

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz



Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
Laboratório Avançado de Saúde Pública

## **Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

## **IMUNOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA**

**Correlação entre extensão da inflamação, células e vasos em lesões fechadas  
causadas por *Leishmania Viannia braziliensis* na forma Disseminada (LD).**

**DAYANA SANTOS MENDES**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2011**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MUNIZ**

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

**IMUNOPATOGENESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
HUMANA**

**Correlação entre extensão da inflamação, células e vasos em lesões fechadas  
causadas por *Leishmania Viannia braziliensis* na forma Disseminada (LD).**

**DAYANA SANTOS MENDES**

Professor Orientador: Dr. Sérgio Arruda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador - Bahia - Brasil  
2011**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

Mendes, Dayana Santos  
M538i Imunopatogênese da leishmaniose cutânea humana. Correlação entre extensão da inflamação, células e vasos em lesões fechadas causadas por *leishmania viannia braziliensis* na forma disseminada (ld). [manuscrito] / Dayana Santos Mendes.\_ 2012.  
69f.:ils.

Datilografado (fotocópia).

Mestrado (dissertação) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Arruda, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

1. Leishmaniose Disseminada. 2. Histopatologia. 3. Imunohistoquímica. 4. Inflamação. I. Título.

CDU 616.993.161

Dedico esta Dissertação aos meus pais, Gerci dos Santos Mendes e Jorge Mendes (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente ao Professor Dr. Sérgio Arruda pela sua orientação, exemplo, amizade e incentivo com as minhas pretensões intelectuais e profissionais.

Ao Professor Dr. Marco Brotto pelo seu grande incentivo profissional mesmo distante do Brasil.

Ao Professor Dr. Edgar Marcelino de Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa com o apoio de toda sua equipe e pacientes.

Ao Dr. Washington C. dos Santos por sua colaboração e sugestões científicas.

À Ana Maria Carvalho e Cristina pelo incentivo e por toda inestimável ajuda com as técnicas de imunohistoquímica.

A todos da Unidade de Microscopia Eletrônica, especialmente a Cláudio pela ajuda nas mensurações morfológicas e uso do software image proplus.

À Marina Loyola Dantas, pelo equilíbrio, dedicação, companheirismo, exemplo e colaboração imprescindível para realização deste trabalho.

Aqueles que participaram direta ou indiretamente do dia a dia deste trabalho, em especial Adriano Queiroz, Antonio Muniz, Filipe Rego, Iukary Takenami, Juliana Gomes, Luana Leandro Gois, Thessika Hialla, Tonya Duarte, bem como todos os professores e funcionários do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz e do Posto de Saúde de Corte de Pedra.

Agradeço aos meus amigos Fernanda Queiroz, Flávia Miranda, Josie de Paula e Rafael Nunes, pelo suporte e atenção em todos os momentos em que precisei.

E finalmente, agradeço imensamente a todos os pacientes que participaram desta pesquisa.

## RESUMO

**Introdução:** *Leishmania (Viannia) braziliensis* causa várias formas de doença clínica cutânea, entre elas a forma cutânea disseminada (LD) com uma úlcera cutânea e lesões secundárias disseminadas por mais de duas regiões do corpo. Esta forma além da úlcera inicial apresenta manifestação clínica de múltiplas pápulas e lesões não ulceradas. Neste estudo, descrevemos a histopatologia das lesões não ulceradas da LD, correlacionando-a com a extensão da área inflamada com células CD4, CD20, CD68, CD31 e células de fator de von Willebrand (vW).

**Metodologia:** Dezoito biópsias de lesões de pacientes diagnosticados com LD por critérios clínicos, teste cutâneo de Montenegro positivo e cultivo positivo para *L. braziliensis* dos aspirados locais das lesões. A análise histopatológica foi feita a partir dos fragmentos de tecidos corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A quantificação da área inflamada e células positivas para CD4, CD20, CD68, CD31 e vW foi avaliada com o auxílio do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

**Resultados:** Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e formação de granulomas são achados comuns nas lesões papulares causadas por *L. braziliensis*. A extensão da área de inflamação variou de 3% a 73%. Houve uma correlação linear significativa entre a extensão da inflamação e a presença de vasos vW+. As células mais frequentes no infiltrado inflamatório foram os macrófagos CD68+, seguido por células B CD20+ e células T CD4+. Houve uma correlação linear significativa entre células CD4+ e CD20+ e a área inflamada. Amastigotas foram detectadas por HE e imunohistoquímica em nove biópsias, todos os dezoito aspirados foram positivos para *L. (Viannia) braziliensis* nos cultivos *in vitro*.

**Conclusão:** Pela análise histopatológica e imunohistoquímica em lesões fechadas causadas por *L. braziliensis*, observamos a presença de inflamação crônica variável qualitativa e quantitativamente. Com a expansão da área de inflamação, células CD4+ aumentam proporcionalmente ao número de vasos encontrados e células CD20+.

**Palavras-chave:** Leishmaniose disseminada, histopatologia, imunohistoquímica, inflamação.

## ABSTRACT

**Introduction:** Skin infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* results in cutaneous and mucosal leishmaniasis. In between this clinical spectrum, disseminated leishmaniasis (DL) primary ulcer and/or ulcerated secondary lesions differs from other presentations by the clinical manifestation of multiple papules and non-ulcerated lesions. In this study, we describe the histopathology of DL non-ulcerated lesions correlating them with the amount of CD4, CD20, CD68, CD31 cells, and von Willebrand factor (vW) and with the amount of inflamed area which characterize immune inflammatory aspects.

**Methods:** Eighteen biopsies from patients diagnosed by clinical criteria, positive skin tests, and fine needle aspirations *in vitro* cultivation were analyzed. Histopathological properties were determined by analyzing hematoxylin and eosin (HE) stained slides. To quantify the inflamed area and the number of cell positive for CD4, CD20, CD 68, CD31 and vW cell markers, Image-Pro (Media Cybernetics) software was used.

**Results:** Diffuse lymphoplasmacytic perivascular infiltrates and granulomas were found in the dermal skin layer. Inflammation extent varied from 3% to 73% indicating a significant linear correlation with vW+ vessels and with graded patterns. The most frequent inflammatory cells were macrophages CD68+, followed by B cells CD20+, and T cells CD4+. A significant linear correlation between CD4+ and CD20+ cells with the total area of inflammation was also found. Amastigotes were visualized in immunostained or HE stained slides. All 18 biopsies were positive for *L. (Viannia) braziliensis*.

**Conclusion:** Our findings suggest that chronic inflammation was present in all papules and was predominantly formed by macrophages, plasmacytes, T cells and B cells. As the area of inflammation expands, the vascular framework increases proportionally as the presence of CD20+ and CD4+ cells.

**Key words:** Disseminated leishmaniasis, histopathology, immunohistochemistry, inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CD:** *Cluster of Differentiation*

**DL:** Disseminated Leishmaniasis

**DAB:** Diaminobenzidina

**DTH:** Teste de Hipersensibilidade Tardia

**FIOCRUZ:** Fundação Oswaldo Cruz

**HE:** Hematoxilina e Eosina

**HRP:** *Horse Raddish Peroxidase*

**IHQ:** Imunohistoquímica

**IL:** Interleucina

**IDRM:** Intradermoreação de Montenegro

**IFN  $\gamma$ :** Interferon gama

**LC:** Leishmaniose Cutânea

**LCA:** Leishmaniose Cutânea Atípica

**LCD:** Leishmaniose Cutânea Difusa

**LD:** Leishmaniose Disseminada

**LCM:** Leishmaniose Cutâneo Mucosa

**LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PAS:** Ácido Periódico de Schiff

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**PBS:** *Phosphate Buffer Solution*

