose disseminada.

Paciente	Sexo	Idade	Forma clínica	Tempo lesão (dias)*	Número lesões	IDRM (mm <sup>2</sup> )**	Presença de <i>Leishmania</i> (HE)	Localização da úlcera	Tamanho lesão (mm <sup>2</sup> )**	Tratamento no passado	PCR <i>L. braziliensis</i>
1	M	22	LCL-T	60	1	440	-	MMII	600	N	Positivo
2	M	19	LCL-T	30	1	225	-	MMII	56	N	Positivo
3	F	42	LCL-T	30	2	120	+	MMII	450	N	Positivo
4	M	18	LCL-T	45	2	Negativa	+	MMII	750	N	Positivo
5	M	19	LCL-T	30	1	140	-	MMII	80	N	Positivo
6	F	39	LCL-T	25	1	304	+	MMII	300	N	Positivo
7	M	9	LCL-T	30	1	176	+	MMII	100	N	Positivo
8	M	37	LCL-T	30	1	240	-	MMII	300	N	Positivo
9	F	16	LCL-T	30	1	56	+	MMII	400	N	Positivo
10	M	27	LCL-T	30	1	196	+	Tronco	ND	N	Positivo
11	M	27	LCL-R	20	1	81	-	MMII	54	N	Positivo
12	M	15	LCL-R	20	1	182	-	MMSS	16	N	Positivo
13	M	18	LCL-R	15	1	900	-	MMSS	9	N	Positivo
14	M	9	LCL-R	15	1	120	+	MMSS	40	N	Positivo
15	F	36	LCL-R	15	1	304	+	MMII	9	N	Positivo
16	F	26	LCL-R	15	1	Negativa	+	MMSS	30	N	Positivo
17	M	25	LCL-R	15	1	315	+	Tronco	200	N	Positivo
18	M	37	LCL-R	20	1	280	+	MMII	144	N	Positivo
19	F	16	LCL-R	20	2	399	+	MMII	32	N	Positivo
20	M	23	LCL-R	20	1	Negativa	-	MMII	48	N	Positivo

\* Tempo de lesão reportado pelo paciente.

\*\*Área de dois diâmetros de cada IDRM ou lesão ulcerada.

MMII: membros inferiores; MMSS: membros superiores.

ND: não determinado.

+: presente; -: ausente.

S: sim; N: não.

**Tabela 2.** Achados clínicos e laboratoriais dos 30 pacientes de leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose disseminada (continuação).

Paciente	Sexo	Idade	Forma clínica	Tempo lesão (dias)*	Número lesões	IDRM (mm <sup>2</sup> )**	Presença de <i>Leishmania</i> (HE)	Localização da úlcera	Tamanho lesão (mm <sup>2</sup> )**	Tratamento no passado	PCR <i>L. braziliensis</i>
21	F	50	LD (U/P)	60/15	1/2	90	+/-	MMII	56	N	Positivo
22	M	53	LD (U/P)	60/30	1/12	396	++	Face	300	N	Positivo
23	M	37	LD (U/P)	30/15	1/22	1	++	MMII	ND	N	Positivo
24	M	37	LD (U/P)	30/10	3/9	Negativa	-/+	MMSS	90	N	Positivo
25	F	59	LD (U/P)	30/30	2/11	25	-/-	MMSS	460	N	Positivo
26	M	60	LD (U/P)	30/60	6/14	270	+/-	MMII	100	N	Positivo
27	M	17	LD (U/P)	90/15	15/7	180	-/-	MMSS	150	N	Positivo
28	F	37	LD (U/P)	30/30	2/4	256	-/-	MMSS	110	N	Positivo
29	M	30	LD (U/P)	30/90	1/200	1	-/+	MMII	100	N	Positivo
30	M	76	LD (U/P)	38/8	1/9	100	+/-	MMII	300	N	Positivo

\* Tempo de lesão reportado pelo paciente.

\*\*Área de dois diâmetros de cada IDRM ou lesão ulcerada.

MMII: membros inferiores; MMSS: membros superiores.

ND: não determinado.

+: presente; -: ausente.

S: sim; N: não.

A distribuição entre os gêneros dos pacientes incluídos neste estudo mostrou semelhança entre os três grupos: 7 eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino. A média de idade  $\pm$  desvio padrão (SD) no grupo LCL-T foi de  $25 \pm 11$  anos (variação entre 9 a 42),  $23 \pm 9$  anos (variação entre 9 a 37) no grupo LCL-R e  $45 \pm 17$  anos no grupo LD (variação entre 17 a 76). Pacientes com LD apresentaram idade mais avançada em relação aos pacientes com LCL tardia e recente (Tabela 3).

O tempo da lesão variou de 25 a 60 dias em LCL-T ( $34 \pm 10$  dias), 15 a 20 dias em LCL-R ( $17 \pm 2$  dias), 20 a 90 dias em LD-U ( $43 \pm 20$  dias) e 8 a 90 dias em LD-P ( $30 \pm 25$  dias) (Tabela 3 e 4). A medida das úlceras foi de  $337 \pm 240$  mm<sup>2</sup> (56 a 750 mm<sup>2</sup>) em LCL-T,  $58 \pm 63$  mm<sup>2</sup> (9 a 200 mm<sup>2</sup>) em LCL-R e  $185 \pm 136$  mm<sup>2</sup> (56 a 460 mm<sup>2</sup>) em LD-U. A média do tamanho das lesões no grupo LCL-T foi significativamente maior do que no grupo LCL-R (Tabela 3). As pápulas da LD não foram medidas.

Nos pacientes com LD, o número de pápulas variou de 2 a 200 lesões ( $29 \pm 60$  lesões) e úlceras de 1 a 15 ( $3 \pm 4$  lesões) (Tabela 4). Pacientes com LCL apresentaram, em geral, apenas uma lesão (Tabela 3).

A localização mais frequente das lesões foi em membros inferiores em 19 casos (63%), seguida de membros superiores em 8 (27%), 2 casos no tronco (7%) e face em 1 caso (3%) (Tabela 2).

**Tabela 3.** Características clínicas dos pacientes com lesões ulceradas.

Características	LCL-T (n=10)	LCL-R (n=10)	LD-U (n=10)	Valor de p
<b>Masculino : feminino</b>	07 : 03	07 : 03	07 : 03	0.0001
<b>Idade (anos), média <math>\pm</math> SD</b>	$25 \pm 11$	$23 \pm 9$	$45 \pm 17$	0.0008
<b>Tempo lesão (dias), média <math>\pm</math> SD</b>	$34 \pm 10$	$17 \pm 2$	$43 \pm 20$	0.02
<b>Número lesões, média <math>\pm</math> SD</b>	1	1	$3 \pm 4$	ns
<b>Tamanho lesão, média mm<sup>2</sup> <math>\pm</math> SD</b>	$337 \pm 240$	$58 \pm 63$	$185 \pm 136$	0.0035
<b>IDRM (mm<sup>2</sup>)</b>	$190 \pm 125$	$322 \pm 256$	$164.6 \pm 136$	ns

LCL-T: leishmaniose cutânea localizada tardia; LCL-R: leishmaniose cutânea localizada recente; LD-U: leishmaniose disseminada - úlcera; ns: não significante.



**Tabela 4.** Características clínicas das lesões secundárias nos pacientes com LD.

<b>Características</b>	<b>LD-P (n=10)</b>
<b>Tempo lesão (dias), média ± SD</b>	30 ± 25
<b>Número lesões, média ± SD</b>	29 ± 60

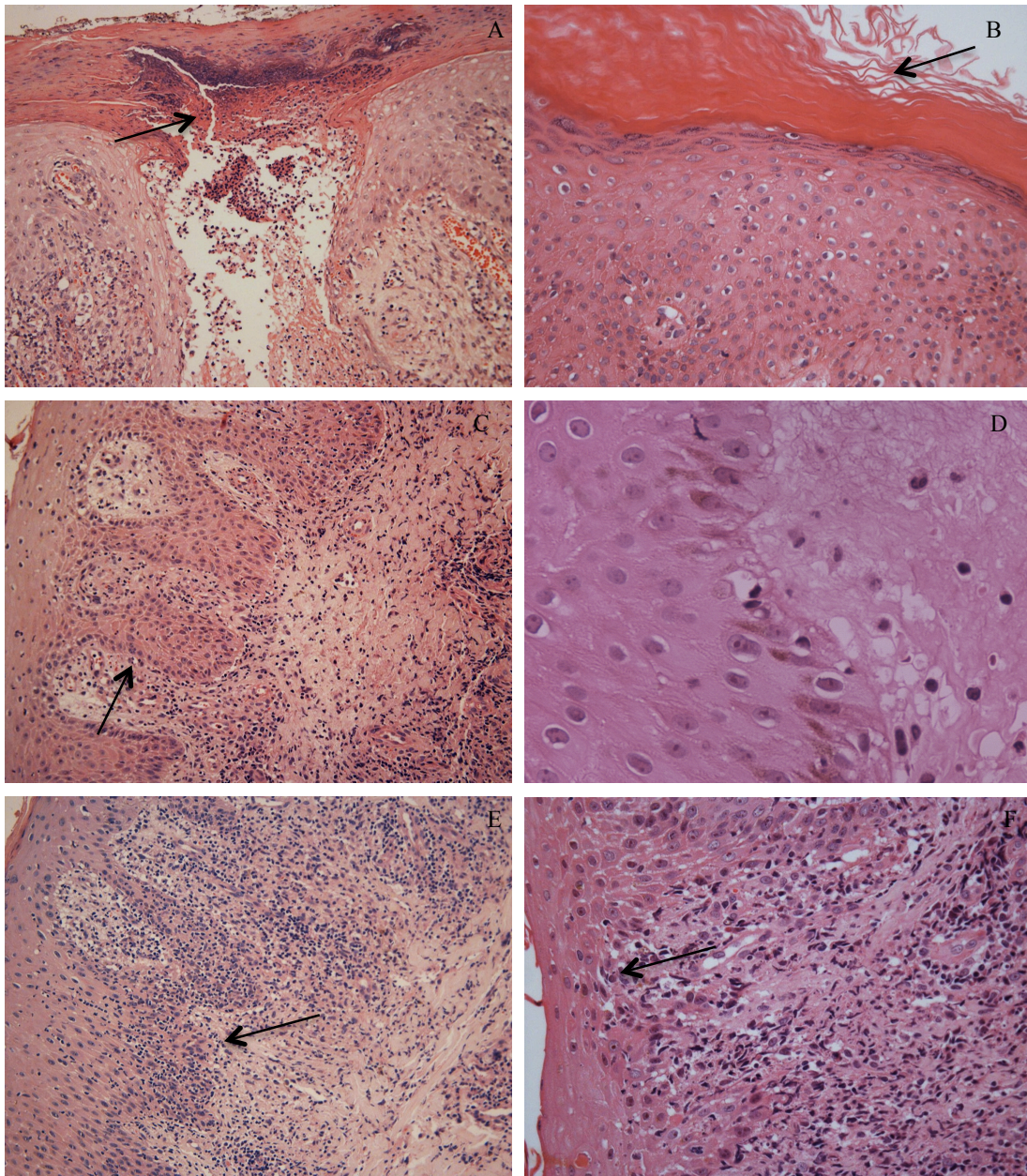
LD-P: leishmaniose disseminada – pápula.

A análise histopatológica das biópsias de lesões ulceradas, tardias e recentes, e de lesões da LD, úlcera e pápula, revelou presença de reação inflamatória crônica em todas as seções histológicas coradas com HE. Em todas as formas clínicas, a inflamação apresentava linfócitos, plasmócitos e macrófagos difusamente presentes na derme. Outros padrões histopatológicos também foram encontrados em biópsias como necrose, granulomas e células gigantes. Amastigotas de *Leishmania* foram detectados diretamente nas biópsias de lesões coradas por HE em 21 biópsias (53%) (Tabela 2).

## 5.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA

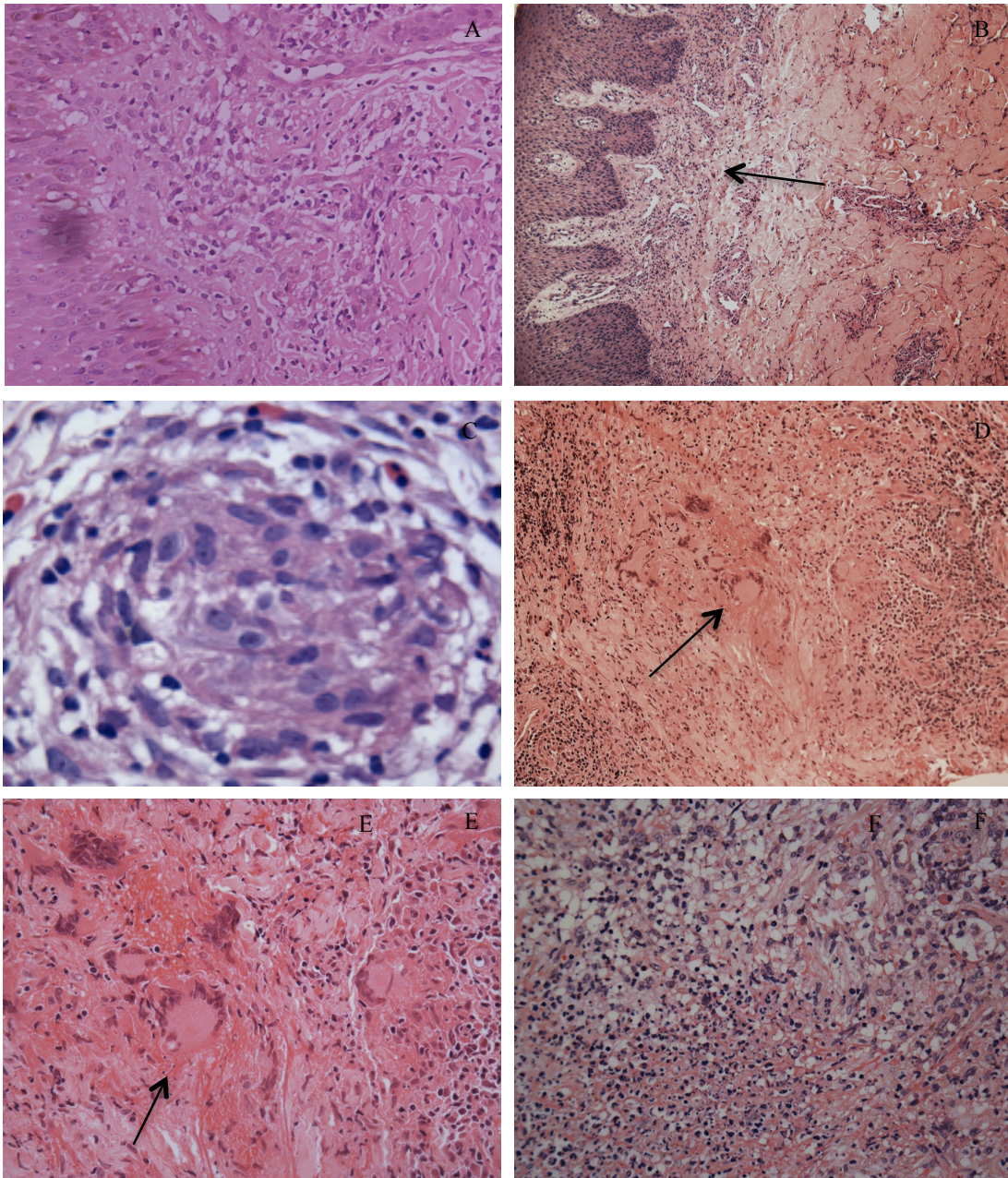
### 5.2.1 Aspectos Histopatológicos

A análise da epiderme e derme foi feita separadamente (Figura 7 e 8). As frequências dos aspectos histopatológicos analisados nas lesões estão descritas na tabela 5.



**Figura 7.** Aspectos histopatológicos presentes na epiderme. (A) Crosta fibrinoleucocitária (seta) (20x); (B) hiperqueratose (seta) (40x); (C) acantose (seta) (20x); (D) degeneração hidrópica (40x); (E) Espongiose (seta) (20x); (F) exocitose (seta) (40x).





**Figura 8.** Aspectos histopatológicos presentes na derme. (A) Edema (20x); (B) tecido de granulação (seta) (20x); (C) granuloma (100x); (D) células gigantes (seta) (20x); (E) células gigantes (seta) (40x); (F) necrose (40x).

Nas úlceras tardias (> 30 dias), observa-se na epiderme crosta fibrinoleucocitária em 3 casos (30%), hiperkeratose em 8 (80%), acantose em 100% dos casos, degeneração hidrópica e espongiase em 8 (80%) e exocitose em 5 pacientes (50%). Já na derme, foi observado edema na maioria dos casos (90%), tecido de granulação e formação de granuloma em 8 (80%), células gigantes em 2 biópsias (20%) e necrose lítica em 5 (50%). Nas 2 biópsias que apresentaram células gigantes multinucleada, também apresentavam granuloma.