**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular

**TCLE:** Termo de Consentimento livre e esclarecido

**TNF  $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa

**$\mu\text{m}^2$ :** Micrômetro ao quadrado

**vW:** Fator de von Willebrand



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Dados clínicos de pacientes incluídos no estudo.....	31
Tabela 2: Aspectos histopatológicos.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pacientes com LD incluídos no estudo. Observa-se que o número de lesões papulares variam, alguns pacientes apresentam lesões nodulares com microulcerações.....	32
Figura 2: Exemplo de foto montada em mosaico a partir da lâmina corada com HE em 10x.....	33
Figura 3: A: Aglomerado de macrófagos epitelióides (setas) na formação de um granuloma (aumento de 20x). B: Células na epiderme (setas) (exocitose), ou seja, presença de edema intercelular na epiderme (aumento de 40x).....	34
Figura 4: A: Amastigotas coradas por HE (seta). B: Amastigotas detectadas por IHQ com anticorpo policlonal de coelho anti <i>L. braziliensis</i> (seta) (100x).....	35
Figure 5: A: Células CD4+, CD20+ e CD68+ por $\mu\text{m}^2$ . B: Correlação linear de Pearson entre células T CD68+ e inflamação.....	36
Figura 6: A: Macrófagos CD68+ (seta) (aumento de 40x). B: Células gigantes CD68+ (seta) ao lado de macrófagos (aumento de 40x).....	37
Figura 7: A: Correlação linear de Pearson entre células T CD4+ e a extensão da inflamação. B: Correlação linear de Pearson entre células B CD20+ e a extensão da inflamação.....	38
Figura 8: Aglomerado de células T CD4+ (seta) ao lado esquerdo do vaso seccionado verticalmente (40x). B: Células B CD20+ (seta).....	39
Figura 9: Vasos e edema com presença de inflamação (setas) (20x). B: Vaso capilar em grande aumento com infiltrado perivascular detalhado (seta) (100x).....	40
Figura 10: Correlação linear de Pearson entre vasos vW+ por $\mu\text{m}^2$ e extensão da inflamação. B: Parede de vasos na cor castanha com anticorpo anti- fator vW (setas).....	41

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	13
1.2 FORMAS CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSE .....	14
1.2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZA (LC) .....	14
1.2.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA MUCOSA (LCM) .....	14
1.2.3 LEISHMANIOSES ATÍPICAS.....	15
1.2.4 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD).....	15
1.2.5 LEISHMANIOSE DISSEMINADA (LD).....	16
1.3 HISTOPATOLOGIA E IMUNOPATOLOGIA.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	20
2.1 IMUNOPATOGÊNESE .....	20
2.2 ANGIOGÊNESE .....	21
2.3 ANGIOGÊNESE E INFLAMAÇÃO.....	22
2.4 VASCULITE .....	22
2.5 LEISHMANIOSE, ANGIOGÊNESE E VASCULITE.....	23
3 JUSTIFICATIVA .....	24
4 OBJETIVOS.....	26
4.1 GERAL.....	26
4.2 ESPECÍFICOS .....	26
5 CASUÍSTICAS E MÉTODO.....	27
5.1 PROCEDIMENTOS DE BIÓPSIAS.....	28
5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	28
5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	28
5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	29
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
6 RESULTADOS .....	31
7 DISCUSSÃO.....	43
8 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS .....	47
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	52

ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO DE BOLSA PARA O CONGRESSO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA.....	53
APÊNDICE 1 - ABSTRACT APRESENTADO NO CONGRESSO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA.....	54
APÊNDICE 2 - MANUSCRITO EM SUBMISSÃO.....	55
APÊNDICE 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	67
APÊNDICE 4 - PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	67

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que acometem indivíduos de regiões em todo o mundo (OMS). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de ser infectada com registro aproximado de dois milhões de novos casos de alguma forma desta doença (SOUZA-LEMOS et al, 2008).

Entre as leishmanioses, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é responsável por grande problema de saúde pública na América Latina e em especial no Brasil, onde cerca de 30.000 casos são diagnosticados anualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em 2004, o Estado da Bahia, foi o segundo Estado com maior número de casos no Brasil. Na Bahia, o distrito de Corte de Pedra a 300 km da cidade de Salvador tem o maior número de casos (CARVALHO et al, 1994; SCHRIEFER et al, 2004).

A LTA é causada por um parasito do gênero *Leishmania* sp. cujo ciclo de transmissão depende de um inseto vetor, do gênero *Lutzomya* conhecido como flebotomíneo (*Diptera Psychodidae* da subfamília *Phlebotominae*) e do hospedeiro. A *Leishmania* é um parasito digenético, que no tubo digestivo do flebótomo vetor se desenvolve em promastigota, e posteriormente no tecido do hospedeiro vertebrado, em amastigota (BRYCESON, 1969). As amastigotas internalizadas em macrófagos e células dendríticas induzem uma resposta imune inflamatória que resulta em infecção clínica inaparente ou se manifesta por lesão cutânea, cutâneo mucosa, disseminada e difusa (COSTA et al, 2009).

## 1.2 FORMAS CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES

### 1.2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZA (LC)

Das formas clínicas da LTA a que acomete somente a pele, denomina-se de leishmaniose cutânea (LC), é a mais prevalente (BARRETO et al, 1981; SANTOS et al, 2000). A LC caracteriza-se por uma ou mais úlceras cutâneas, de bordas elevadas com fundo granuloso, que pode regredir espontaneamente ou evoluir para forma cutâneo-mucosa, e mais raramente se disseminar para outras áreas cutâneas com múltiplas lesões papulares normalmente fechadas (COSTA et al, 1986; CARVALHO et al, 1994).

A LC inicialmente ocorria na zona rural, principalmente em regiões de clima úmido, e com vegetação arbustiva, na maioria das vezes em países de zonas tropicais e subtropicais. Modificações ambientais provenientes do processo de urbanização vêm favorecendo o desenvolvimento do vetor da LC também em áreas urbanas. A lesão ulcerada ocorre no local de picada do flebotomíneo infectado, que são normalmente membros inferiores em razão de sua grande exposição devido aos hábitos culturais (GUIMARÃES et al, 2005).

Além da formação de úlcera clássica, outras formas de lesões cutâneas localizadas podem se formar, como por exemplo, a forma verrucosa, esporotricóide e lupóide são também vistas nas áreas endêmicas (DE ALMEIDA et al, 2003). *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie de *Leishmania* mais frequentemente associada à doença no homem e também a principal espécie isolada nos casos da leishmaniose cutânea em especial no nordeste do Brasil (GRIMALDI et al, 1989).

### 1.2.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA MUCOSA (LCM)

A forma cutânea mucosa caracteriza-se pela lesão na pele e mucosa, em geral mucosa nasal. A LCM está associada à infecção predominantemente pela *L. (V.) braziliensis* que induz uma resposta inflamatória do tipo Th1 com muita destruição tecidual. A resposta terapêutica é comumente insatisfatória e as recidivas são frequentes (MARSDEN, 1986).

Pacientes com LCM apresentam teste de Montenegro positivo, e a magnitude da resposta proliferativa *in vitro* de células do sangue periférico, frente ao antígeno do parasita, é maior que na forma localizada (CASTES et al, 1983; CARVALHO et al, 1985). As lesões

ocorrem principalmente na mucosa nasal, provocando coriza e obstrução nasal. Os fatores de risco para a lesão mucosa são a presença de lesões múltiplas ou extensas, lesões acima da cintura e tratamento inadequado da lesão cutânea primária (MARSDEN, 1986).

As lesões atingem o septo cartilaginoso nasal e podem se estender para a parede lateral e assoalho, região do palato, úvula e, em menor frequência, ocorre envolvimento da faringe, laringe, cordas vocais e lábio superior, com graus diversos de infiltração, granulação e ulceração (MARSDEN et al, 1998; LESSA et al, 2001).

A lesão inicial da leishmaniose mucosa é caracterizada por uma nodulação esbranquiçada sem ulceração que é habitualmente observada no septo cartilaginoso (área de Kiesselbach), do assoalho e na parede lateral, especificamente na cabeça das conchas inferiores. Este comprometimento ocorre no princípio do processo inflamatório e não se assemelha clinicamente com qualquer outra doença nasal e ainda pode evoluir para ulceração e até perfuração do septo nasal (MARSDEN et al, 1998; LESSA et al, 2001; BOAVENTURA et al, 2009).