Nas lesões com até 20 dias de evolução (consideradas recentes), a frequência das características morfológicas na epiderme e derme, foram semelhantes a úlcera tardia. Crosta fibrinoleucocitária é vista também em 30% dos casos, hiperkeratose em 90%, acantose em 100%, degeneração hidrópica em 80% e exocitose em 60%. Na derme, tecido de granulação esteve presente em 90% e células gigantes em 20%. Porém, diferentemente das úlceras com maior tempo de evolução, as lesões recentes apresentaram menos espongiase, granuloma e necrose lítica (Tabela 5)

**Tabela 5.** Frequência dos aspectos histopatológicos observados nas 40 biópsias de LC, por HE.

%	Epiderme										Derme				
	Crosta	Hiperqueratose	Acantose	Degeneração			Espongiose	Exocitose	Edema	Tecido de		Granuloma	Células Gigantes	Necrose Iífica	
				Hidrópica	Espingiose	Exocitose				Granulação	Granuloma				
LCL-T	30	80	100	80	80	80	50	90	90	80	20	50			
LCL-R	30	90	100	80	50	60	100	90	30	20	10				
LD-U	0	90	10	70	80	50	10	10	20	20	50				
LD-P	40	70	70	50	50	50	10	10	30	30	50				
<i>p</i>															
LCL-T x LCL-R	ns	ns	ns	ns	0.0001	ns	0.0015	ns	0.0001	ns	0.0001	ns	0.0001		
LCL-T x LD-U	0.0001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.0015	0.0001	ns	0.0001	ns	ns		
LD-U x LD-P	0.0001	0.0007	0.0001	0.0059	0.0001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		

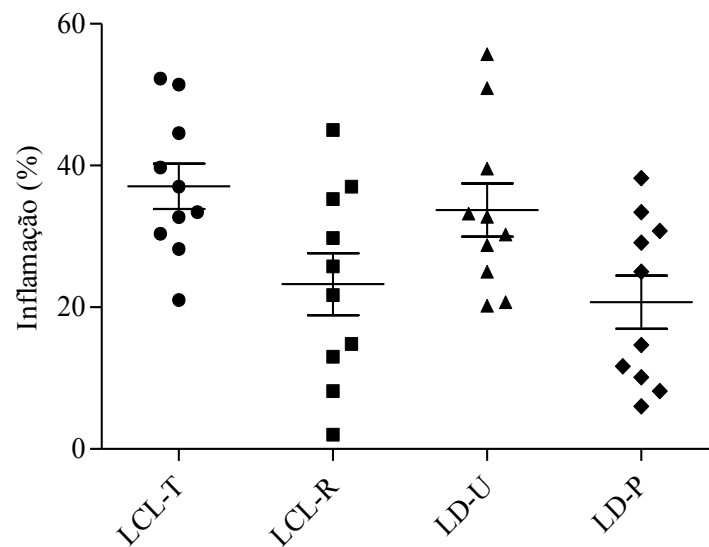
LCL-T: leishmaniose cutânea localizada tardia; LCL-R: leishmaniose cutânea localizada recente; LD-U: leishmaniose disseminada - úlcera; ns: não significante.

\* Foi utilizado o teste ANOVA.

### 5.2.2 Resposta inflamatória

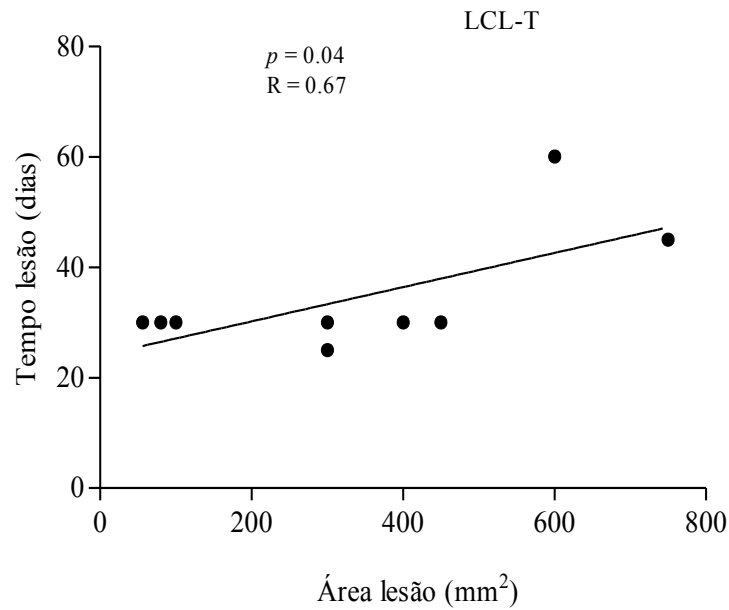
Através da análise morfométrica dos fragmentos, a porcentagem de inflamação presente na biópsia foi mensurada.

Porcentagem maior de inflamação foi observada em LCL-T ( $37 \pm 10$ ; intervalo de 21 a 52%) comparada com as lesões recentes ( $23 \pm 13$ ; intervalo de 2 a 37%) (Figura 9).



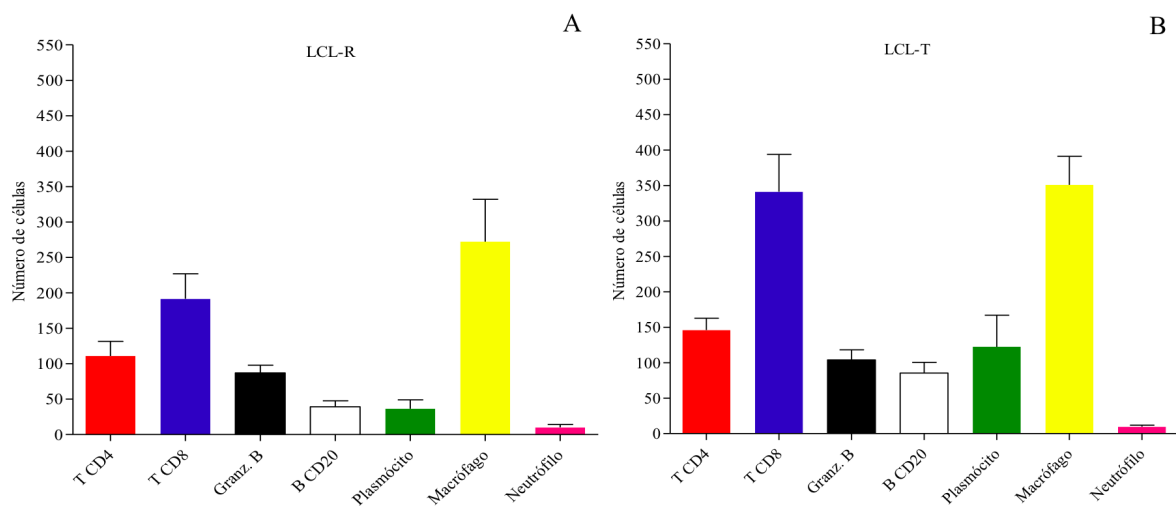
**Figura 9.** Avaliação da inflamação, em porcentagem, em cada forma clínica estudada. A média  $\pm$  o desvio padrão da porcentagem de inflamação também está representada. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). N=10 em todos os grupos.

Avaliando o tempo e extensão da área da lesão, foi visto que, somente em úlceras mais avançadas (mais de 30 dias), com a evolução da doença a lesão aumenta. Essa correlação não foi vista em úlceras classificadas como recentes (Figura 10).



**Figura 10.** Correlação linear de Pearson entre o tempo das lesões (dias) e suas áreas (mm<sup>2</sup>) nas biópsias das lesões de LC tardia (LCL-T). N=10.

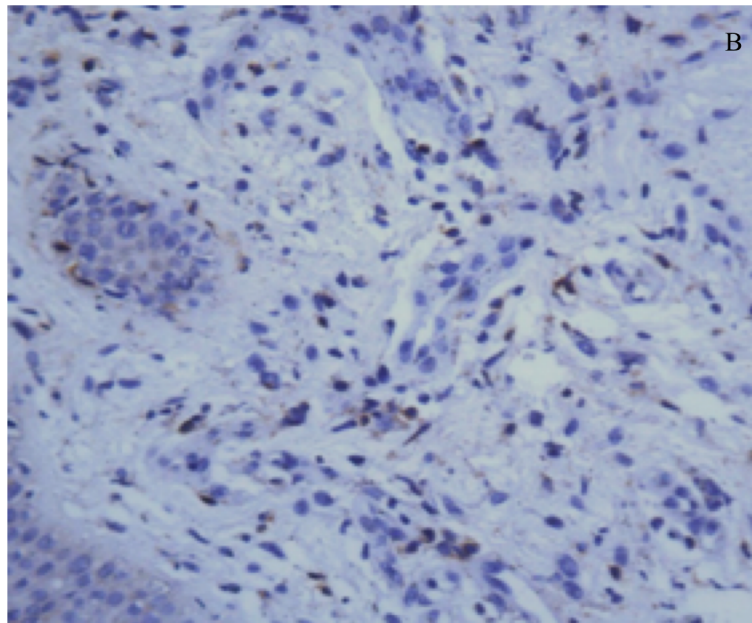
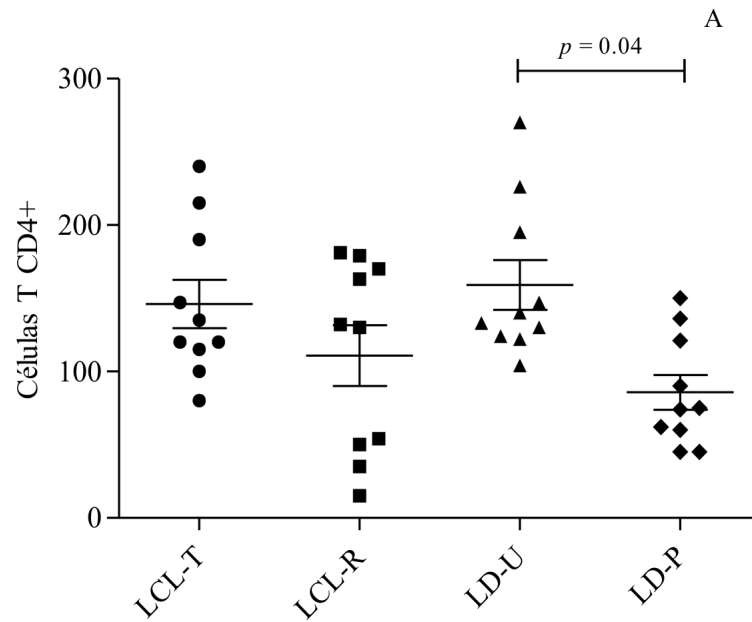
A análise do número de células foi realizada através do software ImageJ. O infiltrado das lesões foi predominantemente de macrófagos e linfócitos em ambas as lesões, porém em quantidades diferentes (Figura 11A e 11B).



**Figura 11.** Perfil celular do infiltrado inflamatório no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). As barras correspondem ao número de células/15 campos  $\pm$  erro padrão. N=10 em ambos os grupos.



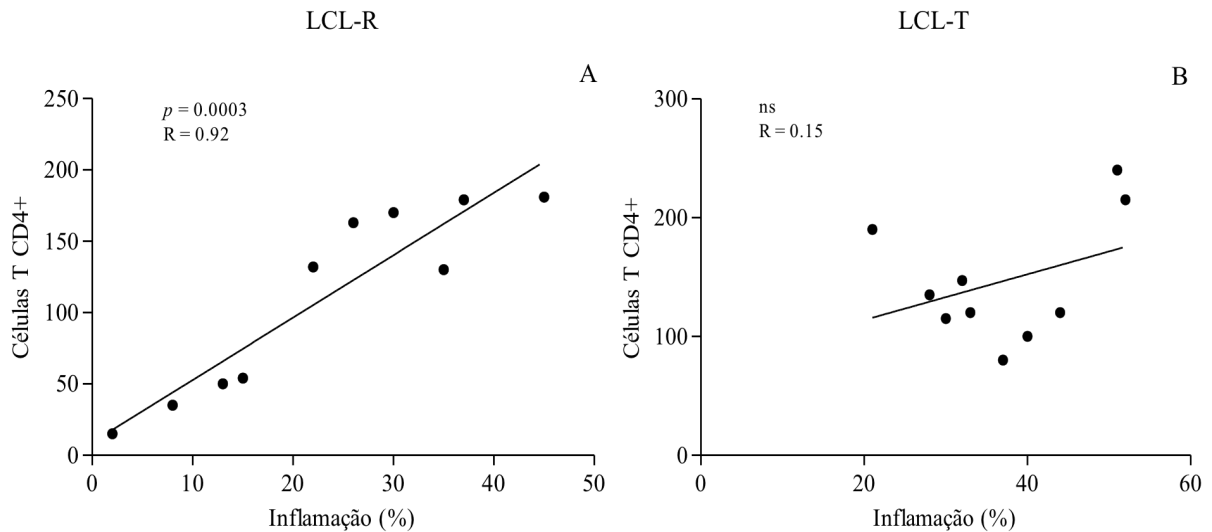
A presença de linfócitos T CD4+, embora não significativa estatisticamente, foi maior no grupo de úlceras tardias, apresentando maior média do que nas úlceras recentes (Figura 12).



**Figura 12.** (A) Número de células T CD4+ (em 15 campos) por forma clínica. A mediana  $\pm$  o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. (B) Imunomarcagem de linfócitos CD4+ (40x). N=10 em todos os grupos.

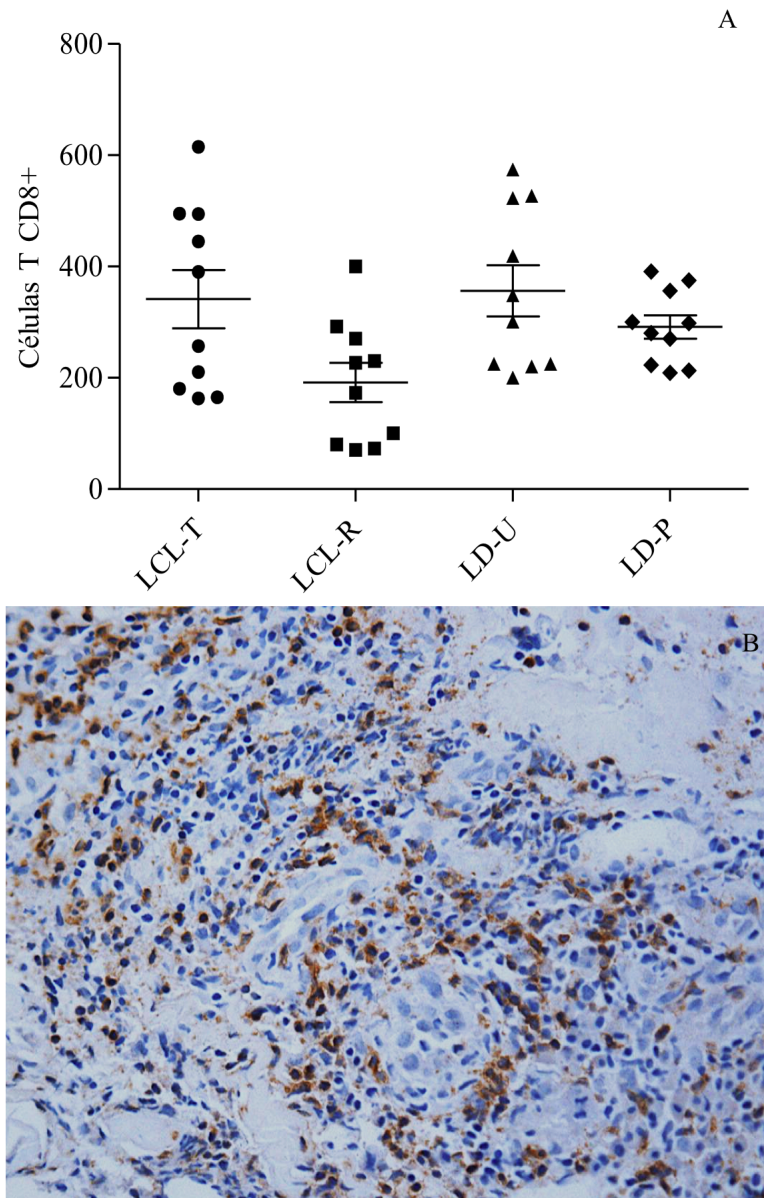


Comparando o número de células T CD4+ com a inflamação presente em cada biópsia, foi possível constatar que, no início da doença, a quantidade de CD4+ aumenta com a inflamação e, com consequente progressão da doença, em lesões tardias, essa correlação não é presente (Figura 13A e 13B).



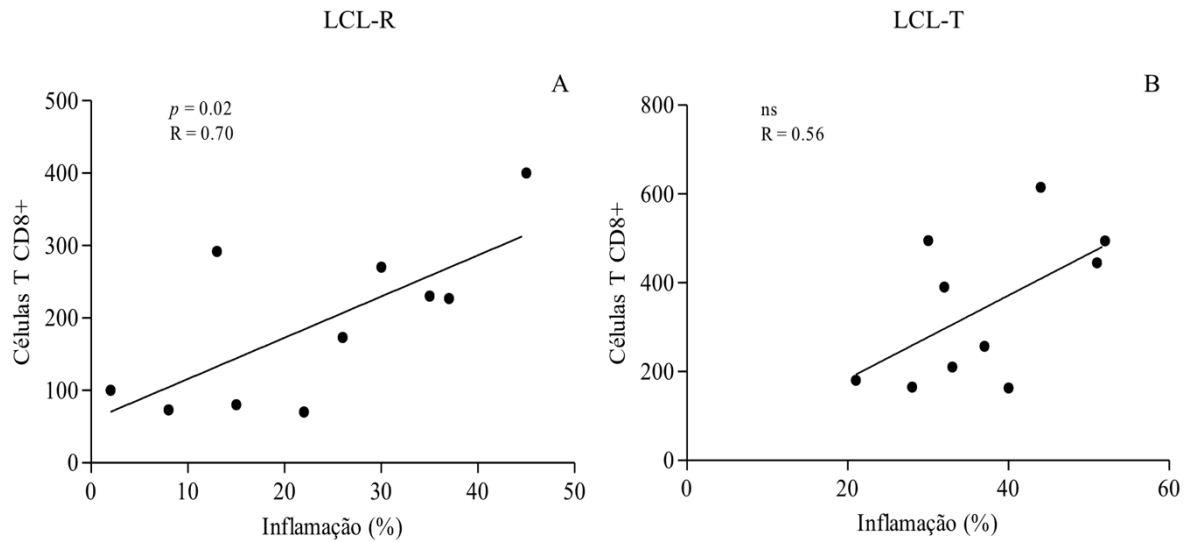
**Figura 13.** Correlação linear de Spearman entre linfócitos T CD4+ e inflamação tecidual nos grupos LCL-R (A) e LCL-T (B).

A média de células que expressam CD8 foi maior em lesões ulceradas tardias em comparação com lesões recentes, as quais apresentaram menor número absoluto de linfócitos T CD8+ (Figura 14).



**Figura 14.** Número de linfócitos T CD8+ (em 15 campos) por forma clínica. A média  $\pm$  o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). (B) Imunomarcagem de linfócitos T CD8+ (40x). N=10 em todos os grupos.