### 1.2.3 LEISHMANIOSES ATÍPICAS (LCA)

Comumente, a lesão inicial progride para uma úlcera. Mais raramente, a lesão inicial pode se desenvolver de forma atípica em lesões vegetantes, verrucosas, superficiais, eritemato descamativas, lesões em placas e infiltradas também denominadas de lupóide e lesões nodulares.

### 1.2.4 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD)

A forma disseminada difere da leishmaniose cutânea difusa (LCD) como uma variação da LC. A LCD é uma forma mais rara e mais grave que a LD. Usualmente causada pela *L.amazonensis*, a LCD, se trata de uma forma anérgica da doença, o que indica uma resposta imune específica aos antígenos do parasito. Ao contrário da LD, pacientes com LCD tem evolução lenta, em vez de pápulas, as lesões são placas múltiplas ou nódulos não ulcerados que acometem grandes extensões do corpo.

### 1.2.5 LEISHMANIOSE DISSEMINADA (LD)

Descrita em 1986 por Costa e colaboradores e aos poucos aprofundando alguns aspectos de sua imunopatogênese (CARVALHO et al, 1994). LD é uma forma rara de leishmaniose cutânea podendo ser encontrada em 4% dos casos de LC em área endêmica. No entanto, observa-se um aumento dessa forma de manifestação clínica, podendo agora ser considerada reemergente. (MACHADO et al, 2011)

Duas espécies de *leishmania* podem causar a forma disseminada da doença, *L. Viannia braziliensis* e *L. amazonensis*. Sendo que a *L. Viannia braziliensis* apresenta-se com maior frequência.

Esta forma de LC caracteriza-se pelo aparecimento clínico de múltiplas lesões cutâneas papulares, acneiformes ou nodulares microulceradas. Essas lesões acometem vários segmentos do corpo, mas com mais frequência no tronco e na face. Em geral o número dessas lesões é maior que dez, podendo chegar a mais de mil.

As lesões descritas acima são secundárias às lesões ulceradas iniciais que pode ser únicas ou múltiplas e se caracterizam por fundo rugoso e bordas elevadas, em nada diferindo das LC. Nem sempre se pode prever que pacientes com LC desenvolverão a LD. A disseminação é um fenômeno agudo, que pode cursar com febre, aparentemente a disseminação do parasito ocorre por via sanguínea e linfática (DE MAGALHÃES et al, 1986). Esse período de disseminação pode ser agudo, desde 24 horas ou dias. Após esse período surgem as lesões que inicialmente são pápulas menores que 0,5cm, mas posteriormente podem aumentar, tornando-se nodular com microulceração (CARVALHO et al, 1994).

Em 44% dos pacientes com LD pode haver acometimento de mucosas (MACHADO et al, 2011). Esses pacientes têm títulos elevados de anticorpos anti *Leishmania*. O teste cutâneo IDR de Montenegro nesses pacientes também é variável.

Outra característica que distingue a LD é o não acometimento da mucosa, exceto por discreta infiltração sem destruição do septo nasal (COSTA et al, 1986). Observa-se também uma má resposta ao tratamento.

Desde os anos 70 tem sido observado um aumento no número de casos de LD durante a vigilância clínica ambulatorial na região do nordeste do Brasil onde a doença é endêmica (TURETZ et al, 2002).



Na infecção causada por *L. braziliensis*, a fase inicial da doença se caracteriza pela formação de uma lesão papular seguida de uma possível ulceração superficial, normalmente acompanhada de exuberante adenomegalia regional indolor maior do que três cm de diâmetro, observada em 85% dos casos (MACHADO et al, 2011; BARRAL et al, 1995).

Nos últimos anos tem sido documentada a existência de diferenças genéticas de isolados de *L. braziliensis* as quais podem se relacionar com as diferentes formas clínicas da doença (SCHRIEFER et al, 2004). Existe também uma agregação familiar dos casos de leishmaniose mucosa, o que pode relacionar se tanto com o ambiente como pela genética do hospedeiro (CASTELLUCCI et al, 2010; RAMASAWMY et al, 2010).

### 1.3 HISTOPATOLOGIA E IMUNOPATOLOGIA

No tecido acometido pela infecção por *Leishmania* sp. observa-se uma inflamação crônica com intensidade variável. Em geral essa inflamação crônica compõe-se de macrófagos, linfócitos e plasmócitos que infiltram a derme, com arranjo predominantemente perivascular, que por vezes formam granulomas com ou sem necrose, acompanhada de proliferação de vasos. Mais raramente observa-se focos de necrose lítica ou caseosa (MACHADO et al, 2002). Granulomas são por vezes bem delimitados constituídos por células epitelióides encontrando-se mais raramente algumas células gigantes, outras vezes esses granulomas são mal delimitados perivasculares ou em torno de anexos. Amastigotas são raramente detectadas (DE MAGALHÃES et al, 1986; BITTENCOURT; BARRAL, 1991).

A resposta do tecido à infecção pela *Leishmania* depende da resposta imune mediada das células T CD4 em resposta aos antígenos do parasito apresentados por macrófagos e células dendríticas infectadas (ZAHN et al, 2010). Após a picada do flebotomíneo infectado com promastigotas, as mesmas são fagocitadas por células macrofágicas ou dendríticas. Uma vez internalizadas as promastigotas transformam-se em amastigotas. Muitas promastigotas são destruídas pelo poder microbicida derivados do metabolismo oxidativo e pelo óxido nítrico produzido por macrófagos.

Macrófagos infectados produzem uma diversidade de citocinas, predominantemente inflamatórias como IL-1 e TNF $\alpha$ . Além de forte papel no recrutamento de células para o local da lesão, TNF $\alpha$  tem um forte papel na ativação dos próprios macrófagos, participando também na contenção do parasito. Animais deficientes de TNF $\alpha$  ou receptor desta citocina

têm inflamação com granulomas mais desorganizados e são incapazes de conter a infecção (RITTER et al, 1996; VIEIRA et al, 1996). Em resposta a infecção, macrófagos expressam antígenos da *Leishmania* no contexto MHC classe II aos linfócitos T e B ativando as pelo MHC classe I aos linfócitos CD8 (JORDAN; HUNTER, 2010).

Células T CD4 especialmente com receptores alfa-beta, em presença de antígenos da *Leishmania* no MHC classe II e moléculas co-estimulatórias transforma-se em CD4 ativados. Uma vez ativados, células T CD4 produzem IFN- $\gamma$  e IL-2 pro - inflamatórias que caracterizam a resposta tipo Th1 (T auxiliaadoras tipo 1). IFN $\gamma$  secretado especificamente em resposta aos antígenos da *Leishmania* exercem forte ativação sobre macrófagos infectados, que por sua vez produzem IL-1 e TNF $\alpha$ . Se por um lado essa cascata de eventos pode conter o parasito, essa tentativa exacerbada de contenção resulta na destruição tecidual no local da infecção formando a úlcera dérmica. Sob forte ativação pelo IFN $\gamma$ , macrófagos secretam TNF $\alpha$  que contribui substancialmente para a lise tecidual (CARVALHO et al, 1994; BACELLAR et al, 2002).

Ainda se conhece pouco sobre a patogênese da úlcera, mas a participação da inflamação imune mediada deve contribuir na lise da junção derme epiderme e, por conseguinte na formação da úlcera.

Com recrutamento progressivo de monócitos e linfócitos sanguíneos para o local da infecção, que também depende em parte da ação do TNF $\alpha$  e outras quimiocinas produzidas, os monócitos recém chegados transformam-se em macrófagos, células epitelióides e células gigantes (TEIXEIRA et al, 2006). O aglomerado de células macrofágicas circundado por linfócitos ativados formam granulomas. Adicionalmente, macrófagos parecem ter um papel mais amplo além da resposta imune e imunopatológica à *Leishmania* também são capazes de produzir citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF $\beta$ . Essas citocinas contra regulam o papel das citocinas pró-inflamatórias, diminuindo em parte a resposta inflamatória. TGF $\beta$  tem papel fundamental na formação do processo de reparo induzindo a produção de colágeno, componente da fibrose e do tecido de granulação observados nas bases das úlceras (RUSSO et al, 1993).