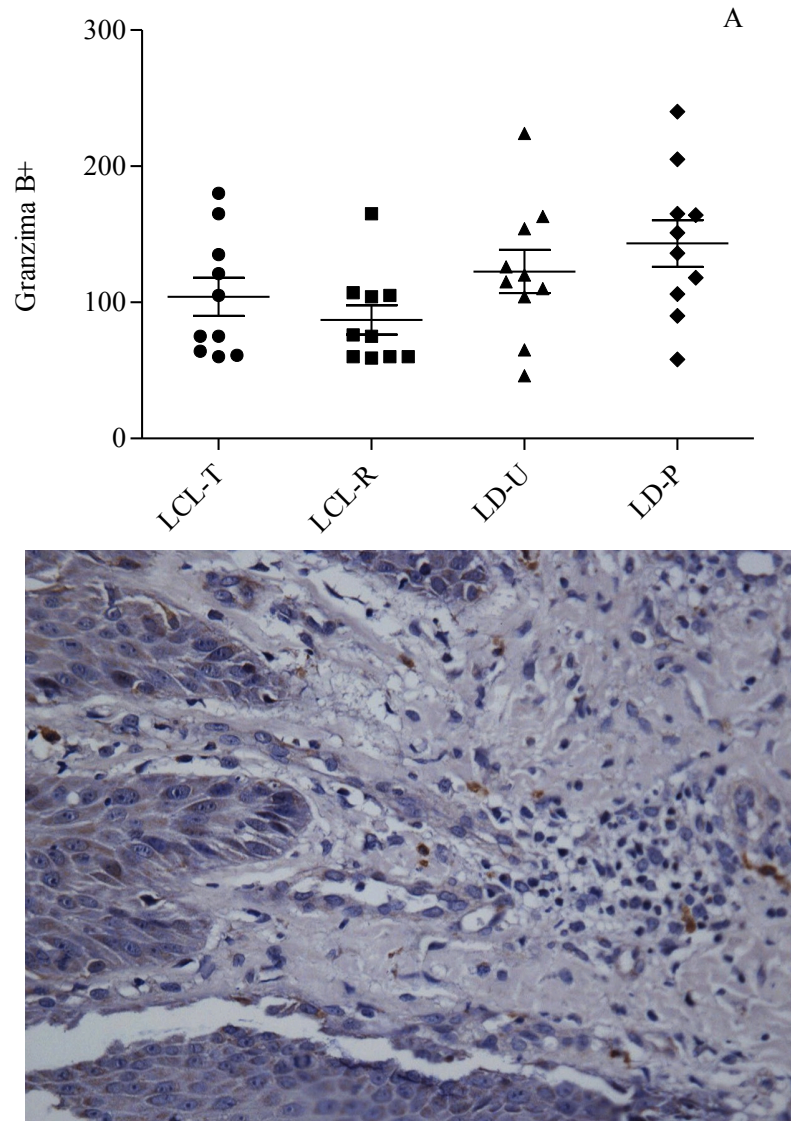
Para determinar a contribuição das células CD8 positivas no infiltrado inflamatório, foi avaliada sua correlação com percentuais de inflamação. Uma correlação positiva entre o número de células CD8+ e extensão da inflamação foi observada apenas ao comparar lesões de LCL-R, seguindo o mesmo comportamento de células CD4+ (Figura 15A e 15B).



**Figura 15.** Correlação linear de Pearson entre linfócitos T CD8+ e inflamação tecidual no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). N=10 em ambos os grupos.

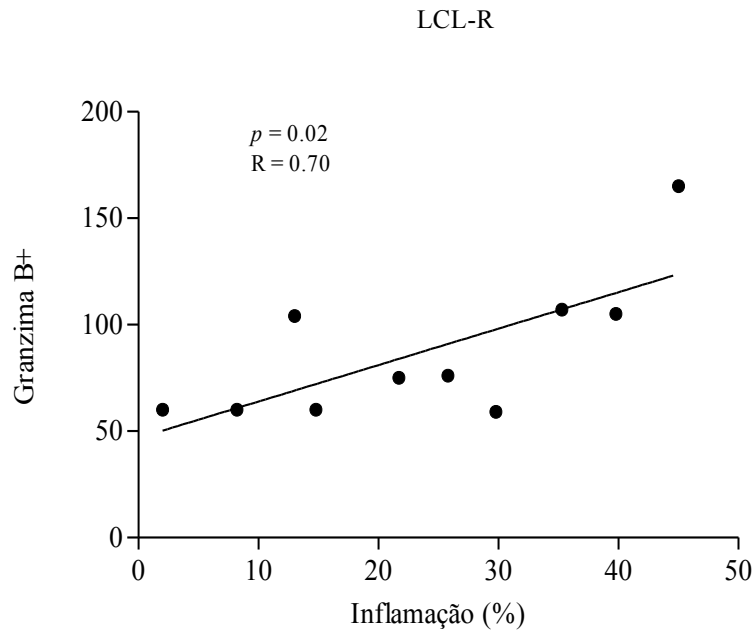
O tempo da úlcera e sua área não se correlacionou com a frequência de células T CD8+ (dados não mostrados).

A frequência de células granzima B+ variou minimamente entre os grupos LCL-T e LCL-R, com as úlceras tardias tendendo para uma maior quantidade dessas células (Figura 16).



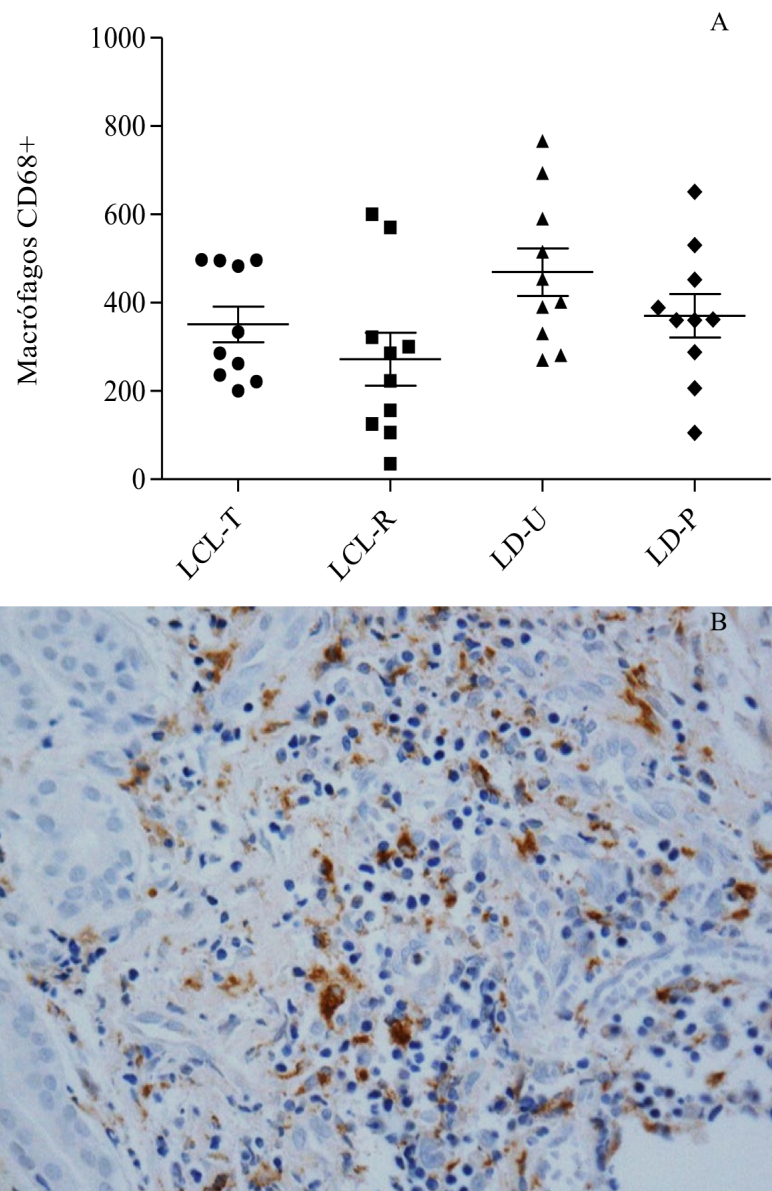
**Figura 16.** Número de granzima B+ (em 15 campos) por forma clínica. A média  $\pm$  o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). (B) Imunomarcagem de células granzima B+ (40x). N=10 em todos os grupos.

Na úlcera tardia foi visto que, quanto maior a inflamação, tende-se para uma menor quantidade de células granzima B+. O mesmo acontece comparando células expressando granzima B+ e tempo de lesões (dados não mostrados). De forma similar, tanto o número de células CD8+ e granzima B+ em ambas as lesões não se correlacionou com a área da lesão (dados não mostrados). Apenas a LCL-R apresentou relação com a inflamação (Figura 17).



**Figura 17.** Correlação linear de Pearson entre linfócitos granzima B+ e inflamação tecidual no grupo LCL-R. N=10.

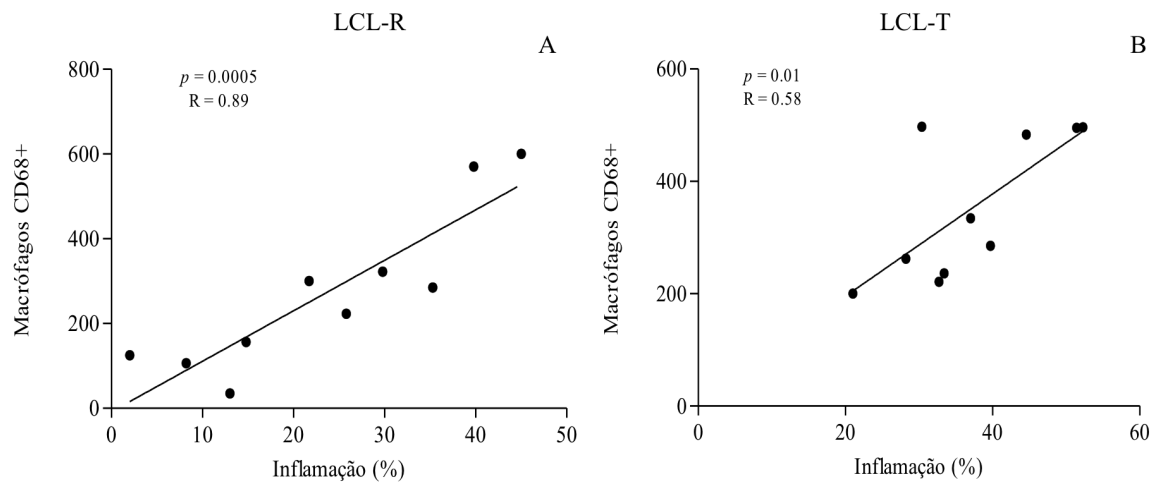
Os macrófagos, células que aparecem em maior quantidade seguido por linfócitos T CD8+, mostraram quantidade semelhante entre os dois grupos (Figura 18).



**Figura 18.** Número de macrófagos CD68+ (em 15 campos) por forma clínica. A mediana  $\pm$  o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ). (B) Imunomarcação de macrófagos CD68+ (40x). N=10 em todos os grupos.

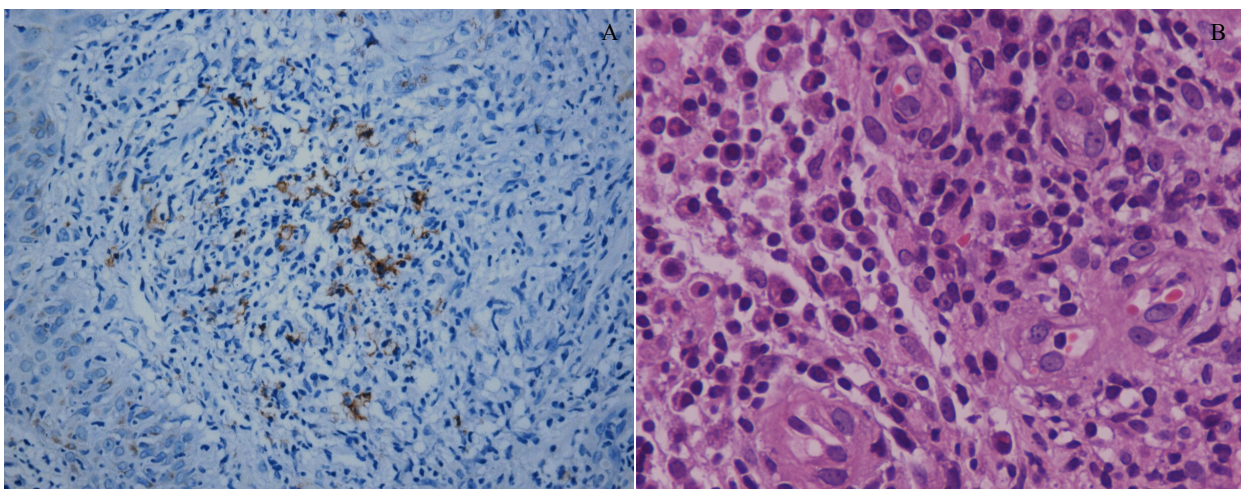
Diferentemente dos outros tipos celulares mensurados, o número de células CD68+ no infiltrado inflamatório mostrou aumentar progressivamente com o aumento da inflamação nos dois tipos de lesão (Figura 19A e 19B).



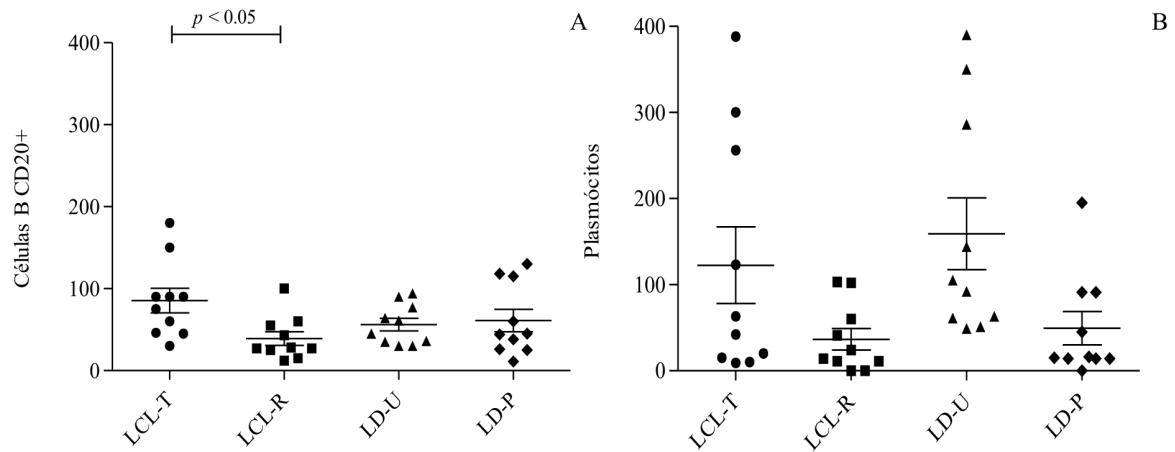


**Figura 19.** Correlação linear de Spearman entre macrófagos CD68+ e inflamação tecidual no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). N=10 em ambos os grupos.

Neste estudo analisou-se também a presença de linfócitos B e plasmócitos (Figura 20A e 20B). A quantidade de células B CD20+ e plasmócitos é maior em LCL-T do que em LCL-R (Figura 21A e 21B). O recrutamento dos dois tipos celulares não se mostrou estar correlacionado com a extensão da inflamação nas biópsias (dados não mostrados).



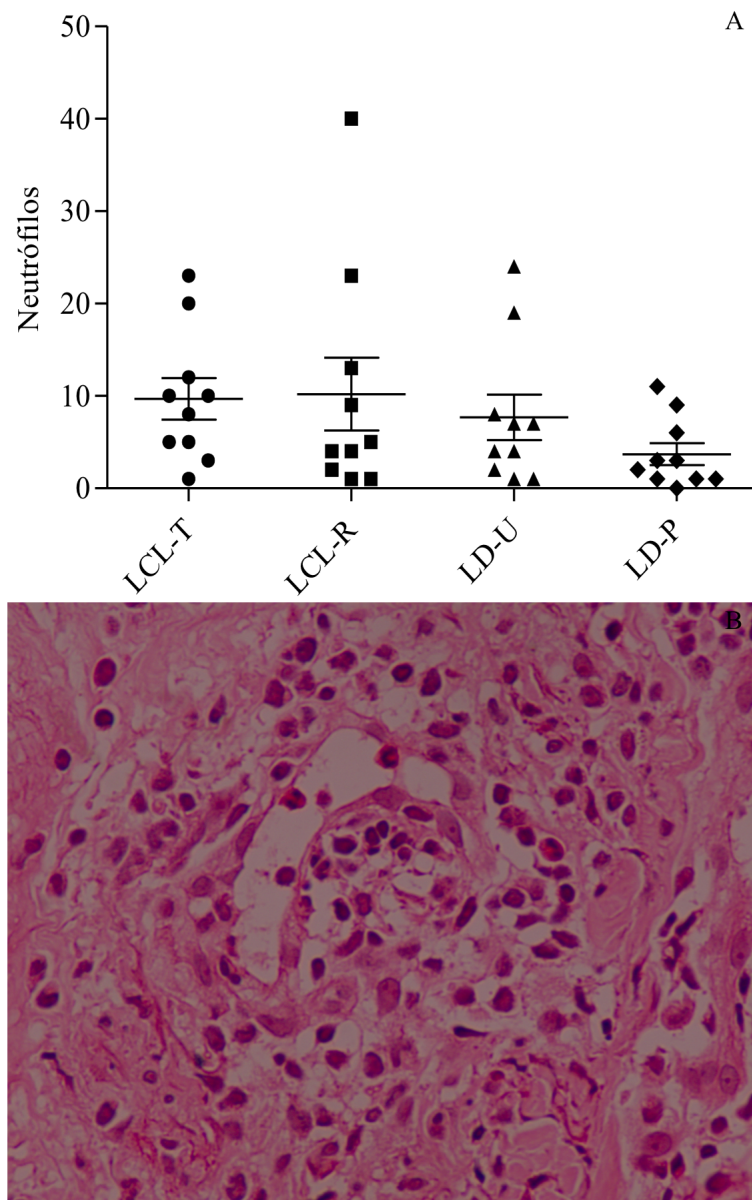
**Figura 20.** (A) Imunomarcacão de células B CD20+ (40x). (B) Em HE, presença de plasmócitos no infiltrado inflamatório (40x).



**Figura 21.** (A) Número de linfócitos B CD20+ e (B) número de plasmócitos (em 15 campos, 40x) por forma clínica. A média  $\pm$  o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA. N=10 em todos os grupos.

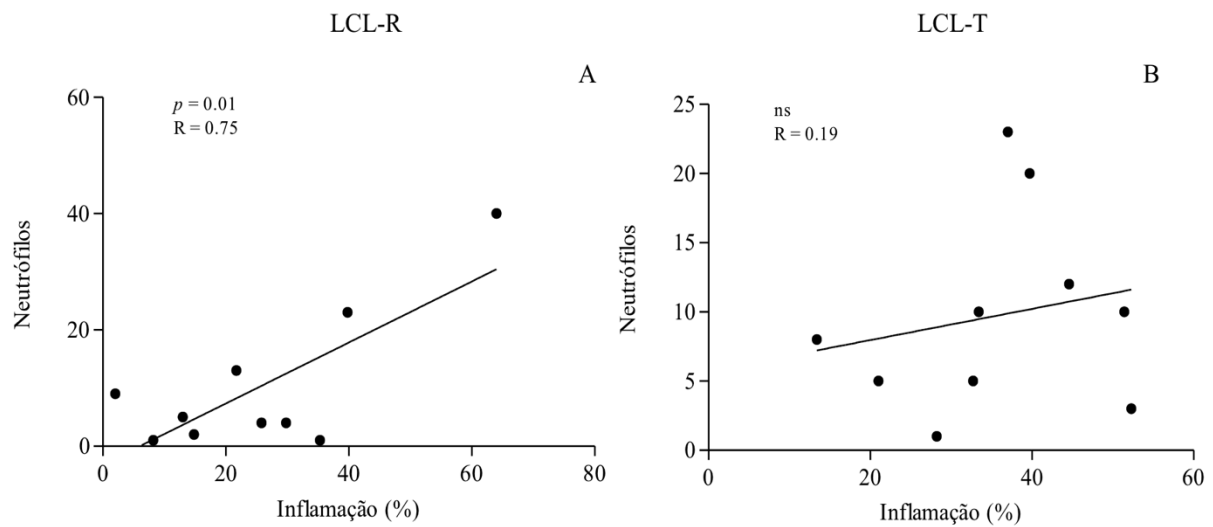
Em menor quantidade, os neutrófilos aparecem igualmente quando se compara a média da quantidade destas células em úlceras recentes e tardias (Figura 22A e 22B).





**Figura 22.** (A) Número de neutrófilos (em 15 campos, 40x) em cada forma clínica estudada. (B) Em HE, presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório de biópsia. A média  $\pm$  o desvio padrão também estão representados. Foi utilizado o teste ANOVA ( $p > 0.05$ ). N=10 em todos os grupos.

No entanto, na fase inicial da doença, os neutrófilos parecem ser recrutados de forma progressiva, correlacionando com o aumento do infiltrado inflamatório; isso não ocorre nas úlceras mais tardias (Gráfico 23A e 23B). Porém, a quantidade de neutrófilos não se correlaciona com o tempo de lesão (dados não mostrados).



**Figura 23.** Correlação linear de Pearson entre neutrófilos e inflamação tecidual no grupo LCL-R (A) e LCL-T (B). N=10 em ambos os grupos.

### 5.3 LEISHMANIOSE DISSEMINADA

#### 5.3.1 Aspectos Histopatológicos

Pacientes com a forma disseminada da leishmaniose apresentam úlcera primária e lesões secundárias fechadas ou micro ulceradas que podem regredir sem processo de ulceração. Assim, características histopatológicas presentes na epiderme diferem muito entre lesões secundárias e úlcera. A úlcera da LD apresenta maior frequência de hiperqueratose (90%), degeneração hidrópica (70%) e espongiose (80%), com ausência de crosta fibrinoleucocitária. Já as pápulas apresentam crosta fibrinoleucocitária em 40% das biópsias e mais casos com presença de acantose (70%). Exocitose foi igual entre ambas (50%).

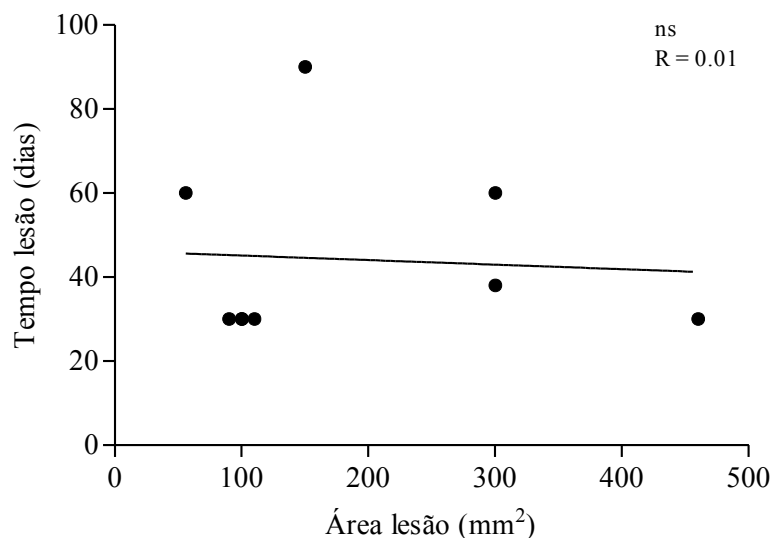
Na derme, não houve diferença entre as frequências dos aspectos histopatológicos (Tabela 5; pag. 38).

Assim como nas lesões ulceradas da LCL, a presença de células gigantes só ocorreu em casos com granuloma positivo nas úlceras da LD. Já nas pápulas, apenas um caso

apresentou-se positivo para ambas características, com 2 biópsias apresentando célula gigante com ausência de formação de granuloma.

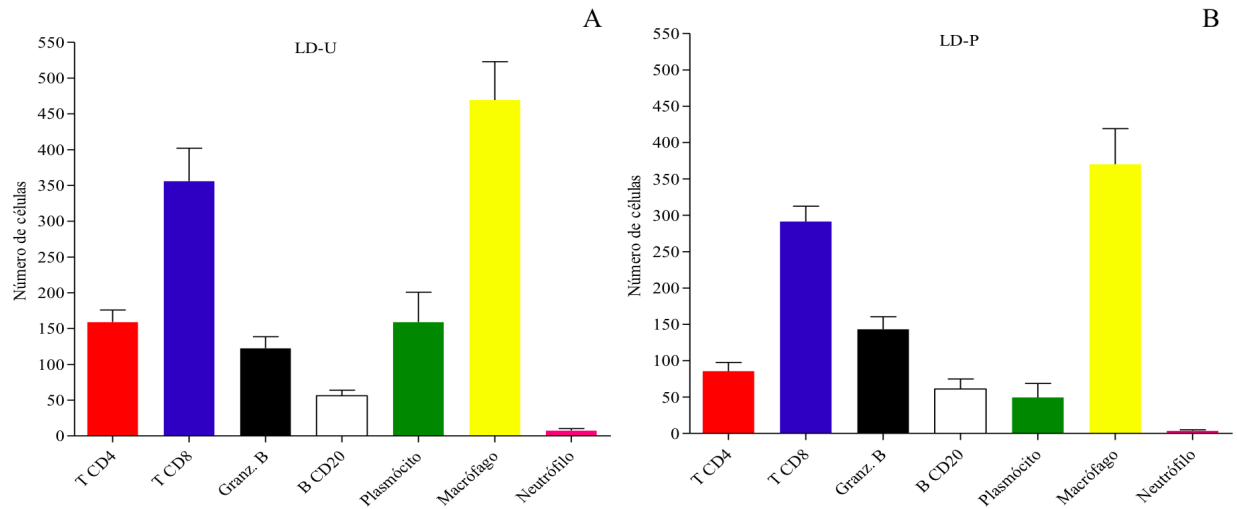
### 5.3.2 Resposta Inflamatória

Na avaliação da porcentagem da inflamação presente nos fragmentos de biópsias de lesões primárias e secundárias é possível visualizar que a lesão ulcerada (LD-U) possui maior quantidade de infiltrado inflamatório ( $35 \pm 12$ ; intervalo de 20 a 56%) do que lesões papulosas (LD-P) ( $20 \pm 12$ ; intervalo de 6 a 38%) (Figura 9; pag. 39). Assim, lesões primárias e secundárias de paciente com LD tiveram diferentes graus de inflamação. Biópsias de pacientes pertencentes a este grupo apresentavam úlcera e pápula concomitantemente e portanto, duas biópsias foram realizadas para que fosse possível avaliar lesões distintas em um mesmo momento. Apesar das lesões ulceradas deste grupo apresentarem tempo de evolução igual ao de pacientes com leishmaniose cutânea tardia (mais de 30 dias), não houve correlação com a área de lesão como visto no outro grupo (Figura 24). As pápulas não foram medidas.



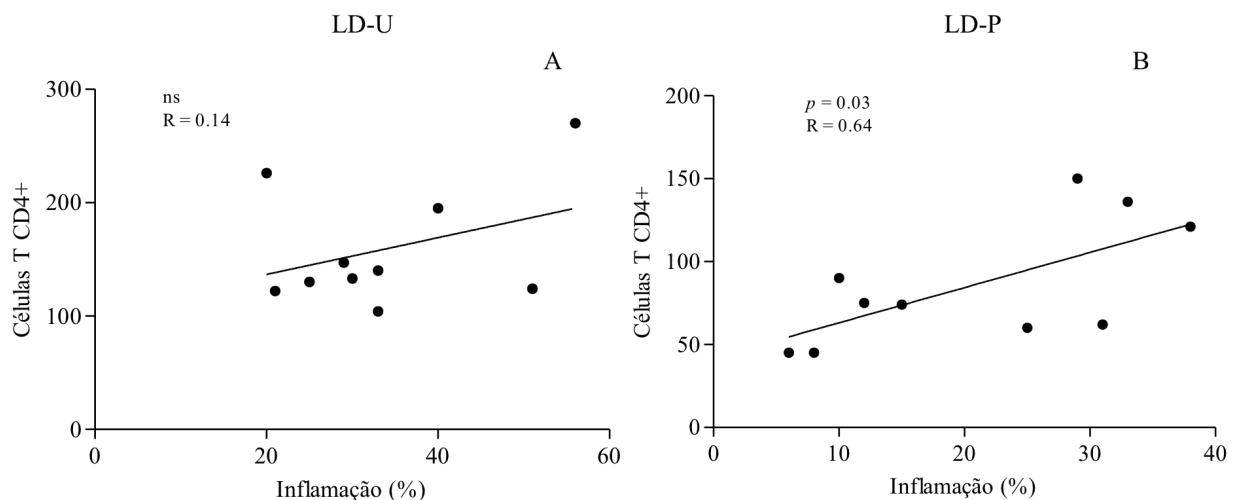
**Figura 24.** Correlação linear de Pearson entre o tempo das lesões (dias) e suas áreas (mm<sup>2</sup>) no grupo LD-U. N=10.

Ao analisar os tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório em úlceras e pápulas, nota-se também um predomínio de linfócitos e macrófagos (Figura 25).



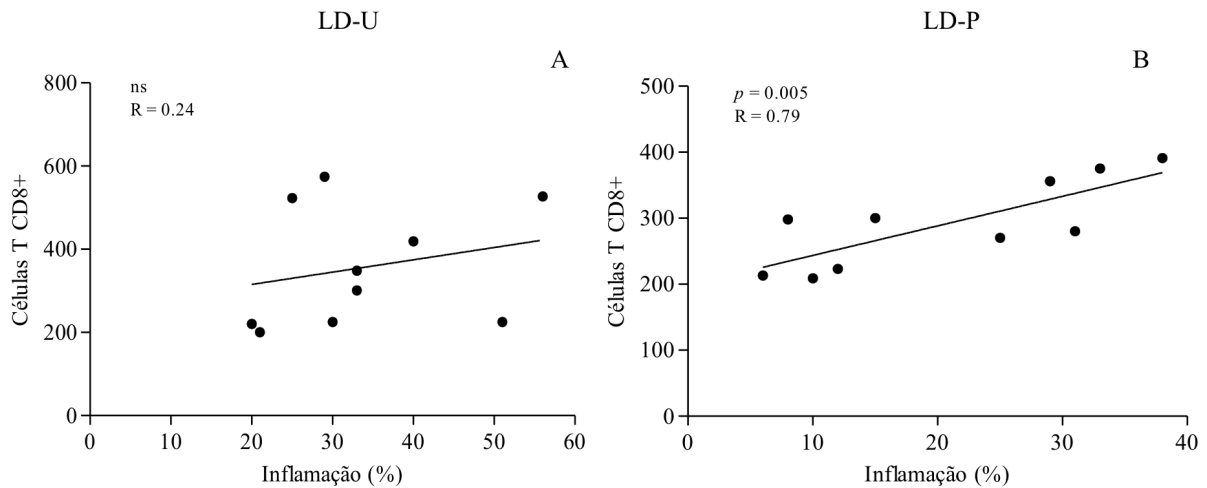
**Figura 25.** Perfil celular do infiltrado inflamatório no grupo LD-U (úlceras) (A) e LD-P (pápulas) (B). As barras correspondem ao número de células/15 campos  $\pm$  erro padrão. N=10 em ambos os grupos.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> são presentes em maior quantidade em úlceras do que em pápulas (Figura 12; pag. 41). Apresentando o mesmo comportamento das lesões recentes e tardias da LCL, as pápulas apresentaram correlação positiva dos linfócitos CD4<sup>+</sup> com aumento do infiltrado inflamatório, enquanto as úlceras não mostraram essa associação (Figura 26A e 26B).



**Figura 26.** Correlação linear de Spearman entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e inflamação tecidual no grupo LD-U (A) e LD-P (B). N=10 em ambos os grupos.

Este mesmo padrão ocorre ao avaliar a presença de células T CD8+, onde o grupo LD-P apresenta correlação entre a quantidade de T CD8+ e maior extensão da inflamação, o que não ocorre com as úlceras (Figura 27A e 27B).



**Figura 27.** Correlação linear de Pearson entre linfócitos T CD8+ e inflamação tecidual no grupo LD-U (A) e LD-P (B). N=10 em ambos os grupos.

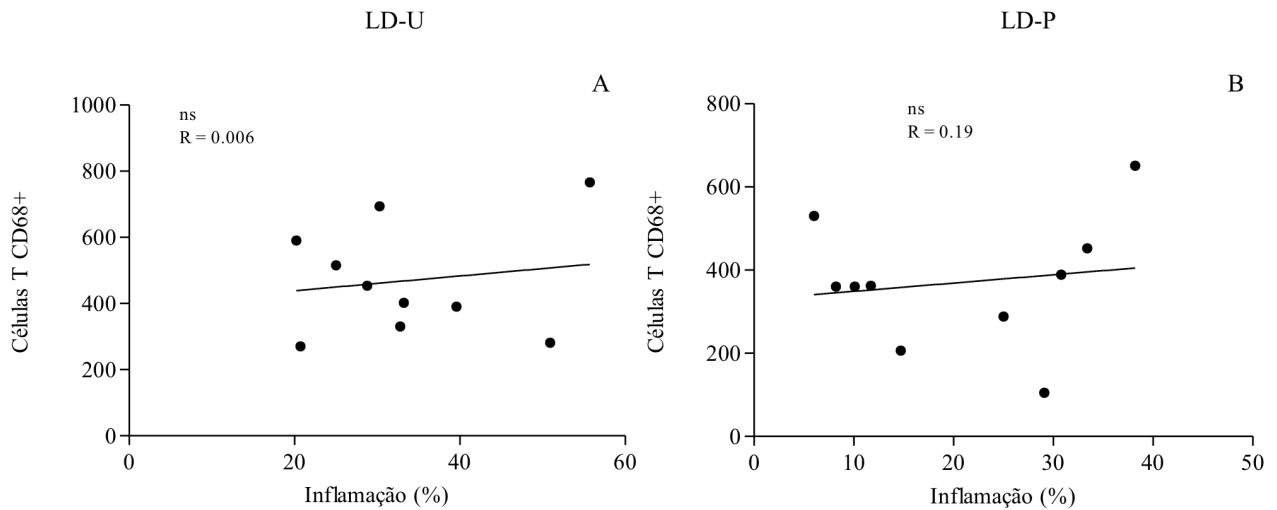
Porém, mesmo a quantidade de linfócitos CD8+ sendo maior nas úlceras, a diferença da média do número de células entre os grupos LD-U e LD-P é menor do que a vista entre as médias de células dos linfócitos T CD4+ (Figura 14; pag. 43).

O tamanho da úlcera não é influenciado pela quantidade de linfócitos T CD8+, e o aumento dessas células não está relacionado com maior tempo de lesão, como também é visto nas lesões de LCL (dados não mostrados).

As lesões papulares da LD apresentaram média de células granzima B+ discretamente maior em relação as úlceras da LD (Figura 16; pag. 45). Porém, a inflamação não correlaciona com a maior presença dessas células no infiltrado (dados não mostrados). Em relação ao tempo de lesão e sua área, a correlação com a presença de células com perfil citotóxico parece apresentar uma correlação negativa (dados não mostrados).

Macrófagos aparecem em quantidade discretamente maior em lesões ulceradas (Figura 18; pag. 47). Ao contrário do que ocorre nas lesões de LCL, a maior presença de

macrófagos não se relaciona com o aumento do infiltrado inflamatório em ambas as lesões de LD (Gráfico 28A e 28B).