Macrófagos, além da função imune-inflamatória, produzem também fatores angiogênicos, a exemplo do VEGF (fator de crescimento endotelial) capaz de induzir a formação de novos vasos (angiogênese). Esses vasos recém formados sustentam a inflamação permitindo que mais células cheguem ao local da lesão (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007;

CHUNG et al, 2009). Assim com o advento de vasos neoformados a resposta inflamatória se mantém pelo fluxo contínuo de células inflamatórias entre vasos e o sítio da infecção.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 IMUNOPATOLOGIA

Nos fragmentos de tecido obtidos das bordas das lesões de pacientes com LC observa-se uma resposta inflamatória tecidual à infecção. Esta inflamação no tecido em parte reflete diferenças nas respostas imunológicas do hospedeiro à *Leishmania*. Em sua forma localizada, as alterações histológicas se assemelham a observada nas lesões por hipersensibilidade tardia.

Ambas as formas cutânea e mucosa o processo inflamatório é crônico e difuso, formado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, comumente associados à resposta granulomatosa e à proliferação vascular. A reação granulomatosa pode ocorrer sob forma de granulomas tuberculóides ou por vezes parcialmente desorganizados em conjuntos de células epitelióides e gigantes tangenciando áreas de necrose e depósitos fibrinóides (MAGALHÃES et al, 1986; VIEIRA et al, 2002 ).

A pesquisa de parasitos no tecido é uma tarefa trabalhosa por serem raros e de difícil coloração além de serem confundidas com células apoptóticas. Através da técnica de imunohistoquímica é possível visualizar amastigotas ou seus antígenos. Com o uso da imunohistoquímica pode se detectar *Leishmania* e antígenos em pelo menos 63% dos casos de LTA. Em 33,3% dos casos apresenta vasculite aguda próxima à área de necrose, comprometendo assim pequenas vênulas. Os trombos fibrinosos, necrose fibrinóide e hialina de parede vascular, com exsudação de neutrófilos associadas à hemorragia, depósitos fibrinóides intersticiais, necrose de coagulação e caseosa em granulomas são também vistos (MAGALHÃES et al, 1986).

Nos casos de vasculite observa-se também a presença de fibrina e imunoglobulinas na parede de vasos. Imunoglobulinas, especialmente IgG, nos plasmócitos indicam que estão sendo produzidas na própria lesão. A presença de imunoglobulinas em quantidade significativa possibilita a opsonização dos parasitos e de seus antígenos.

As lesões teciduais da LC resultam das diferenças da resposta imunológica do hospedeiro com relação ao parasita. Esta correlação foi avaliada e demonstrada em relatos da resposta *in vitro* aos antígenos parasitários (ROCHA-VIEIRA et al, 2003). Acredita-se que se a resposta imune é efetiva quando ocorre o acúmulo de células T e a liberação de citocinas formando granulomas. Tal formação sugere que o organismo infectante passou por uma fase

intracelular (como a *Leishmania* dentro de macrófagos) e se manteve resistente à resposta imune celular. Por outro lado, aventa-se que a resposta imune presente em pacientes com LD seja diferente devido aos achados de maior número de parasitas além da diferença na resposta linfoplasmocitária e a ausência de granulomas.

A ativação de células T CD4, em especial Th1 e T CD8 é fundamental para a resistência à infecção (CARVALHO et al, 1994). Nas formas localizadas da leishmaniose existe um predomínio de células T CD4+ tipo Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  e células T CD8+ com fenótipo citotóxico (20 a 25%) (ROCHA-VIEIRA et al, 2003).

## 2.2 ANGIOGÊNESE

É o processo de formação de novos vasos que são formados por dois processos aparentemente distintos. A vasculogênese, no qual vasos primitivos são formados a partir de células endoteliais progenitoras durante o desenvolvimento embrionário, e angiogênese, no qual vasos pré-existent se expandem dando origem a novos vasos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007).

As células progenitoras, como as células tronco, que são células derivadas da medula óssea as quais são recrutadas para os locais de reparo tecidual. Acredita-se que essas células atuam ativando diretamente as células endoteliais e/ou diferenciando-se em células endoteliais maduras localmente nos locais da lesão (REAL et al, 2008).

O estímulo para formação de novos vasos acontece também em tecidos saudáveis, mas é comum nas inflamações, e em torno de neoplasias e infartos. Devido à demanda metabólica de tecidos periféricos esse estímulo ocorre até mesmo em veias de pequeno calibre onde existe pouco oxigênio disponível. Uma vez formados, os novos vasos passam a funcionar como canais alternativos devido aos eventuais bloqueios de vasos mais importantes para irrigação colateral, por exemplo, em casos de obstruções (RYAN 1976).

Os vasos são revestidos internamente por células endoteliais que exercem uma permeabilidade seletiva controlando a entrada e saída de moléculas e células para o interstício. As junções endoteliais são essencialmente impermeáveis. No entanto, pequenas junções das células endoteliais podem se abrir sob a influência de fatores hemodinâmicos e/ou agentes vasoativos, como a histamina na inflamação. Em casos de inflamação, ocorre o

aumento da permeabilidade e inundação do interstício com elementos séricos incluindo proteínas do complemento, imunoglobulinas, e células inflamatórias.

### *2.3 ANGIOGÊNESE E INFLAMAÇÃO*

Independente da etiologia da inflamação, o processo de reparo tecidual acontece precocemente após a lesão com proliferação de células endoteliais e posterior migração de fibroblastos. Após um período que varia de três a cinco dias inicia sua especialização do tecido formado que é característica da cicatrização, nesta fase o tecido denomina-se tecido de granulação. Esse tecido caracteriza-se pela proliferação de vasos neoformados de paredes finas e deposição progressiva da matriz no local onde se encontram as células inflamatórias com predomínio de mononucleares. A angiogênese é imprescindível na cicatrização das lesões inflamatórias favorecendo também a irrigação sanguínea para eliminação de tecido necrótico e contribuir para diminuir a isquemia.

Recentemente demonstrou-se que angioblastos podem migrar da medula óssea e gerar de novos vasos nos locais de inflamação (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007). Estudos têm sido feitos para se compreender os mecanismos subjacentes da angiogênese com objetivo de controlar seu processo, melhorar ou inibir o fluxo sanguíneo em diferentes condições clínicas.

No processo de reparo pode se detectar quatro fases principais: migração e/ou proliferação, formação de novos vasos, maturação e remodelação do tecido fibroso e angiogênese. Vasos sanguíneos são formados por dois processos: vasculogênese, em que a rede vascular primitiva é formada a partir de angioblastos, e angiogênese, ou neovascularização, onde vasos que já existem e emitem ramificações capilares que podem originar novos vasos. A angiogênese contribui com a inflamação e para nutrição de tumores, influenciando na disseminação e no crescimento tumoral. (MANTOVANI 2010; QIAN; POLLARD 2010; SAHARINEN et al, 2010)

### *2.4 VASCULITE*

Vasculite é o processo inflamatório que ocorre nos vasos capilares ou vasos de maior calibre. Vasculites podem ocorrer em diversas doenças clínicas. Vasos de qualquer órgão e de

qualquer calibre podem ser afetados, porém, a maioria das vasculites ocorre em vasos de pequeno calibre.

São reconhecidos cerca de 20 tipos de vasculites. Podem ser classificadas de acordo com o calibre dos vasos afetados, pelo envolvimento de complexos imunes, ou pela presença de anticorpos específicos, ainda podem ser denominadas de granulomas quando ocorrem granulomas.

Os mecanismos patogênicos mais comuns observados nas vasculites são decorrentes da resposta imune de origem autoimune, associados ou não a infecções. Processos infecciosos induzem vasculite indiretamente, através de depósitos de complexos imunes na parede dos vasos, ou através de anticorpos que reagem cruzadamente contra componentes dos vasos. É fundamental distinguir os mecanismos envolvidos, pois a terapia imunossupressora não é adequada em vasculites infecciosas. Granulomas e células gigantes estão associadas com alguns tipos de vasculites (vasculites granulomatosas) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007).

## *2.5 LEISHMANIOSE, ANGIOGÊNESE E VASCULITE*

Como já descrito anteriormente na LT o processo inflamatório é crônico, e difuso, acompanhado de proliferação vascular.