**Figura 28.** Correlação linear de Spearman entre macrófagos CD68+ e inflamação tecidual no grupo LD-U (A) e LD-P (B). N=10 em ambos os grupos.

Linfócitos B CD20+ estão presentes em mesma quantidade nos grupos LD-U e LD-P (Figura 21A; pag. 49). Já plasmócitos são muito mais presentes no grupo LD-U (Figura 21B). Os linfócitos B e plasmócitos não apresentaram correlação com maior presença de infiltrado inflamatório, seguindo o mesmo padrão visto entre as lesões da LCL (dados não mostrados).

Neutrófilos também são raros nessa forma clínica da leishmaniose, com as pápulas tendendo para uma menor quantidade desse tipo celular (Figura 22A; pag 50). Se tratando de uma célula que vem parecendo ser importante na fase inicial da doença, vê-se que sua relação com a progressão da doença e maior infiltrado nas biópsias não ocorre, apresentando em lesões papulosas até mesmo uma relação negativa (dados não mostrados).

## 6 DISCUSSÃO

Variações nas manifestações clínicas das leishmanioses dependem da resposta do hospedeiro induzida durante o processo infecção-doença. As respostas imunológicas por um lado podem ser efetivas na destruição do parasito, e por outro também podem destruir o tecido de forma extensiva e progressiva. A resposta imune local e todos seus mecanismos celulares e moleculares ainda não são bem conhecidos, mas sabe-se que é predominantemente mediada por células da resposta imune inflamatória, envolvendo todos os mecanismos associados à cura, proteção e também associados ao agravamento da doença (MEHREGAN; MEHREGAN; MEHREGAN, 1999).

As biópsias avaliadas neste estudo revelaram mínimas diferenças no aspecto histopatológico entre as formas clínicas da leishmaniose cutânea. Nas bordas de úlceras de lesões localizadas tardias foi encontrada mais espongiose na epiderme e maior presença de granuloma e necrose lítica na derme do que em lesões recentes. A distribuição da frequência dessas características estão de acordo com as descritas no trabalho de Weigle & Saravia (1996) e com os achados descritos anteriormente por Magalhães e colaboradores (1982) que, comparando lesões agudas e crônicas de LTA, também mostraram semelhança de achados na histologia da derme e pouca diferença na epiderme. Estudos que avaliaram características morfológicas entre diferentes formas clínicas e entre biópsias antes e após tratamento de lesões de LC recorrente também não encontraram diferenças (ESTERRE et al., 1992; MEHREGAN; MEHREGAN; MEHREGAN, 1999).

Entre as biópsias de leishmaniose disseminada, as úlceras também apresentaram maior frequência de espongiose, degeneração hidrópica e hiperkeratose do que as pápulas. Em biópsias de pápulas foi detectada maior frequência de crosta fibrinoleucocitária e acantose, e aspecto inflamatório semelhante na derme. Estes mesmos aspectos foram descritos em um dos primeiros trabalhos sobre a histologia das lesões da leishmaniose disseminada (CARVALHO et al., 1994).

A comparação entre as úlceras da leishmaniose tardia e disseminada mostrou diferenças quanto a frequência de crosta fibrinoleucocitária, edema, tecido de granulação e granuloma, mas, em geral, sendo bastante semelhantes.

A dificuldade em estabelecer um padrão histopatológico nas lesões de leishmaniose cutânea está nas modificações que ocorrem com o progredir ou regredir das lesões e até

mesmo da possibilidade de coexistirem distintos padrões morfológicos em uma mesma lesão (BITTENCOURT; BARRAL, 1991; MAGALHÃES et al., 1986a). Até mesmo as alterações epidérmicas parecem inespecíficas e decorrentes do processo inflamatório que ocorre na derme. Essas alterações regridem com o processo terapêutico ou involução da doença (MAGALHÃES; CHIARINI; RAICK, 1982; MAGALHÃES et al., 1986; MAGALHÃES et al., 1986a). Porém, diferenças na composição celular e expressão de moléculas de adesão entre as formas clínicas de LTA sugere que a epiderme também é um local imunorregulatório da infecção por *Leishmania* (TAPIA; CÁCERES-DITTMAR; SÁNCHEZ, 1994; TAPIA et al., 1994).

Portanto, não é possível estabelecer através do exame histopatológico o tempo de evolução de uma lesão de leishmaniose cutânea ou até mesmo prever se esta lesão pode tender a progressão ou cura clínica.

Sabe-se que a resposta imune nas formas clássicas de leishmaniose cutânea envolve, além de macrófagos e células dendríticas, linfócitos CD4+ e CD8+. Estudos já caracterizaram o perfil de citocinas, podendo os hospedeiros apresentarem respostas Th1 ou Th2. Esses padrões da resposta imune estão bem descritos a partir de células do sangue periférico (CAMPANELLI et al., 2006; COUTINHO et al., 1996; REED; SCOTT, 1993; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; ROCHA et al., 1999), porém poucos estudos avaliaram a resposta *in situ* (CAMPANELLI et al., 2006; DA-CRUZ et al., 2005; ESTERRE et al., 1992; PALMA; SARAVIA, 1997) e a compara com a resposta na leishmaniose disseminada (CARVALHO et al., 1994; MACHADO et al., 2011; TURETZ et al., 2002).

Ao contrário dos estudos com células do sangue periférico nos quais não foi possível diferenciar células mononucleares circulantes de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e controles (CAMPANELLI et al., 2006), ou antes e após tratamento (DA-CRUZ et al., 1994; ESTERRE et al., 1992), na avaliação sobre células *in situ*, foi possível descrever um padrão diferente de resposta imune (CAMPANELLI et al., 2006; ESTERRE et al., 1992; UYEMURA et al., 1993). Devido ao sítio das lesões apresentarem reações imunológicas específicas em resposta ao agente causal e lesão tecidual, e das células terem capacidade de migração via corrente sanguínea podendo a lesão apresentar resposta diferente da encontrada no sangue periférico (PIRMEZ et al., 1990), abordar a presença dos componentes celulares nas biópsias de pele é de grande importância.



Ao se comparar o infiltrado inflamatório, foi observado que úlceras da forma clássica e disseminada apresentaram maior média de inflamação se comparado às úlceras recentes e pápulas. Assim, com a progressão da doença há um influxo contínuo de células para o tecido e muitas permanecem neste local.

As células T CD4<sup>+</sup> são as maiores produtoras de IFN- $\gamma$  em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (BOTTREL et al., 2001). Esta citocina é essencial para a resistência do hospedeiro ao parasito através da ativação de macrófagos e consequente morte das amastigotas intracelulares. Segundo Uyemura et al. (1993), a abundância de células CD4<sup>+</sup> tipo Th1 pode ser responsável não só pelo desenvolvimento de uma resistência imunológica mas também pela cicatrização natural das lesões (UYEMURA et al., 1993).

Nas biópsias de úlceras com maior tempo de evolução, tanto da leishmaniose cutânea localizada quanto da disseminada, houve maior quantidade de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do que lesões recentes e pápulas. Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores que também avaliaram lesões com diferentes tempos de evolução, detectando um aumento na proporção de linfócitos CD4<sup>+</sup> e também CD8<sup>+</sup> em lesões com maiores diâmetros (DA-CRUZ et al., 2005; PALMA; SARAVIA, 1997).

As lesões recentes e as pápulas, ao contrário das úlceras tardias e da disseminada, tiveram correlação positiva entre células CD4<sup>+</sup> e o aumento do infiltrado inflamatório. Esses dados sugerem que, durante o desenvolvimento inicial da doença, o recrutamento de células CD4<sup>+</sup> ocorre de forma progressiva. Já com o passar do tempo, em lesões tardias, a maior frequência dessas células, não associada com a extensão da inflamação, sugere uma mudança do perfil de resposta protetora para ativadora da fase da cicatrização das lesões.

Pouco se sabe dessa dinâmica das células T durante a evolução da doença. A mudança de inflamação para a fase de cicatrização é pouco investigada ainda. Outros achados que também parecem pouco conhecidos é a maior presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no local da infecção.

Em todos os grupos observou-se maior número de células T CD8<sup>+</sup> do que de T CD4<sup>+</sup>. As respostas imunológicas podem ser efetivas para a destruição da *Leishmania* total ou parcial, mas essa mesma resposta protetora pode causar destruição tecidual extensiva e progressiva (ROCHA et al., 1999; WEIGLE; SARAVIA, 1996). Nesta ambiguidade entre proteção e destruição tecidual, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem também estar envolvidos. A

presença de linfócito T CD8+ citotóxico já foi descrita no sangue periférico de pacientes com a forma mucosa da leishmaniose, não sendo possível detectar no sangue de pacientes com a forma cutânea (BRODSKYN et al., 1997).

Já há na literatura informações sobre uma maior presença de CD8+ com atividade citotóxica nas lesões de leishmaniose (BARRAL et al., 1987; FARIA; GOLLOB; JR, 2005; FARIA et al., 2009; VIEIRA et al., 2002). Considerando-se a citotoxicidade para a maioria destas células, a análise da frequência de CD8+ nas lesões pode sugerir um papel na destruição do tecido no local da infecção. Isso explica a maior quantidade de células CD8+ recrutadas nas lesões ulceradas do que em úlceras recentes e pápulas. Estes dados são consistentes com estudo anterior que demonstrou maior porcentagem de células CD8+ em relação a células CD4+ em lesões mais tardias, o que contribui para a hipótese de que as células T CD8+ estão envolvidas também destruindo o tecido, ou ainda podem contribuir para a cura eliminando os macrófagos parasitados (DA-CRUZ et al., 1994, 2005; FARIA et al., 2009).

Sabe-se que células T CD8+ também desempenham uma função reguladora da resposta imune (BRODSKYN et al., 1997; FARIA et al., 2009; ROCHA et al., 1999; UYEMURA et al., 1993; VIEIRA et al., 2002). Vieira e colaboradores (2002) mostraram que tanto a leishmaniose localizada como a disseminada apresentam lesões com maior frequência de células T CD8+ do que células T CD4+ no infiltrado inflamatório, sugerindo que as células CD8+ participam diretamente na resposta imune contra parasitas, principalmente por produção de IFN- $\gamma$  que induz a ativação de macrófagos (VIEIRA et al., 2002). No entanto, supõe-se que células T CD8+ possam participar também da cura ao produzir níveis elevados de IL-10 (FARIA et al., 2009; ROCHA et al., 1999).

Assim como as células T CD4+, o número de células T CD8+ aumenta progressivamente com a extensão do infiltrado inflamatório apenas em lesões recentes e pápulas. Este resultado mostra que desde o início do infiltrado inflamatório ocorre recrutamento de células T CD8+. Linfócitos T CD8+ no início podem estar associados, devido ao predomínio de atividade citotóxica através da liberação de enzimas líticas como granzima e perforina, com o desenvolvimento das lesões na fase inicial da doença seguindo um mesmo padrão: com maior tempo de duração da lesão podem ocorrer mudanças na dinâmica da infiltração de células, com uma diminuição gradual de células CD8+, provavelmente correlacionada com uma redução no número do parasita, ou resposta modulada para maior produção de IFN- $\gamma$ , desempenhando um papel na regressão e cura da lesão (FARIA et al., 2009; MORGADO et al., 2008).

Outra análise abordada neste estudo é a avaliação da resposta citotóxica presente no infiltrado inflamatório através da detecção de granzima B<sup>+</sup> no tecido. Para isso, células apresentando grânulos de granzima B, os quais estão envolvidos na morte celular pela via perforina-granzima B, foram quantificadas como indicativo da citotoxicidade. A via Fas/FasL não foi avaliada, no entanto, a presença de granzima é um bom indicativo já aplicado em vários estudos (BOUSSOFFARA et al., 2004; FARIA et al., 2009).

Todas as biópsias apresentaram células granzima B<sup>+</sup> presentes no infiltrado inflamatório. Embora não tenha havido significância estatística ao se comparar diferentes formas de lesões, as úlceras com menos de 20 dias de evolução apresentaram quantidade discretamente menor de células que expressam granzima B ao se comparar com úlceras tardias e úlceras da disseminada. Estes achados são concordantes com estudo anterior que mostra a expressão de granzima A no tecido (FARIA et al., 2009). Apesar de usar este outro tipo de granzima, foi também visto uma maior expressão de grânulos citotóxicos em lesões tardias do que em lesões iniciais da leishmaniose localizada que não tinham ainda ulceração (FARIA et al., 2009).

Curiosamente, as lesões secundárias, após disseminação, mostraram tendência em apresentar maior número de células granzima B<sup>+</sup>. Sabe-se que as pápulas não evoluem para úlceras e por vezes desaparecem, sugerindo que células granzima B<sup>+</sup> podem controlar a lesão. Por outro lado, já foi relatada associação de leishmaniose disseminada com envolvimento de mucosa, devido à disseminação rápida de lesões através da pele e mucosa (ALMEIDA et al., 1996; TURETZ et al., 2002).

Assim como na avaliação das células T CD8<sup>+</sup>, nossos achados mostraram não haver associação significativa entre a expressão de granzima B e gravidade da doença (maior tempo e área da lesão). Este resultado concorda com o estudo de Boussoffara et al. (2004), onde os níveis de granzima B não se correlacionaram com o número e o tamanho da lesão. No entanto, granzima B parece participar na progressão da lesão em LCL-R, considerando o aumento de sua expressão juntamente com a inflamação.

Apesar de não ser avaliada a presença de células NK que podem também apresentar atividade citotóxica, estudo anterior mostrou que granzima B é essencialmente derivada de células T CD8<sup>+</sup> (TRAPANI, 2001). Faria e colaboradores (2005) também demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> são responsáveis pela maior liberação de granzima total na leishmaniose cutânea. Neste trabalho também foi descrito que o número de células granzima A<sup>+</sup> foi significativamente maior na leishmaniose mucosa do que em lesões de

leishmaniose cutânea, sugerindo um papel para esta molécula na destruição tecidual (MCELHANEY et al., 1996; SMYTH et al., 2001; TRAPANI et al., 2001).

Tomadas em conjunto, células T CD8<sup>+</sup> e granzima B<sup>+</sup> estão presentes no infiltrado inflamatório da leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose disseminada, embora não possamos concluir se estas contribuem para contenção/disseminação do parasito. Porém, a função citotóxica da granzima talvez possa contribuir para o mecanismo de ulceração.

Macrófagos estão entre as primeiras células hospedeiras da *Leishmania* devido a sua capacidade fagocítica, produção de citocinas pró-inflamatórias e de digestão intracelular de microrganismos via NO (VON STEBUT, 2007). No entanto, essas células se tornam habitat adequado para determinados parasitos intracelulares, como a *Leishmania*, que permanecem vivos em seu interior, crescem e se multiplicam.

O recrutamento de monócitos do sangue, que se transformam em macrófagos no local da lesão, ocorre de 2 a 3 dias depois da infecção (MÜLLER et al., 2001) e está associado com a indução de recrutamento de células pró-inflamatórias, como neutrófilos, além de fazer parte da formação de granulomas (VON STEBUT et al., 2003).

A presença de macrófagos é vista nos dois estágios avaliados da leishmaniose localizada e nas duas formas clínicas de forma semelhante, porém com tendência para maior quantidade em lesões de leishmaniose disseminada. Essa predominância também já foi observada por Vieira e colaboradores (2002). Apesar de não ter sido avaliado o número de parasitos na lesão entre os grupos, a não correlação do aumento do infiltrado na forma disseminada talvez se dê pela maior quantidade de parasitos e assim necessidade maior de permanência dos macrófagos no local da lesão. Já nas lesões recentes e tardias, a presença de macrófagos parece estar mais relacionada com a intensidade da inflamação.

Vários estudos vêm avaliando os monócitos circulantes em condições fisiológicas e patológicas, como no sangue de pacientes com LTA, e suas subpopulações. A partir desses estudos, os monócitos foram classificados como clássicos, intermediários e não clássicos, a depender dos marcadores de membrana (CD14 e CD16) (SOARES et al., 2006; ZAWADA et al., 2011; ZIEGLER-HEITBROCK, 1996). O tipo de monócito a ser recrutado para o local de lesão e sua expressão de citocinas pode estar relacionado com a gravidade da doença (BELGE et al., 2002; SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK et al., 2008).

Diferente das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, pouco se tem relatado sobre a função das células B na leishmaniose cutânea.

Nossos achados revelaram que lesões ulceradas tardias da leishmaniose cutânea apresentam maior quantidade de linfócitos B comparadas com lesões recentes e lesões primárias e secundárias da leishmaniose disseminada. Vieira e colaboradores (2002) já relataram uma diferença entre grupos de pacientes com leishmaniose cutânea clássica e disseminada. Uma maior produção de IFN- $\gamma$  está associada com maior estimulação de células B a secretar anticorpos resultando em uma melhor contenção do parasito em pacientes com leishmaniose cutânea localizada. No entanto, os parasitos poderiam se beneficiar deste mecanismo de contenção para sua entrada em macrófagos e assim contribuir com permanência da lesão (VIEIRA et al., 2002).

As lesões primárias e secundárias da leishmaniose disseminada apresentaram número de células B semelhante. Maiores níveis de anticorpo no sangue já foram associados com disseminação para mucosa em pacientes com leishmaniose localizada (CARVALHO et al., 1994). A quantidade de células B de forma similar tanto em úlcera e pápulas podem estar relacionadas com a capacidade de disseminação da doença. Sugere-se que, devido a diferença da resposta imune entre esses pacientes, as células B possam apresentar perfil distinto e atuar de forma diferente na leishmaniose disseminada, com um padrão mais relacionado com a disseminação, enquanto na leishmaniose localizada, estaria relacionadas com lesões mais persistentes.

Células B não produzem somente anticorpos. Estas células podem também participar da imunorregulação com produção de citocinas. Uma nova classe de células B capazes de atuar também como células regulatórias (Bregs) através de produção de citocinas supressoras, como IL-10, vem sendo estudada em doenças crônicas e autoimunes (CARTER; ROSSER; MAURI, 2012; GIANNOUKAKIS; TRUCCO, 2012; YANG et al., 2009). Uma avaliação da existência de maior número de células Breg em lesões de pacientes com a forma disseminada talvez mostre que, apesar de modular a resposta inflamatória, Bregs também favoreçam a disseminação da *Leishmania* nesses indivíduos.

Uma diferença no padrão desse tipo celular em relação aos linfócitos T avaliados acima, é que não há correlação com infiltrado inflamatório em nenhuma forma clínica, sugerindo que o recrutamento desse tipo celular não ocorre de forma gradual, com a progressão da doença.

Plasmócitos são constantemente vistos no infiltrado das lesões em todos os grupos e sua presença foi maior que de linfócitos B nas lesões ulceradas da leishmaniose cutânea localizada e disseminada. Estes dados estão de acordo com estudos prévios que mostram

que a maioria destas células se encontram diferenciadas no local da lesão e são responsáveis por produção de imunoglobulinas *in situ* (ESTERRE et al., 1992; MAGALHÃES et al., 1986b). A secreção de anticorpos por células B diferenciadas (plasmócitos) poderia favorecer a opsonização e uma fagocitose mais eficiente, que resulta em opsonização dos parasitos e/ou de seus antígenos de forma mais efetiva (MAGALHÃES et al., 1986b; VIEIRA et al., 2002).

Seguindo o mesmo padrão descrito nos linfócitos B, os plasmócitos também não apresentam associação com o influxo de infiltrado inflamatório.

Neutrófilos são raros comparados às demais células e sua análise revelou semelhança dessas células em todos os tipos de lesões em ambas formas clínicas, mas com as pápulas tendendo para uma menor quantidade de neutrófilos do que as úlceras.

Neutrófilos são as primeiras células a migrar (em geral nas primeiras quatro horas) para o local da picada onde o parasito foi inoculado, podendo auxiliar a forma promastigota a ser rapidamente fagocitada (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; MÜLLER et al., 2001). Na literatura recente tem sido intensa a investigação sobre o papel de neutrófilos em infecções crônicas. Na leishmaniose vários trabalhos vêm avaliando o papel dos neutrófilos, principalmente na fase inicial da doença e alguns ainda são controversos: se por um lado neutrófilos contribuem para a proteção, por outro podem contribuir para a imunopatologia (AFONSO et al., 2008; AGA et al., 2002; DABOUL, 2010; VON STEBUT, 2007).

Estudos sugerem que a *Leishmania* pode utilizar-se dos neutrófilos para invasão nos macrófagos sem ser reconhecida como um corpo estranho na tentativa inicial dessas células em conter o parasito. Através da inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos ou por outras vias, o parasito impede a ativação da sua apoptose e permanece em seu interior sem se multiplicar. Quando esse neutrófilo infectado se torna apoptótico, o complexo *Leishmania*-neutrófilo é fagocitado por macrófagos que não têm seu mecanismo microbicida ativado, e assim a *Leishmania* continua o ciclo de infecção (AGA et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Estudos experimentais reportaram que a interação de macrófagos infectados por *Leishmania major* (VON STEBUT, 2007) e *Leishmania braziliensis* (NOVAIS et al., 2009) com neutrófilos induz a destruição do parasito pela produção de TNF e superóxidos.

Além de estarem envolvidos na tentativa inicial aparentemente contribuindo para contenção do parasito, a presença de neutrófilos infectados no início da doença pode

também favorecer o recrutamento de macrófagos para o local da lesão após a liberação de quimiocinas específicas (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Daboul (2010) avaliou a presença de neutrófilos em lesões tardias da forma localizada. Os dados encontrados sugeriram que a presença dessas células nesse estágio da doença se dá após a ruptura dos fagócitos repletos de amastigotas, com a liberação das mesmas no citoplasma reiniciando uma fase de reação aguda. Portanto, os neutrófilos desempenhariam um papel importante no processo de limitação da doença e estariam sendo recrutados progressivamente na fase inicial, mas também presentes nas lesões tardias (DABOUL, 2010). Esses dados explicam a correlação positiva entre lesões de leishmaniose localizada recente com o infiltrado inflamatório, e a não correlação com lesões tardias, já que essas células reaparecem com a ruptura dos macrófagos.

Assim, por serem células transitórias, com pouco tempo de vida, possuem importância no início da infecção e também participam da fase tardia, explica-se a pequena quantidade dessas células vista em todos os grupos de biópsias e porque não houve diferença da frequência de neutrófilos entre as quatro formas clínicas.

Os mecanismos pelos quais determinadas lesões evoluem ou não para a úlcera e/ou disseminam para outros locais na pele e mucosa ainda não estão bem esclarecidos. Avaliar os aspectos celulares no início da manifestação pode contribuir para entender a doença. Por isso, os achados deste estudo devem ser mais profundamente investigados, pois entender o perfil de células inflamatórias nas formas iniciais e tardias da leishmaniose cutânea localizada e em lesões primárias e secundárias à disseminação da *L. braziliensis* contribui para a caracterização da resposta imune do paciente (recrutamento celular, produção de citocinas e quimiocinas), e assim pode auxiliar estudos envolvidos no diagnóstico e medidas terapêuticas para a leishmaniose.

A análise histopatológica comparativa sobre formas de leishmanioses e tempo de lesões, assim como com o tamanho destas, revela semelhanças e mais raramente diferenças entre células presentes no tecido acometido. Estudos com novas técnicas que distingam os perfis das células inflamatórias, como análise por FACS em células da biópsia, por exemplo, podem contribuir para uma melhor avaliação deste perfil.

## 7 CONCLUSÕES

A inflamação presente nas lesões de LC é complexa e provavelmente variável de acordo com o tempo de evolução. Úlceras de LCL e LD apresentam maior inflamação tecidual e maior frequência de células T CD4+, T CD8+ e plasmócitos do que úlceras recentes e pápulas e, enquanto as células T CD4+, T CD8+, neutrófilos e macrófagos participam da inflamação na LCL recente e em lesões papulosas da LD, macrófagos são as principais células associadas com a intensidade da inflamação em lesões ulceradas tardias.

A comparação entre as úlceras permite concluir que há semelhança entre as duas formas clínicas ao se observar apenas o tecido, o que também ocorre na clínica, pois não há como prever se ocorrerá ou não a disseminação. Entre úlceras recentes e pápulas também há alguma semelhança histopatológica. Embora possa se considerar que essas duas formas clínicas se assemelham ao avaliar o tecido, elas representam momentos imunológicos distintos.

Estes resultados da análise da dinâmica da infiltração celular em lesões de leishmaniose cutânea em suas diversas formas clínicas contribuem com a caracterização da resposta inflamatória local e melhor entendimento sobre a patogênese da doença.



## REFERÊNCIAS

AFONSO, L. et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 2, p. 389-96, ago. 2008.

AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 2, p. 898-905, 15 jul. 2002.

ALMEIDA, R. P. et al. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 2, p. 178-84, fev. 1996.

ANTONELLI, L. R. V et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 101, n. 2, p. 226-30, 15 nov. 2005.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DERAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 8, n. 3, p. 104-5, mar. 1992.

AZULAY, R. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar. **Dermatologia Ibero Latino-Americana**, v. 2, p. 7-15, 1960.

BARRAL, A. et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 9, n. 4, p. 487-97, jul. 1987.

BELGE, K.-U. et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 7, p. 3536-42, 1 abr. 2002.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51-6, jan. 1991.

BOTTREL, R. L. et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble

Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 3232-9, maio. 2001.

BOUSOFFARA, T. 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. 1265-73, 1 abr. 2004.

BRODSKYN, C. I. et al. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 9, p. 4467-73, 1 nov. 1997.

BRYCESON, A. D. et al. Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. **Clinical and experimental immunology**, v. 7, n. 3, p. 301-41, set. 1970.

CAMPANELLI, A. P. et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 9, p. 1313-22, 1 maio. 2006.

CARTER, N. A.; ROSSER, E. C.; MAURI, C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 1, p. R32, jan. 2012.

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 135, n. 6, p. 4144-8, dez. 1985.

CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with Leishmania donovani chagasi. **The Journal of infectious diseases**, v. 165, n. 3, p. 535-40, mar. 1992.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315-25, abr. 1994.

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, n. 6, p. 319-23, dez. 1986.

COSTA, J. M. L. et al. Origin of patients with american tegumentar leishmaniasis recorded in the endemic areas of Tres Braços and Corte de Pedra, Bahia State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 21, n. 3, p. 145-9, 1988.

COUTINHO, S. G.; DA-CRUZ, A. M. et al. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell immune responses of immunocompetent and immunocompromised (AIDS) patients with American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 381-4, 1996.

COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P. et al. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Experimental parasitology**, v. 84, n. 2, p. 144-55, nov. 1996.

DA-CRUZ, A. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 225-9, 1996.

DA-CRUZ, A. M. et al. Leishmania-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614-8, jun. 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, set. 2005.

DABOUL, M. W. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. **Eastern Mediterranean health journal**, v. 16, n. 10, p. 1055-8, out. 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417-23, jan. 1996.

DIAZ, N. L. et al. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. **Experimental dermatology**, v. 11, n. 1, p. 34-41, fev. 2002.

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. 421, n. 3, p. 239-47, jan. 1992.

FARIA, D.; GOLLOB, K.; JR, J. B. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 2005.

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. 432-9, ago. 2009.

FOLLADOR, I. et al. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 497-503, out. 1999.

GEBHARDT, T. et al. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 216-9, 8 set. 2011.

GIANNOUKAKIS, N.; TRUCCO, M. A role for tolerogenic dendritic cell-induced B-regulatory cells in type 1 diabetes mellitus. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 19, n. 4, p. 279-87, ago. 2012.

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2 Pt 1, p. 257-72, fev. 1996.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-725, dez. 1989.

GUIMARÃES, L. H. et al. **Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar** *Gazeta Médica da Bahia* Salvador *Gazeta Médica da Bahia*, , 10 set. 2005. Disponível em: <<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/352>>. Acesso em: 30 jun. 2012.

JONES, T. C. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of infectious diseases**, v. 156, n. 1, p. 73-83, jul. 1987.

KHARAZMI, A. et al. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 65, n. 1-2, p. 105-8, jan. 1999.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-4, maio. 2003.

MACHADO, P.; KANITAKIS, J. et al. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **European journal of dermatology : EJD**, v. 12, n. 5, p. 449-51, 2002.

MACHADO, P.; ARAÚJO, C. et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 12, p. E69-73, 15 jun. 2002.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438-44, ago. 2011.

MAGALHÃES AV, MORAES MAP, RAICK AN, LLANOS-CUENTAS A, COSTA JML, CUBA CC, ET AL. Histopatologia da leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 5, p. 253-62, 1986.

MAGALHÃES, A. V. DE et al. Histopathology of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. I - Histological patterns and evolutive study of the lesions. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253-62, 1986a.

MAGALHÃES, A. V. DE et al. Histopathology of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*: 2. Tissue humoral response. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, n. 5, p. 293-9, 1986b.

MAGALHÃES, A. V.; CHIARINI, L. H.; RAICK, A. N. Histopathology of cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 24, n. 5, p. 268-76, 1982.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859-76, jan. 1986.

MCELHANEY, J. E. et al. The cell-mediated cytotoxic response to influenza vaccination using an assay for granzyme B activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 1759, n. 403, 1996.

MCSORLEY, S. et al. Immunology of murine leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 451-64, jan. 1996.

MEHREGAN, D. R.; MEHREGAN, A. H.; MEHREGAN, D. A. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 297-304, jan. 1999.

MILON, G.; DEL GIUDICE, G.; LOUIS, J. A. Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 11, n. 7, p. 244-7, jul. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Centro Nacional de Epidemiologia.**

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar americana. **Portal da Saúde**, 2007.

MORGADO, F. N. et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **The British journal of dermatology**, v. 158, n. 1, p. 50-8, jan. 2008.

MÜLLER, I. et al. Expansion of gamma interferon-producing CD8<sup>+</sup> T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2575-81, jun. 1994.

MÜLLER, K. et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 73-6, nov. 2001.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 12, p. 8088-98, 15 dez. 2009.

PALMA, G. I.; SARAVIA, N. G. In situ characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. **The American Journal of dermatopathology**, v. 19, n. 6, p. 585-90, dez. 1997.

PIRMEZ, C. et al. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 9, p. 3100-4, 1 nov. 1990.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 4, p. 1390-5, abr. 1993.

REED, S. G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. **Current opinion in immunology**, v. 5, n. 4, p. 524-31, ago. 1993.

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, jan. 1998.

RIDLEY, D. S. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 150-60, jan. 1979.

RIDLEY, D. S. et al. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 508-14, jan. 1980.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of pathology**, v. 141, n. 1, p. 83-96, set. 1983.

ROCHA, P. N. et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1731-4, nov. 1999.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 29, n. 12, p. 671-8, dez. 2007.

SALOMÓN, O. VECTORES DE LEISHMANIASIS EN LAS AMÉRICAS. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 3, p. 3-15, 2009.

SCHRIEFER, A.; SCHRIEFER, A.; GOES-NETO, A. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. **Infection and**, v. 72, n. 1, p. 508-514, 2004.

SCOTT, P. T-cell subsets and T-cell antigens in protective immunity against experimental leishmaniasis. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 155, p. 35-52, jan. 1990.

SCOTT, P.; FARRELL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chemical immunology**, v. 70, p. 60-80, jan. 1998.

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 (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 137, n. 3, p. 1017-21, 1 ago. 1986.

SILVA, T. M. C. **A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar humana.** [S.l.] UFBA, 1999.

SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK, J. et al. Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. **Scandinavian journal of immunology**, v. 67, n. 2, p. 152-9, fev. 2008.

SMITH, L. E.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D. G. The interaction between CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 499-505, 1 set. 1991.

SMYTH, M. J. et al. Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 1, p. 18-29, jul. 2001.

SOARES, G. et al. CD16<sup>+</sup> monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 1, p. 36-9, jan. 2006.

TAPIA, F. J. et al. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. **Experimental dermatology**, v. 3, n. 1, p. 17-22, fev. 1994.

TAPIA, F. J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M. A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology today**, v. 15, n. 4, p. 160-5, abr. 1994.

TORRES, O. A leishmaniose na Bahia. In: **Arquivos Brasileiros de Medicina.** [S.l.: s.n.]. p. 374-425.

TRAPANI, J. A. Protein family review Granzymes : a family of lymphocyte granule serine proteases. **Genome**, p. 1-7, 2001.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829-34, 15 dez. 2002.



UYEMURA, K. et al. CD4+ type 1 and CD8+ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor repertoires. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 151, n. 12, p. 7095-104, 15 dez. 1993.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6521-5, 1 dez. 2004.

VIEIRA, M. G. S. et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 979-83, out. 2002.

VON STEBUT, E. et al. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 210-5, 1 jan. 2003.

VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur J Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 115-22, 2007.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 433-50, jan. 1996.

WHO. Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. 2001.

YANG, H.-Z. et al. [The identification and advances of regulatory B cells]. **Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]**, v. 40, n. 4, p. 297-302, out. 2009.

YONEYAMA, K. A. G. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Paraná State, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 360-4, jun. 2007.

ZAWADA, A. M. et al. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. **Blood**, v. 118, n. 12, p. e50-61, 22 set. 2011.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation. **Immunology today**, v. 17, n. 9, p. 424-8, set. 1996.

## **ANEXOS**

**PLANILHAS DE AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS**

**Úlcera Clássica (LCL-T)**

<b>Paciente</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Epiderme</b>										
Crosta	+	0	0	0	0	+	0	0	0	+
Hiperkeratose	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+
Acanthose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degeneração Hidrópica	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+
Esgongiose	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+
Exocitose	+	0	0	0	0	+	+	0	+	+
<b>Derme</b>										
Edema	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
Tecido de Granulação	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+
Granuloma	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+
Células Gigantes	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0
Necrose lítica	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0

**Úlcera Recente (LCL-R)**

<b>Paciente</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Epiderme</b>										
Crosta	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0
Hiperkeratose	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+
Acanthose	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+
Degeneração Hidrópica	0	1	+	+	0	+	+	+	+	+
Esgongiose	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+
Exocitose	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+
<b>Derme</b>										
Edema	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tecido de Granulação	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+
Granuloma	0	0	+	+	0	0	0	+	0	0
Células Gigantes	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0
Necroselítica	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0

## Úlcera LD (LD-U)

Paciente	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<b>Epiderme</b>										
Crosta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperkeratose	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acantose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degeneração Hidrópica	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+
Espongiose	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+
Exocitose	+	0	+	0	+	0	0	0	+	+
<b>Derme</b>										
Edema	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tecido de Granulação	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Granuloma	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0
Células Gigantes	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0
Necrose	+	0	+	0	0	0	0	+	+	+

## Pápula LD (LD-P)

Paciente	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<b>Epiderme</b>										
Crosta	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+
Hiperkeratose	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+
Acantose	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+
Degeneração Hidrópica	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+
Espongiose	+	+	0	0	0	+	0	0	+	+
Exocitose	+	+	0	0	0	0	0	+	+	+
<b>Derme</b>										
Edema	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tecido de Granulação	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Granuloma	0	0	+	0	0	+	0	0	0	+
Células Gigantes	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+
Necrose	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa sobre a doença Leishmaniose. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, em caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. A sua participação não afetará, de forma alguma, o seu tratamento.

O projeto de pesquisa aqui referido tem o título de **“Diagnóstico e Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Humana”**.

### **Objetivo do estudo:**

Informamos que o (a) Sr. (a) não será beneficiado (a) diretamente por este estudo. Esclarecemos que os resultados do exame e as informações que o (a) Sr. (a) der ao médico contribuirão para implementarmos técnicas de diagnóstico e processo de cura da Leishmaniose Cutânea Humana.

### **Esclarecimentos:**

Caso o (a) Sr. (a) participe desse estudo, suas informações pessoais serão mantidas em segredo e ninguém saberá sobre elas a não ser o pesquisador responsável que se responsabiliza pelo sigilo e confidencialidade das informações.

O (a) Sr. (a) pode solicitar esclarecimentos e tirar dúvidas a qualquer momento com o pesquisador responsável pelo estudo, Dr. Sérgio Arruda (telefone para contato: 3176-2310 ou 3176-2232) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador – Ba, CEP: 40296-710.