Llambrich e colaboradores (2009) demonstraram, por dermatoscopia, que estruturas vasculares apareciam em casos de leishmaniose. Todas as lesões apresentaram pelo menos uma estrutura vascular semelhante às observadas em neoplasias cutâneas. As estruturas vasculares foram descritas como: em forma de vírgula (73%), lineares irregulares (57%), pontilhada (53%), polimorfo/atípico (26%), grampo de cabelo (19%), trevo (11%), onduladas (7%) e glomerulares (7%). Uma combinação de no mínimo dois tipos de estruturas vasculares estavam presente em 23 de 26 lesões de leishmaniose cutânea (88%), dois tipos de estruturas vasculares estavam presente em 13 casos (50%) e três ou mais tipos estavam presente em 10 casos (38%).

As características dermatoscópica identificadas na LC seguem padrões observados frequentemente em tumores melanocíticos e não melanocíticos. Vasculites de graus variados estão também presente no tecido de biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea (DE MAGALHAES et al, 1986).

### 3 JUSTIFICATIVA

A resposta inflamatória na lesão fechada papular decorrente da disseminação da *L. braziliensis* é uma inflamação crônica e imune em resposta à presença do parasita. Essa resposta inflamatória tecidual a *Leishmania* sp. inicia-se com vasodilatação e ativação de células endoteliais para adesão e migração de células para o tecido infectado. Nessa fase inicial as reações vasculares ocorrem nos capilares venosos. Os vasos são necessários para que as células da resposta imune inflamatória migrem da circulação para o interstício tecidual. As primeiras células que chegam ao local da lesão são os neutrófilos, porém se a agressão tecidual permanecer, células mononucleares, macrófagos e linfócitos vão migrar para o local (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007).

Na fase posterior segue uma crescente migração de células mononucleares, em seguida surgem novos capilares (angiogênese). Na formação de novos vasos, já na fase mais tardia com presença de células mononucleares e vasos neoformados disseminados, o tecido de granulação é constituído. O reparo e a cicatrização sucedem esta fase, porém, persistindo o estímulo ou patógeno ou mesmo seus antígenos, a inflamação persistirá com destruição tecidual. Portanto, no contexto de uma resposta tecidual a uma infecção, sua resolução ou continuação depende da geração de vasos, pelos quais células e componentes séricos chegam ou saem do tecido infectado.

No local da infecção pela *Leishmania* ocorre uma inflamação crônica. Esta inflamação pode contribuir para a cura se a *leishmania* for eliminada, mas se persiste, a inflamação se prolonga contribuindo para a destruição tecidual e formação da úlcera. Nas reações teciduais à infecção por *Leishmania* não difere de outras inflamações, ocorrendo os mesmos fenômenos vasculares. Mesmo pouco detectada em biópsias, as etapas iniciais com vasodilatação, e migração de neutrófilos também ocorre no local da infecção, porém até o presente momento só existem estudos documentados em animais de experimentação (DE ALMEIDA et al, 2003).

Em ambas, porém em graus diferentes, as biópsias de borda de úlcera ou de pápulas de pacientes com LCL ou LD respectivamente, mostram um grande número de vasos ao lado de células inflamatórias.



Os aspectos histopatológicos das lesões papulares na LD ainda é pouco abordado pela literatura, bem como qualquer correlação entre células, inflamação e angiogênese. Assim, o presente estudo aborda tais correlações de forma descritiva.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Descrever os aspectos histopatológicos das lesões fechadas, após disseminação pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* em biópsias cutâneas de pacientes com Leishmaniose Disseminada.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Quantificar a extensão da inflamação *in situ*.
- Identificar e quantificar por imunohistoquímica macrófagos CD68+, linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD20+.
- Identificar e quantificar por imunohistoquímica vasos CD31+ e vW+.
- Correlacionar as populações celulares imunomarcadas com vasos e a extensão da inflamação.

## 5 CASUÍSTICAS E MÉTODOS

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram recrutados no posto de saúde Dr. Jackson Mauricio L. Costa do distrito de Corte de Pedra pertencente ao Município de Presidente Tancredo Neves, está localizado no litoral sul da Bahia, a 13° 26' de latitude Sul e 59° 31' de longitude Oeste. Corte de Pedra situa-se à margem da BR 101, que liga as cidades do Salvador e Rio de Janeiro, a uma distância aproximada de 300 km da capital do Estado da Bahia. A população rural é aproximadamente 8.808 habitantes. A região tem sido caracterizada como área endêmica de LTA, predominantemente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BARRETO et al, 1981; JONES et al, 1987; CARVALHO et al, 1994).

O presente estudo compreendeu-se entre os anos de 2008 e 2009. Trata-se de um estudo investigativo e descritivo, onde todos os indivíduos participantes foram voluntários. As autorizações para realização das biópsias foram obtidas através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critérios de inclusão: Foram incluídos neste estudo pacientes diagnosticados por critérios clínicos e confirmados por reação positiva ao teste de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* ou teste de Intradermoreação de Montenegro (IDRM), exame histopatológico e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com detecção de DNA do parasito. O teste de DTH foi mensurado após 48 ou 72 horas, a partir da injeção de antígenos de promastigota de *Leishmania* (0,1 ml) via intradérmica na face interna do antebraço esquerdo considerado positivo quando a medida de endurecimento da pele atingiu  $\geq$  5 mm. Adolescentes menores de 18 anos de idade foram incluídos somente após a permissão de seus pais ou responsáveis.

Critérios de exclusão: Foram excluídos do estudo pacientes que estavam em tratamento para leishmaniose, com lesões apenas na face e crianças menores de 4 anos de idade. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (protocolo n° 321, 2009).

### *5.1 PROCEDIMENTOS DE BIÓPSIAS*

Apenas lesões papulares acneiformes, não ulceradas, medindo aproximadamente 5mm, foram biopsiadas de 18 pacientes e incluídas neste estudo. O centro dessas lesões foram biopsiadas utilizando um “punch” de 4 mm de diâmetro, após a aplicação de anestesia local com lidocaína 2%. Um fragmento diminuto foi cortado de cada biópsia e encaminhado ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos para realização de diagnóstico por PCR em tempo real e verificação de subgênero e espécie do parasito como feito de rotina pela equipe. Todas as biópsias foram mantidas em formalina (10%) por um período de aproximadamente 24 horas. Os fragmentos foram desidratados em álcool e incluídos em blocos de parafina. Secções foram obtidas pelos cortes dos blocos de parafina, com espessura de 4 µm cortadas em micrótomo. As secções foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) ácido periódico de Schiff (PAS) e GROCOTT a fim de identificar possíveis fungos.

### *5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA*

A análise histopatológica das lâminas com secções coradas por HE foi realizada por microscopia de luz convencional, usando um microscópio Nikon E 600 (Nikon USA). Todas as lâminas foram submetidas à análise morfométrica e imunohistoquímica.

### *5.3 IMUNOHÍSTOQUÍMICA*

Secções histológicas de 4 µm foram obtidas a partir de tecido incluído em parafina e montados em lâminas de vidro previamente silanisadas. Os cortes histológicos foram rotineiramente desparafinizados com xilol e hidratados em banhos de concentração decrescente de álcool e crescente de água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada por meio de um banho em solução tampão de citrato (DAKO, solução de recuperação de destino) a 96 °C quando necessário. As reações/ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução de leite em pó sem gordura a 3% por 20 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas durante uma hora com os

anticorpos anti-CD4, anti-CD20, anti-CD31, anti-CD68, anti-vW e anticorpos anti-*Leishmania braziliensis* na diluição de 1:10, 1:20, 1:15, 1: 500; 1:50 e 1:1600 com diluente de anticorpo (DAKO S3022) respectivamente a 25 °C. A revelação da reação foi realizada utilizando o kit Envision™ + Dual Link System HRP (DAB) (DAKO K40651). Todas as lâminas foram levemente contra coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas de vidro. Os cortes foram analisados por microscopia óptica.