Favor assinar e preencher abaixo se estiver de acordo com o convite.

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, concordo em participar deste projeto de pesquisa a ser desenvolvido pelo Dr. Sérgio Arruda no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP/CPqGM/FIOCRUZ), com o apoio do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (SIM-HUPES). Participarei por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa.

### **Procedimentos:**

Para isso, uma biópsia de pele (punch de 4mm) será realizada no local da lesão para o diagnóstico e pesquisa da doença. O procedimento de retirada da biópsia será realizado depois da aplicação de anestesia local e superficial, aplicada com uso de seringa. A picada da seringa deve causar um leve e rápido desconforto. Uma vez que o fragmento de pele é retirado, o local da lesão será devidamente coberto com um curativo. A anestesia não vai mais fazer efeito em poucas horas, depois de todo o procedimento. O local de onde foi retirado o fragmento de pele vai cicatrizar naturalmente dentro de poucos dias. Durante esse processo de cicatrização é natural que o paciente sinta algum desconforto.

Uma vez concordando com o estudo, a biópsia retirada nesse procedimento deverá ser armazenada e poderá ser utilizada.

**Saída ou desistência do estudo:**

Está assegurada a liberdade do paciente de recusar ou de se retirar do estudo. O consentimento do paciente também assegura a comunicação junto aos pesquisadores para esclarecimentos e conhecimento dos resultados dos exames e condições de acompanhamento, bem como orientação e tratamento nos ambulatórios específicos.

Estou ciente e fui esclarecido (a) de que as informações obtidas estão submetidas às normas éticas sobre pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, resolução n 196/96 e complementares. Fui informado que todas as informações serão mantidas de forma anônima e que posso me retirar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para meu acompanhamento e da minha família, bem como não sofrerei quaisquer sanções ou constrangimentos.

Eu li, recebi uma cópia deste termo e ouvi os esclarecimentos orais sobre as minhas dúvidas.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do (a) participante \_\_\_\_\_



Impressão datiloscópica (em caso de não saber assinar o nome)

Assinatura do médico (a) entrevistador (a) \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

**ARTIGO SUBMETIDO**

**Running title:** *CD8+ T cells and cytotoxicity in CL*

**CD8+ T cells *in situ* in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis**

Marina Loyola Dantas,<sup>1</sup> Juliana Menezes Gomes,<sup>1</sup> Lucas P. Carvalho,<sup>2,3</sup> Sara Timóteo Passos,<sup>2,3</sup> Adriano Q. Silva,<sup>2,3</sup> Luiz Henrique Guimarães,<sup>2,3</sup> Paulo R. L. Machado,<sup>2,3</sup> Edgar. M. Carvalho,<sup>2,3</sup> & Sérgio Arruda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil, <sup>2</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brazil, <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (CNPq/INCT), Salvador, Bahia, Brazil.

Corresponding author: Marina Loyola Dantas, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, CEP 40296-710, Salvador, Bahia, Brazil. (e-mail: [marinaloyoladantas@gmail.com](mailto:marinaloyoladantas@gmail.com))

## Abstract

*Leishmania braziliensis* infection induces a large spectrum of lesions clinically manifested as nodules or papules that progress to ulcers. It is already known the predomination of T helper cells in lesions, but is also reported cytotoxic T cells between them and is not well known their role in leishmaniasis immunopathogenesis. This study investigates the amount of CD8<sup>+</sup> and granzyme B<sup>+</sup> cells in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis (CL). Forty biopsies from early and classic CL lesions and disseminated leishmaniasis (papule and ulcer) were characterized. Inflamed area per fragment was calculated and CD8 and Granzyme B expression in infiltrate were quantified by counting those cells in 15 fields. Their localization were graduated subjectively. Inflammation was particularly higher in ulcers from classic CL and disseminated leishmaniasis. CD8 expression was increased in late ulcerated lesions as compared to recent lesions. CD8<sup>+</sup> cells were also correlated with time of lesion. Papules presented higher frequency of granzyme B<sup>+</sup> cells than E-CL, although similar with late and DL ulcers. Mostly CD8<sup>+</sup> cells are at papilar dermis. Taken together, CD8<sup>+</sup> T cells and Granzyme B<sup>+</sup> are present in inflammatory infiltrate of CL and DL and may participate in the control of *Leishmania* infection.

Key words: leishmaniasis – cytotoxicity – inflammation – cutaneous - CD8 – human

Financial support: National Institutes of Health (NIH) grant AI-30639 and INCT.

## INTRODUCTION

Leishmaniasis is a disease caused by protozoan of the genus *Leishmania* and affects millions of individuals in many regions of the world. *Leishmania braziliensis* is the most prevalent species in Brazil and its infection leads to lesions in skin or mucosa leading to cutaneous leishmaniasis (CL) or mucosal leishmaniasis (ML) (Schriefer et al. 2004, Faria et al. 2009).

CL lesions progress from small papules in presence or absence of lymphadenopathy into one or more skin ulcers. The localized skin ulceration is characterized by an chronic inflammatory response composed by lymphocytes, plasma cells and macrophages,



eventually with granulomatous reaction and necrosis (Magalhães et al. 1986, Jones et al. 1987).

The tissue response in initial manifestation such as early ulcers ( $\leq 20$  days of lesion appearance) and papules from disseminated leishmaniasis (DL) is not well studied. DL is an emerging form of leishmaniasis and corresponds to 1.9% of all CL cases; it is characterized by the appearance of multiple pleomorphic lesions in more than two noncontiguous areas of the body starting from a primary ulcer (Jones et al. 1987, Turetz et al. 2002, Costa et al. 1986, Carvalho et al. 1994). The mechanisms involved in DL have not been elucidated yet. It is suggested that parasite, host, and environmental factors may contribute to dissemination of the parasite through the body (Turetz et al. 2002).

CD8<sup>+</sup> T cells are essential in the response against viruses and malignant cells, but few studies reports the role of these cells in defense against *Leishmania* parasites (Faria et al. 2009, Machado et al. 2002, Ruiz & Becker 2007). It is already shown presence of CD4<sup>+</sup> T cells within inflammatory infiltrate in leishmaniasis lesions, but is was reported cytotoxic T cells in the lesion of CL patients (Barral et al. 1987, Machado et al. 2002).

The role of CD8<sup>+</sup> T cells remains unclear and contradictory in *Leishmania* infection; these cells contribute to *Leishmania* death or to the immunopathology. It was already reported the significant proportion of CD8<sup>+</sup> cells in human leishmaniasis biopsy (Campanelli et al. 2006). Lymphocytes CD8<sup>+</sup> could participate in parasite growth control through different mechanisms. Those cells have been associated with cure after treatment through IFN- $\gamma$  production and can also interact directly with *Leishmania* infected macrophages killing them by cytotoxic activity (Da-Cruz et al. 1994, Coutinho et al. 1996, Smith et al. 1991). Interaction between granzyme granules and target cell brings cell death typified by cytosolic and nuclear-apoptotic changes (Smyth et al. 2001). Granzyme B is the most powerful pro-apoptotic member of the granzyme family (Trapani 2001). Thus, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes expressing granzyme appear to be important in the immunologic mechanisms in leishmaniasis. Characterize the cell composition and its localization in all spectrum of leishmaniasis lesion, including in early events in the immune response may help to elucidate the mechanism of tissue damage.

In the present study, we investigate the proportions of CD8<sup>+</sup> T cells and Granzyme B<sup>+</sup> cells in primary and secondary lesions from DL comparing with early and late CL to better understand their role in the pathogenesis of the disease.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

Thirty patients from Corte de Pedra, an area of *Leishmania braziliensis* transmission, in the state of Bahia, Brazil, were enrolled in this study. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis was initially performed by a typical lesion and a positive *Leishmania* skin test and confirmed by parasite isolation or identification of amastigotes forms by histopathological analysis. Disseminated leishmaniasis was clinically diagnosed by the presence of multiple (more than 10 lesions in at least two different areas of the body) acneiforms, papular or ulcerated lesions. Confirmation of the diagnosis was performed as established above for CL. Patients were not under treatment at the moment of biopsies collection. According to duration of lesions subjects were classified as late cutaneous lesions (L-CL) patients with more than 20 days of illness and early cutaneous lesions (E-CL) patients with lesions with 20 days or less. Patients with disseminated leishmaniasis underwent two biopsies each one: primary ulcer of DL (U-DL) and secondary papular lesions from DL (P-DL). Each group of patients consisted of 10 subjects with total of forty biopsies. None of patients had been previously diagnosed with or treated for leishmaniasis.

Informed consent was obtained before the collection of biopsy and all patients received treatment despite their enrolment in this study. The study was approved by the Human Ethics Committee of the Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ protocol number 321-2009.

### **Biopsies obtention**

Biopsies were performed under local anesthesia using a 4 mm punch. Specimens were collected from the border of the ulcer and, in case of secondary lesion in DL, from papules. Fragments were fixed in 10% formaldehyde and the slides were performed at histothechnologic laboratory at FIOCRUZ. The tissue samples were dehydrated and embedded into paraffin blocks and cryosections (4 to 6  $\mu\text{m}$ ) were placed in silane-precoated slides.

### **Haematoxylin-eosin and immunohistochemistry staining**

Sections obtained from paraffin were routinely deparaffinized and rehydrated. Slides were stained with HE to histological diagnostic, to inflammatory infiltrate analysis and to perform immunohistochemistry (IHC) reactions.

IHC reactions followed blocking peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide for five minutes. The slides were incubated for 30 minutes with anti-CD8 antibody (Spring, USA) with dilution of 1:100 at 25 °C and overnight with anti-Granzyme B (Cell Marque, USA), with dilution of 1:100 at 4 °C. The immunostaining was performed using the Peroxidase Mouse & Rabbit Kit - HRP (DBS KP500, US) according to the manufactures recommendations. All slides were counter-stained with Harris hematoxylin, dehydrated and mounted with Canadian balsam and glass covers lips.

### **Morphometric analysis**

Images from all HE stained sections were acquired using an optical microscope coupled to a digital color video camera at 400x magnification. Inflamed area was calculated through measurement of total fragment and inflammatory infiltrate area. CD8 and Granzyme B expression in infiltrate were quantified by counting T CD8+ and Granzyme B+ cells presents in 15 fields per fragment. The frequency of CD8+ and Granzyme B+ cells at papilar and reticular dermis was graduated subjectively where values indicate frequency of positive cells immunostained: 0, absent; 1, low frequency; 2, medium frequency; 3, high frequency. ImageJ software (National Institute of Mental Health, USA) was used to measure areas and count cells.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 program. Spearman correlations analysis and Kruskal-Wallis non-parametric test were performed. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

The clinical profile of the thirty patients is shown in Table I and the clinical characteristic of different lesions are shown in figure 1. Twenty-one men and nine women were enrolled with the mean age  $\pm$  standard deviation (SD) of  $31.52 \pm 16.4$  years (age ranges from 9 to

76 years). Duration of lesion ranged from 25 to 60 days in L-CL ( $34 \pm 10$  days), 15 to 20 days in E-CL ( $17 \pm 2$  days), 20 to 90 days in U-DL ( $43 \pm 20$  days) and 8 to 90 days in P-DL ( $30 \pm 25$  days). Parasites were documented by histology more frequently in E-CL (70%) as well as DL patients (70%) or in the papular or ulcers. Lesion size varied from 56 to 750 mm<sup>2</sup> in L-CL, 9 to 200 mm<sup>2</sup> in E-CL and 56 to 460 mm<sup>2</sup> in U-DL. There was a direct correlation between duration of lesion with the lesion size ( $p=0.0385$ ) (Fig. 2A). P-DL lesions were not measured and the median number of lesions for the 10 patients with DL was 30 (range, 2-200 lesions) for papular lesions and 3 (range, 1-15) for ulcerated lesions. CL patients presented only 1 lesion (range, 1-2).

Histopathological examination of biopsies from ulcerated or papular lesions revealed chronic inflammatory reaction biopsies sections from all clinical forms. In all stage of CL, inflammation was associated with presence of lymphocytes, plasmocytes, and macrophages. Other general histopathological patterns were also found in biopsies, as perivascular and papilar edema (45%), necrosis (43%), granuloma (43%), giant cell (30%), rare neutrophils (18%) and incontinence pigmentary (28%). Amastigotes of *Leishmania* were detected directly in HE stained slides in 20 biopsies (not shown).

Inflammatory infiltrate percentage varied from 2 to 56% in its extension analyzing all group. Comparing between groups, particularly higher percentage of inflammation was present in L-CL (range 21-52%) and U-DL (range 20-56%) patients. P-DL lesions had the lowest inflammation (range 6-38%) (Fig. 3A). Thus, primary and secondary lesions from patient with DL had different degree of inflammation.

Analysis of frequencies of CD8<sup>+</sup> and Granzyme B<sup>+</sup> cells was performed using the software that enables counting cells manually (ImageJ) (Fig. 4A and 4B).

The mean of CD8 expression, similarly to the infiltrate extension, was increased in late ulcerated lesions as compared to recent lesions (papules and < 20 days of lesion) that had low absolute numbers of CD8<sup>+</sup> lymphocytes (Fig. 3B).

To determine the contribution of CD8-positive cells in inflammatory infiltrate, correlation with these cells and inflammation percentage was analyzed. A positive correlation between CD8<sup>+</sup> cells and the intensity of inflammation was observed when comparing all groups together. Analyzing groups separately, only E-CL and P-DL lesions presented correlation between TCD8<sup>+</sup> quantity and greater inflammation (not shown). Cells expressing CD8 were also positively correlated with the time of lesion ( $p=0.0201$ ) (Fig. 2B).

Granzyme B frequency varied between those. The papular lesions from DL presented higher frequency of Granzyme B<sup>+</sup> cells than E-CL ( $p=0.0302$ ), although similar with late

and DL ulcers (Fig. 3C). Interestingly, only E-CL lesions had positive correlation between granzyme B<sup>+</sup> cells and inflammatory infiltrate ( $p=0.0216$ ). Analyzing ulcers was revealed that, the higher the inflammation, the lower the amount of Granzyme B<sup>+</sup> cells. The same occurs comparing cells expressing Granzyme B and time of lesions, differing from CD8<sup>+</sup> cells. However, both the CD8<sup>+</sup> and Granzyme B<sup>+</sup> frequencies in lesions did not correlate with lesion area.

The localization of cells expressing CD8<sup>+</sup> and Granzyme B in the skin revealed that mostly CD8<sup>+</sup> cells are at papular dermis, next to the epidermis (Fig. 4C). Although not analyzing their co-localization, the data shows that the distribution of both cells in biopsy occurs in a patterns very similar, however with less frequency of Granzyme B<sup>+</sup> cells. The majority of L-CL lesions (6/10) and U-DL lesions (6/10) was graduated with grade 3 for CD8<sup>+</sup> frequency in papular dermis. Between recent lesions (E-CL and P-DL) intensity of stained cells had greater variation of grades, but majority of biopsies presented higher number of cells into papular dermis (Table II; Fig. 5). Granzyme B<sup>+</sup> cells frequency was classified as grade 2 in majority of all groups. Only 4 biopsies in CD8<sup>+</sup> T cells analysis and 2 cases in Granzyme B<sup>+</sup> had greater grade in reticular dermis than papular dermis. Cells may also appear in a homogenous distribution (10 to 40% of cases per group).

The histopathological analysis of biopsies showed the presence of spongiosis. Aggregation of both cells in papular dermis, sometimes also seen in the epidermis, seems to lead to injury in basal layer and may contribute to ulcer formation.

## **DISCUSSION**

CL is the most frequent form of leishmaniasis due to *L. braziliensis* infection. It is clinically characterized by the presence of a single or multiple ulcers with a well-delimited and raised border that can persist for months and heal spontaneously. DL presents initially with an ulcer and rapidly disseminate throughout the body with multiples acneiform and papular secondary lesions (Turetz et al. 2002).

To better understand the role of cytotoxic T cells in the pathogenesis of DL we evaluated *in situ* the presence of CD8-positive lymphocytes and Granzyme B-positive in ulcer and papule lesions of patients with and ulcers of CL patients with less than 20 or more than 20 days. Chronic inflammation was observed in all four spectrums of lesions. However, inflammatory infiltrate measured in L-CL and DL-U was more exuberant than in E-CL and DL-P, although statistical analysis shows no significance; this is compatible with a lesion progression. These results are in agreement with other study showing that higher intensity

of inflammation is seen in L-CL than ulcers from CL in a very initial form (not ulcerated yet) (Faria et al. 2009). Ulcerated and papular lesions that regress from the same patients with DL presented different degrees of inflammation.

Although previous study demonstrated a predomination of T cells with helper phenotype over cytotoxicity phenotype in CL ulcers (Barral et al. 1987) a recent observation demonstrated increased frequency of CD8 T cells over CD4 T cells in ulcerated lesions and a correlation between the frequency of CD8 T cells and CD8 T cells expressing granzyme with the intensity of the inflammation signifying a role of these cells in the pathogenesis of CL (Faria et al. 2005, Faria et al. 2009, Da-Cruz et al. 2005). However CD8<sup>+</sup> T cell may also play a regulatory role. Vieira *et al.* showed that both localized CL and papular DL lesions presented higher frequency of CD8<sup>+</sup> T cells than CD4<sup>+</sup> T cells in inflammatory infiltrate, suggesting that CD8<sup>+</sup> cells participate directly in the immune response against parasite, principally by IFN- $\gamma$  production that induces macrophage activation (Vieira et al. 2002). However, CD8<sup>+</sup> T cells may produce high levels of IL-10 that is necessary to counterbalance an exacerbated polarized response, limiting tissue damage (Faria et al. 2009, Rocha et al. 1999). In the present study emphasis was given in the evaluation of the cytotoxic response present in inflammatory infiltrate. For that, granzyme-mediated killing by Perforin-Granzyme B was quantified as indicative of cytotoxicity. All biopsies presented Granzyme B<sup>+</sup> cells in inflammatory infiltrate.

Although statistical analysis did not show significance, lesions with less than 20 days presented less quantity of cells expressing Granzyme B comparing late ulcers and ulcers from DL. This result agrees with previous study that shown Granzyme A expression (Faria et al. 2009). Interestingly, papular lesions from DL shown higher number of Granzyme B<sup>+</sup> cells than beginning ulcers.

Furthermore, was already reported the association of DL with mucosal disease due to rapid dissemination of lesions through the body and mucosa (Turetz et al. 2002). Maybe the bigger amount of Granzyme B<sup>+</sup> cells in papular lesions may contribute for this pathology. No significant association was found between Granzyme B expression and severity of disease. This result agrees with Boussoffara et al. (2004) study, where levels of Granzyme B did not correlate in terms of number and lesion size (Boussoffara et al. 2004). However, Granzyme B seems to participate in lesion progression in E-CL, considering the increase of its expression together inflammation percentage.

Lymphocytes CD8<sup>+</sup> and Granzyme B<sup>+</sup> cells were more frequent at papular dermis and sometimes observed at epidermis. Recently, it was suggested that movement from T cells

through dermis and epidermis and their permanence in one layer or other are correlated with effector or memory phase from immune response (Gebhardt et al. 2011). This suggests other mechanism to those cells, but together with cytotoxic activity, both may contribute to leishmaniasis immunopathology.

Taken together, CD8<sup>+</sup> T cells and Granzyme B<sup>+</sup> are present in inflammatory infiltrate of CL and DL and may participate in the control of *Leishmania* infection. The cytotoxic function mediated by granules expression suggested for those cells and their specific localization may elucidate the mechanism of ulceration. Differences in the *in situ* immune reactions in these two clinical forms and four lesion spectrum of human leishmaniasis may elucidate the role of CD8<sup>+</sup> cells and cytotoxic activity in the pathogenesis of this disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Mr. Lago, Ms. Neuza and Ms. Renda from Corte de Pedra Health Service and to technicians of the histotechnology service of CPqGM-FIOCRUZ.

## REFERENCES

- Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Netto M, Costa JM, Badaro R, Rocha H, Johnson WD 1987. Evaluation of T-cell Subsets in the Lesion Infiltrates of Human Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunology* 9: 487–497.
- Bousoffara T, Louzir H, Salah AB, Dellagi K 2004. Analysis of Granzyme B Activity as a Surrogate Marker of *Leishmania*-specific Cell-mediated Cytotoxicity in Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 1265–1273.
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani K, Pereira MSF, Mortara R, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, barral A, Silva JS 2006. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. *The Journal of Infectious Diseases* 193: 1313–1322.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P 1994. Clinical and Immunopathological Aspects of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315–325.
- Costa, J M, P D Marsden, E A Llanos-Cuentas, E M Netto, E M Carvalho, A Barral, A C Rosa, C C Cuba, A V Magalhães, and A C Barreto 1986. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in a Field Clinic in Bahia, Brazil: a Report of Eight Cases. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 319–323.

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho L, Soong L, McMahon-Pratt D 1996. T-cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania Pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania Braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure. *Experimental Parasitology* 84:144–155.

Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG 2005. Flow Cytometric Analysis of Cellular Infiltrate from American Tegumentary Leishmaniasis Lesions. *The British Journal of Dermatology* 153: 537–543.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG 1994. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Cure of Human Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 62: 2614–2618.

Faria DR, Souza PE, Durães 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 Immunology* 31: 432–439.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa Jr J 2005. Decreased in Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. *Infection And* 73: 7853–7859.

Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, Mackay LK, Brooks AG, Heath WR, Carbone FR, Mueller SN 2011. Different Patterns of Peripheral Migration by Memory CD4+ and CD8+ T Cells. *Nature* 477: 216–219.

Jones TC, Johnson WD, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF 1987. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania Braziliensis* *Braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases* 156: 73–83.

Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM 2002. Evidence of in Situ Cytotoxicity in American Cutaneous Leishmaniasis. *European Journal of Dermatology : EJD* 12: 449–451.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Cuentas AL, Costa JML, Cuba CAC, Marsden PD 1986. Histopathology of Tegumentary Leishmaniasis Caused by *Leishmania Braziliensis* *Braziliensis*: 2. Tissue Humoral Response. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 28: 293–299.

Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, Jesus R, Filho DC, Filho C, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM 1999. Down-regulation of Th1 Type of Response in Early Human American Cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 180: 1731–1734.

Ruiz JH & Becker I 2007. CD8 Cytotoxic T Cells in Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunology* 29: 671–678.

Schriefer A, Schriefer ALF, Goes-Neto A 2004. Multiclonal *Leishmania Braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infection And* 72: 508–514.



Smith LE, Rodrigues M, Russell DG 1991. The Interaction Between CD8+ Cytotoxic T Cells and Leishmania-infected Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 174: 499–505.

Smyth MJ, Kelly JM, Sutton VR, Davis JE, Browne KA, Sayers TJ, Trapani JA 2001. Unlocking the Secrets of Cytotoxic Granule Proteins. *Journal of Leukocyte Biology* 70: 18–29.

Trapani, JA 2001. Protein Family Review Granzymes : a Family of Lymphocyte Granule Serine Proteases. *Genome Biol* 2: 1–7.

Turetz,ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Carvalho EM 2002. Disseminated Leishmaniasis: a New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1829–1834.

Vieira MGS, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA, Barral-Netto M, Barral A 2002. B-cell Infiltration and Frequency of Cytokine Producing Cells Differ Between Localized and Disseminated Human Cutaneous Leishmaniases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 979–983.

**TABLE I.** Clinical characteristics of cutaneous leishmaniasis patients.

Patient	Age/gender	Clinical form	Duration of lesions (days)	<i>Leishmania</i> infection detection in HE	Location of ulcerated lesion	Ulcer area (mm x mm)	DTH (mm x mm)
1	22/M	L-CL	60	0	IM	30 x 20	15 x 15
2	19/M	L-CL	30	0	IM	30 x 20	8 x 7
3	42/F	L-CL	30	+	IM	30 x 15	14 x 14
4	18/M	L-CL	45	+	IM	30 x 25	20 x 22
5	19/M	L-CL	30	0	IM	10 x 8	19 x 16
6	39/F	L-CL	25	+	IM	20 x 15	15 x 16
7	9/M	L-CL	30	+	IM	10 x 10	14 x 10
8	27/M	L-CL	30	+	Trunk	20 x 15	16 x 11
9	27/M	L-CL	30	0	IL	20 x 20	12 x 10
10	37/M	L-CL	30	0	IL	ND	Negative
11	15/M	E-CL	20	0	SL	6 x 9	30 x 30
12	18/M	E-CL	15	0	SL	4 x 4	10 x 12
13	9/M	E-CL	15	+	SL	3 x 3	Negative
14	36/F	E-CL	15	+	IL	8 x 5	20 x 14
15	26/F	E-CL	15	+	SL	3 x 3	14 x 13
16	25/M	E-CL	15	+	Trunk	6 x 5	9 x 9
17	16/F	E-CL	20	+	IL	20 x 10	19 x 16
18	37/M	E-CL	20	+	IL	16 x 9	21 x 19
19	16/F	E-CL	20	+	IL	4 x 8	Negative
20	23/M	E-CL	20	0	IL	8 x 6	21 x 15
21	50/F	DL (U/P)	60/15	+ /0	IL	7 x 8	16 x 16
22	53/M	DL (U/P)	60/30	+/+	Face	20 x 15	Negative
23	37/M	DL (U/P)	30/15	+/+	IM	ND	15 x 12
24	37/M	DL (U/P)	30/10	0/+	SM	10 x 9	10 x 9
25	59/F	DL (U/P)	30/30	0/0	SM	20 x 23	5 x 5
26	60/M	DL (U/P)	30/60	+ /0	IM	10 x 10	ND
27	17/M	DL (U/P)	90/15	0/0	SM	10 x 15	22 x 18
28	37/F	DL (U/P)	30/30	0/0	SM	10 x 11	18 x 15
29	30/M	DL (U/P)	30/90	0/+	IM	10 x 10	ND
30	76/M	DL (U/P)	38/8	+ /0	IM	10 x 30	10 x 10

L-CL, late cutaneous leishmaniasis; E-CL, early cutaneous leishmaniasis; DL, disseminated leishmaniasis; U, ulcer; P, papule; +: presence; 0: absence; IM, inferior limb; SM, superior limb; ND: not determined. Papules were not measured.

**TABLE II.** Number of cases with higher frequency of immunostained cells in papilar dermis or reticular dermis. Total of 10 patients per group. Ten biopsies from CD8+ T cells analysis and twelve from granzyme B+ cells analysis had homogenous distribution of cells.  $p= 0.0105$  between both groups.

	T CD8+		Granzyme B+	
	Papilar dermis	Reticular dermis	Papilar dermis	Reticular dermis
<b>L-CL</b>	6	0	6	1
<b>E-CL</b>	7	2	7	0
<b>U-DL</b>	6	0	7	1
<b>P-DL</b>	7	2	6	0

## Legends and figures

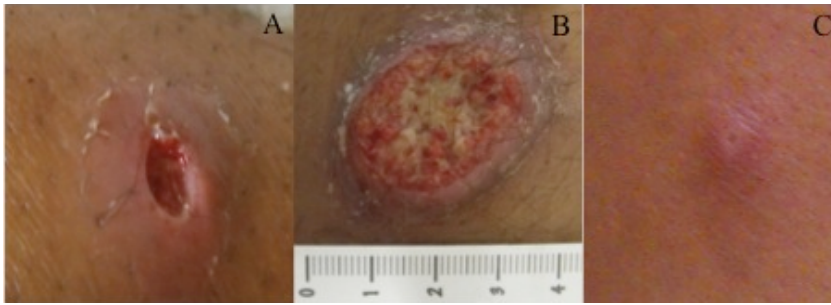


Fig. 1: Lesions caused by different clinical forms of cutaneous leishmaniasis. (A) E-CL lesion. (B) L-CL lesion. (C) Papule lesion, typical non-ulcerated lesion from DL.

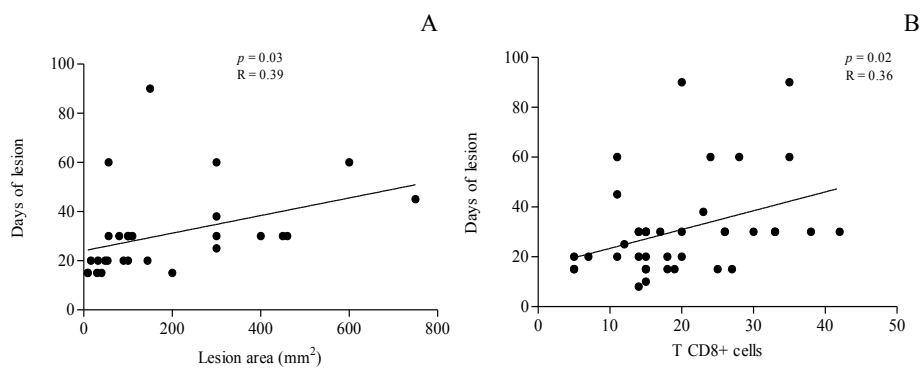


Fig. 2: (A) Linear correlations of Pearson between duration of the lesion (days) and lesion area ( $\text{mm}^2$ ) ( $p=0.0385$ ). (B) Linear correlations of Pearson between days of lesion and CD8+ T cells.

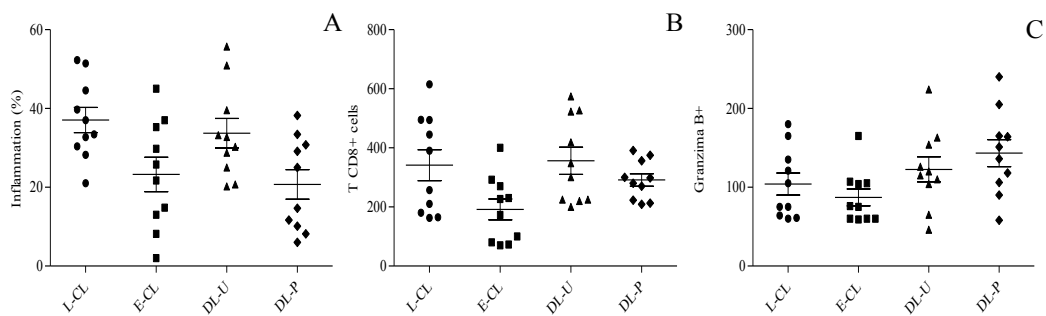


Fig. 3: (A) Comparison inflammation percentage in different lesions from cutaneous leishmaniasis. (B) Comparison of numbers of CD8+ T cells in different lesions from cutaneous leishmaniasis. (C) Comparison of numbers of Granzyme B+ cells in different lesions from cutaneous leishmaniasis.

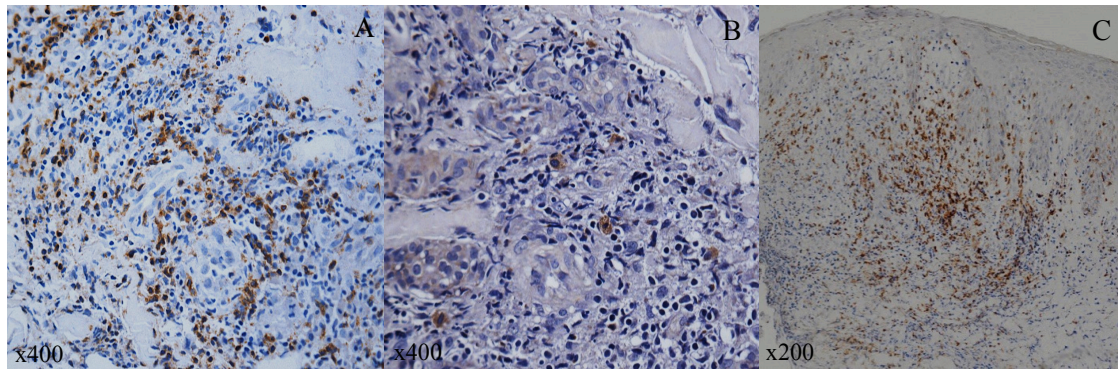


Fig. 4: (A) Immunostained CD8+ T cells (x400). (B) Immunostained Granzyme B+ cells (x400). (C) Lymphocytes CD8+ more frequent at papillar dermis and sometimes observed at epidermis (x200).

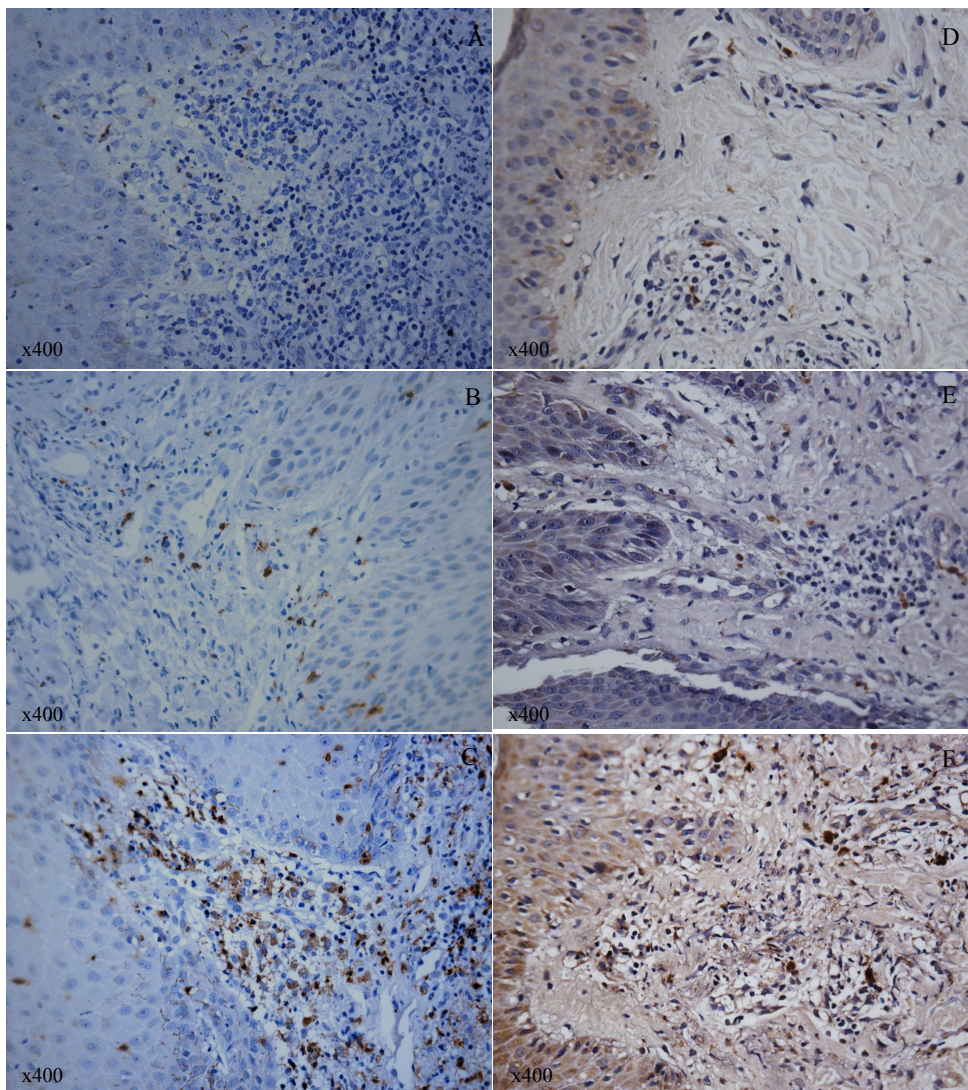


Fig. 5: Frequency of CD8+ cells at papillar dermis: (A) Biopsy graduated as low frequency (x400). (B) Biopsy graduated as medium frequency (x400). (C) Biopsy graduated as high frequency (x400). Frequency of Granzyme B+ cells at papillar dermis: (D) Biopsy graduated as low frequency (x400). (E) Biopsy graduated as medium frequency (x400). (F) Biopsy graduated as high frequency (x400).