#### 5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a avaliação morfológica, todas as secções foram coradas pela técnica de HE. As análises foram realizadas através das imagens capturadas com um microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo digital a cores. O sistema de processamento de imagem Image-Pro Plus foi utilizado para medir a área total de cada fragmento bem como as áreas de inflamação dos mesmos. Todas as células coradas em castanho foram consideradas marcadas e foram contadas com o auxílio do mesmo programa de computador, o Image-Pro Plus edição 5.1. Com o microscópio devidamente ajustado na objetiva de 40x de ampliação, mapas de todo fragmento de cada biópsia foram montados e a partir deles a análise morfométrica foi feita com auxílio do programa de computador citado acima.

A análise de positividade para *Leishmania* foi considerada pela constatação de pelo menos uma estrutura castanha (cor dada pelo cromógeno utilizado diaminobenzidina) morfológicamente compatível com amastigota, considerando, tamanho, forma e localização das estruturas dentro dos vacúolos dos macrófagos. A análise quantitativa da população celular de linfócitos T CD4+, B CD20+, macrófagos CD68+, células endoteliais CD31+ e anti-fator vW+ foi determinada medindo-se todas as células marcadas nas imagens capturadas dos fragmentos de tecido.

A contagem de células positivas foi feita manualmente com o auxílio do programa de computador adequado capaz de permitir que o usuário circule todas as células marcadas. O conjunto de células marcadas com CD31 e fator de vW delimitaram as paredes internas dos vasos resultando assim na medida da área da luz dos vasos visualizados. O número de células positivas foi expresso em células/ $\mu\text{m}^2$ .

### 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores obtidos de cada variável contínua foram descritos através da média, desvio padrão e mediana.

Os dados foram validados através da aplicação do teste estatístico de Pearson, não paramétrico, seguido de correlação linear. Os valores foram expressos pelas médias ( $\bar{x}$ ) +/- desvio padrão (SD). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi  $<0,05$ .

## 6 RESULTADOS

A lesão primária da LD é na maioria das vezes uma úlcera. Os pacientes avaliados apresentavam úlceras bem delimitadas, com bordas elevadas, fundo de aspecto granuloso, contendo exsudato esbranquiçado. A LD manifesta múltiplas lesões secundárias papular, acneiforme ou nodular, que podem acometer os membros, tronco e por vezes a face (Figura 1). Distantes do local das picadas, as lesões secundárias surgem por possível disseminação das amastigotas via hemática ou linfática.

Para este estudo, as biópsias foram realizadas apenas ao centro das lesões papulares de 18 pacientes previamente diagnosticados com LD (Figura 1). O número de pápulas entre os pacientes variou de 10 a 412 lesões. Linfadenomegalia esteve presente em 5 casos. Os pacientes eram jovens com idade mediana de 27 anos. A média foi de  $29 \pm 14$  anos ( $x \pm SD$ ). A maioria dos pacientes incluídos neste estudo foram homens (65%) e mais raramente mulheres (35%). Dos 18 pacientes, 7 apresentaram reação positiva ao teste intradermocutâneo de Montenegro. Foi possível detectar DNA do parasito em todos os 18 fragmentos diminutos provenientes das biópsias das lesões papulares através da técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) para diagnóstico e confirmação do subgênero e espécie *L. (V.) braziliensis* (Tabela 1). Dos pacientes que tiveram acompanhamento clínico após tratamento com antimonial pentavalente SBV indicado pela OMS, 2 apresentaram cura com uma série, 2 apresentaram cura com duas séries, 1 apresentou cura com três séries e 1 paciente apresentou cura com Anfotericina B. Os demais pacientes não foram acompanhados.

Tabela1: Dados clínicos de pacientes incluídos no estudo

Características clínicas	n = 18
Idade, (média em anos $\pm$ SD)	$29 \pm 14$
Gênero (feminino/masculino)	06/12
Reação positiva ao teste de intradermorreação de Montenegro	7
Deteção de <i>L. Viannia braziliensis</i> por PCR	18
Duração da doença, (média em dias $\pm$ SD)	$44 \pm 25$
Linfadenopatia	5
Número de lesões	$10 \pm 412$



Figura 1: Pacientes com LD incluídos no estudo. Observa-se que o número de lesões papulares variam, alguns pacientes apresentam lesões nodulares com microulcerações.



A análise histopatológica das lâminas coradas com HE provenientes das biópsias desses pacientes revelou lesões de pele com alterações discretas da epiderme como a presença de acantose e focos de espongiose. Granulomas foram observados em 9 das 18 biópsias (Figura 3). A derme subjacente esteve sempre acometida de uma inflamação crônica composta por macrófagos, linfócitos e muitos plasmócitos por vezes com arranjos perivascular ou difuso além de raras células gigantes (Figura 6). A extensão da inflamação avaliada pela análise morfométrica variou de 3% a 73%. Permeando a inflamação, observamos também uma extensa proliferação de capilares vasculares, incluindo vênulas, arteríolas e pequenos vasos linfáticos. Amastigotas foram visualizados diretamente em lâminas coradas com HE em nove biópsias (50%). Por imunohistoquímica usando anticorpo policlonal de coelho anti *leishmania* pode-se detectar amastigotas em 10 das 18 biópsias (55%) (Figura 4).

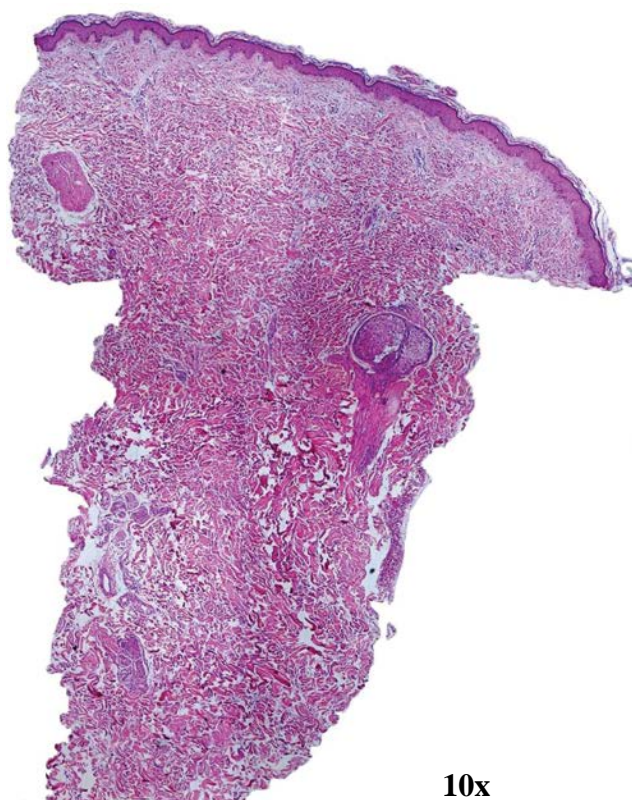


Figura 2: Exemplo de foto montada em mosaico a partir da lamina corada com HE em 10x.

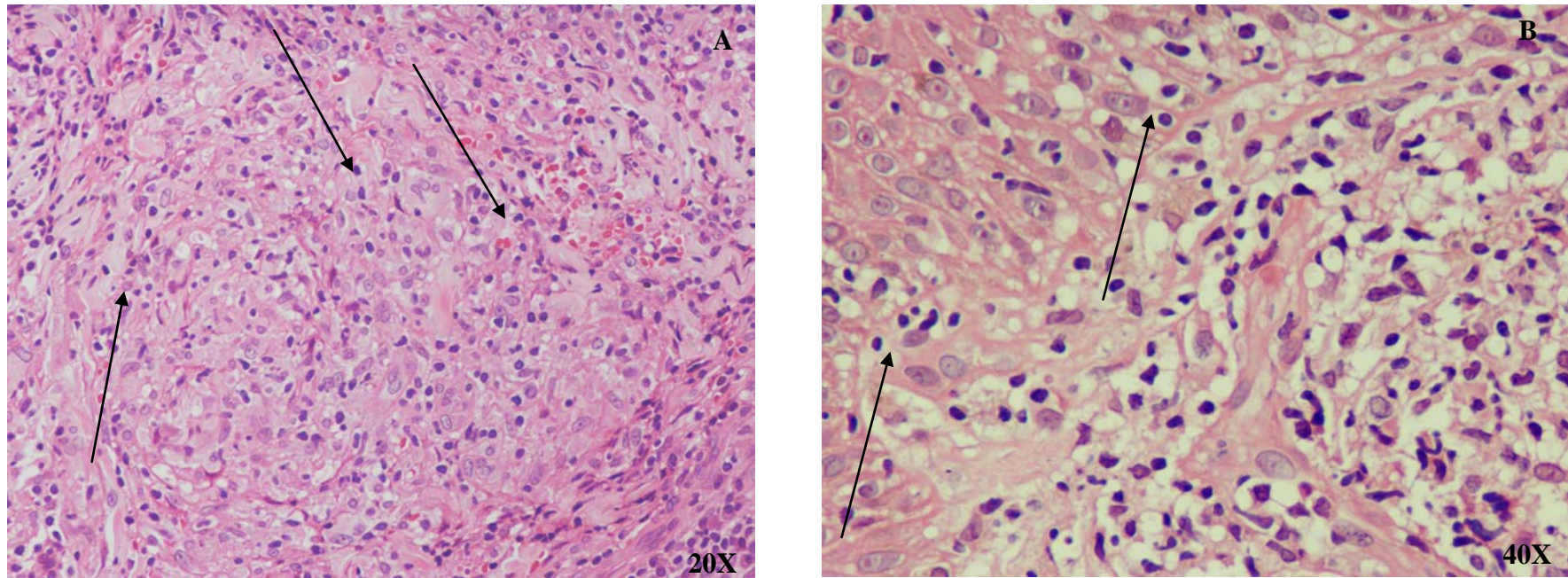


Figura 3: A: Aglomerado de macrófagos epitelioides (setas) na formação de um granuloma (aumento de 20x). B: Células na epiderme (setas) (exocitose) e presença de edema intercelular além vacuolização na camada basal da epiderme (aumento de 40x).



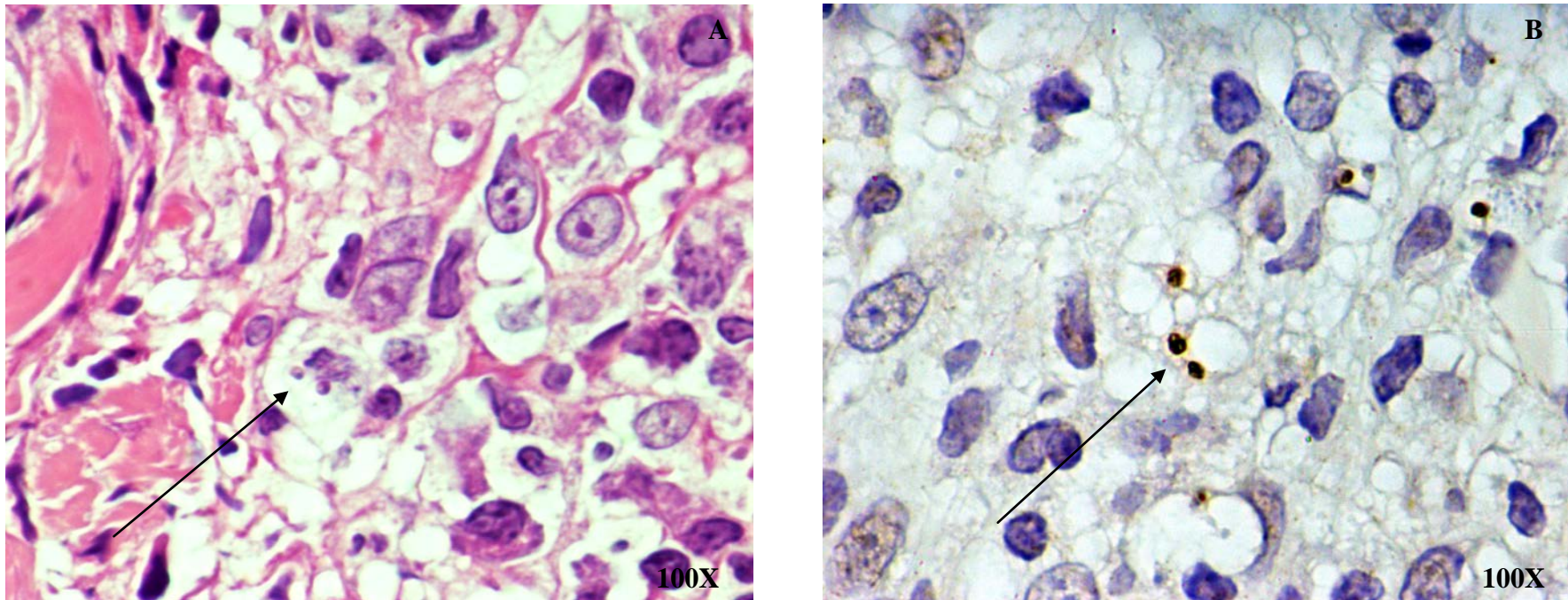


Figura 4: A: Amastigotas coradas por HE (seta). B: Amastigotas detectadas por IHQ com anticorpo policlonal de coelho anti *L. braziliensis* (seta) (100x).

As células inflamatórias nas biópsias de DL foram calculadas pelo número de células por área em  $\mu\text{m}^2$ . O número estimado de macrófagos CD68+ encontrados foi de  $103,4 \pm 64,1 \mu\text{m}^2$ , células B CD20+ foi de  $100,2 \pm 72,2 /\mu\text{m}^2$ , e T CD4+ foi de  $62,7 \pm 32,8$  células por  $\mu\text{m}^2$  (Figura 5 e 6).

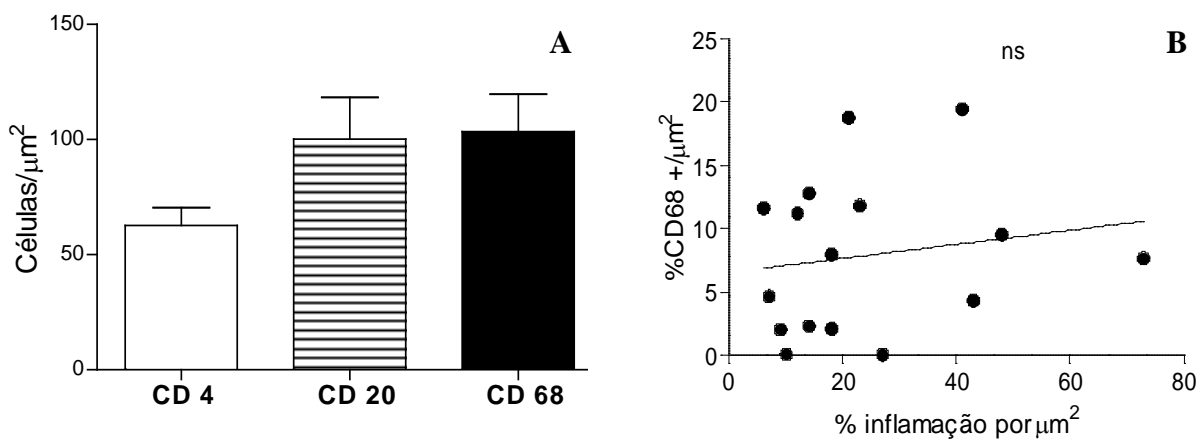


Figura 5: A: Células CD4+, CD20+ e CD68+ por  $\mu\text{m}^2$ . B: Correlação linear de Pearson entre células CD68+ e inflamação.

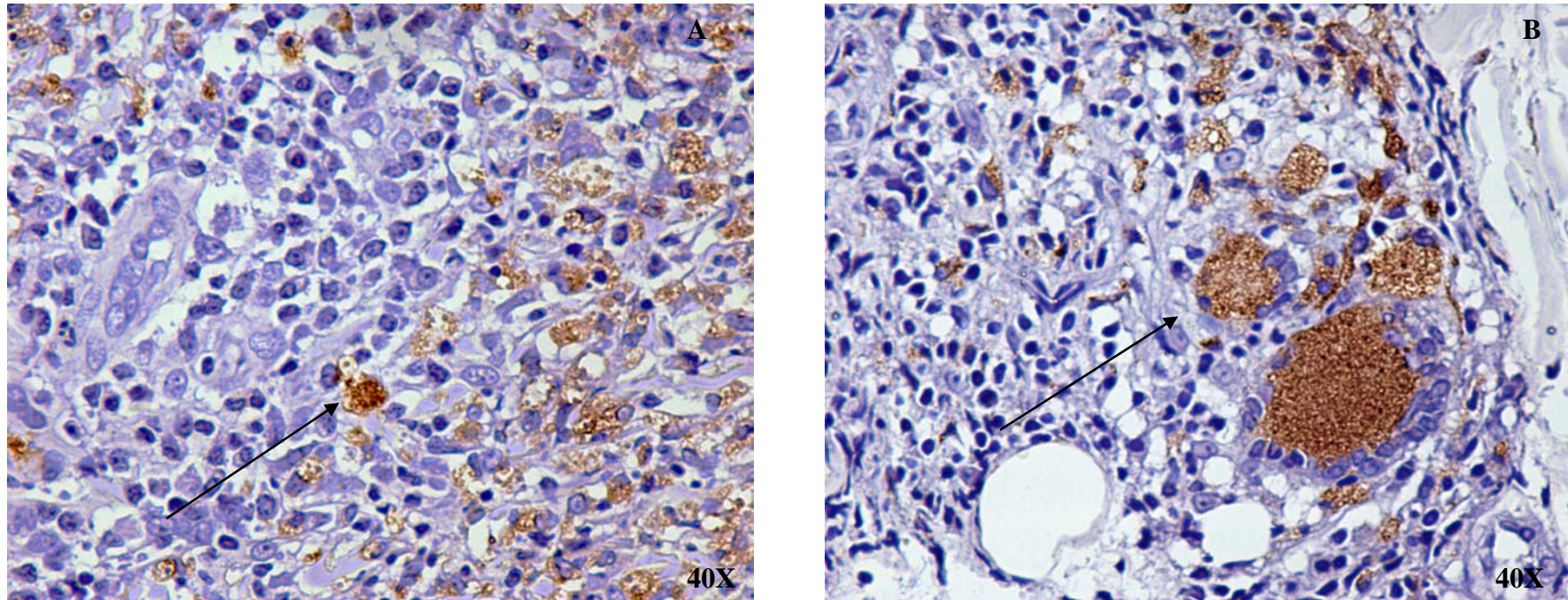


Figura 6: A: Macrófagos CD68+ (seta) (aumento de 40x). B: Células gigantes CD68+ (seta) ao lado de macrófagos (aumento de 40x).

Houve uma correlação significativa e positiva entre as células CD4+ e CD20+ e a extensão da inflamação ( $P < 0,05$ ) (Figura 7 e 8).

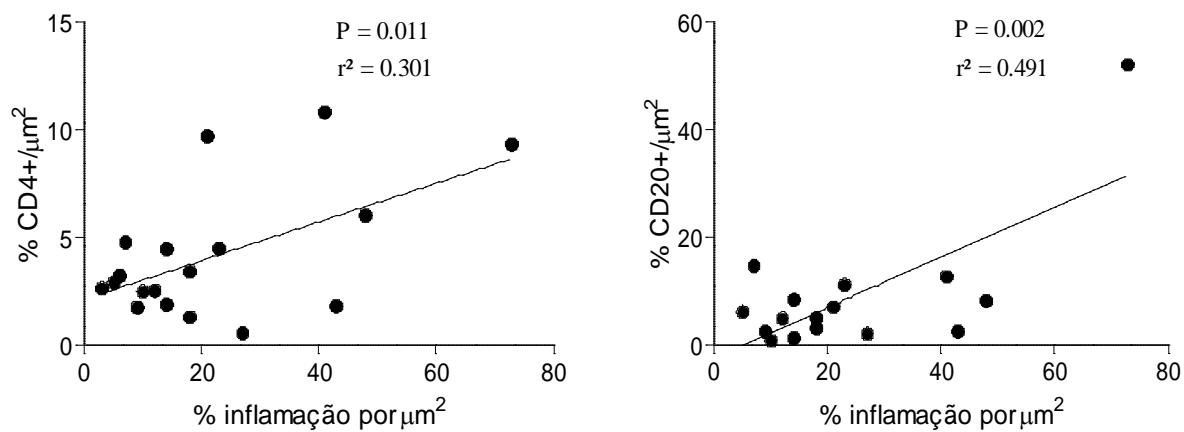


Figura 7: A: Correlação linear de Pearson entre células T CD4+ e extensão da inflamação. B: Correlação linear de Pearson entre células B CD20+ e extensão da inflamação.



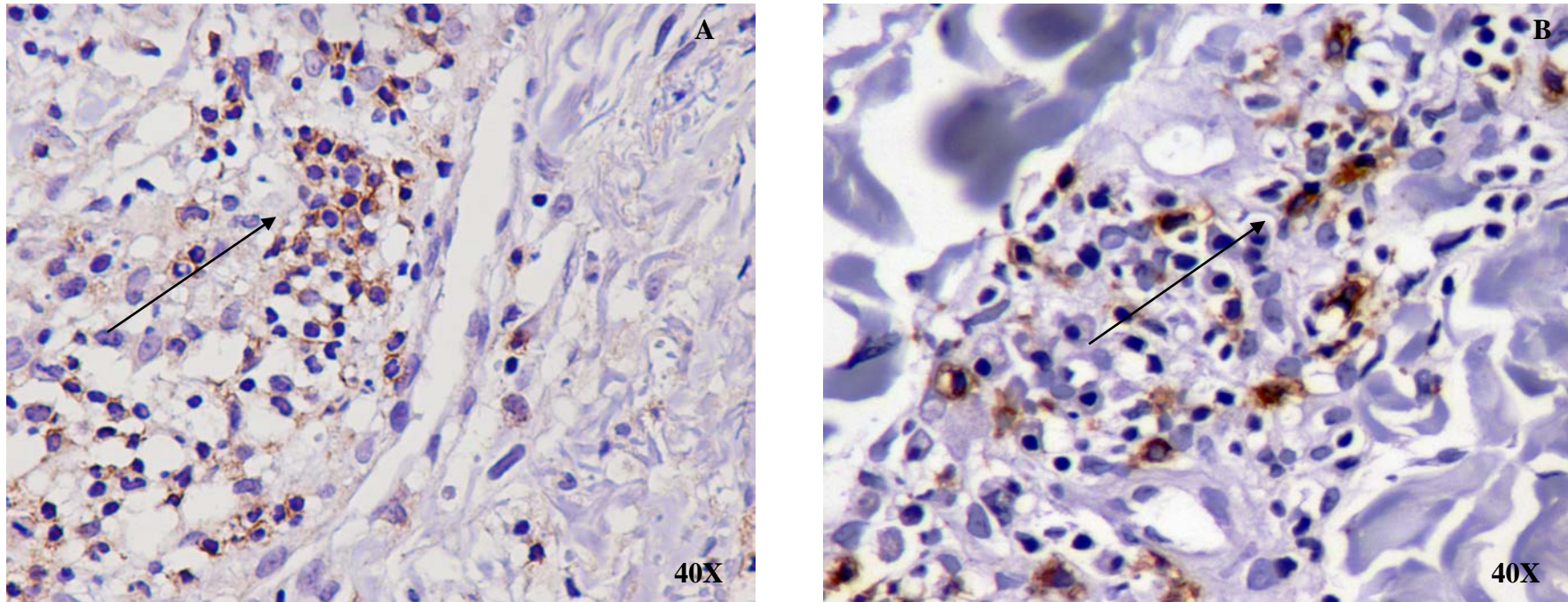


Figura 8: A: Aglomerado de células T CD4+ (seta) ao lado esquerdo do vaso seccionado verticalmente (40x). B: Células B CD20+ (seta).

Células endoteliais ativadas são proeminentes nas lesões papulares. Essa rede de capilares é vista predominantemente na derme papilar, bem como na derme superior. Edema perivascular e infiltrado linfoplasmocitário também são vistos e até mesmo nas biópsias menos inflamadas (Figura 9).

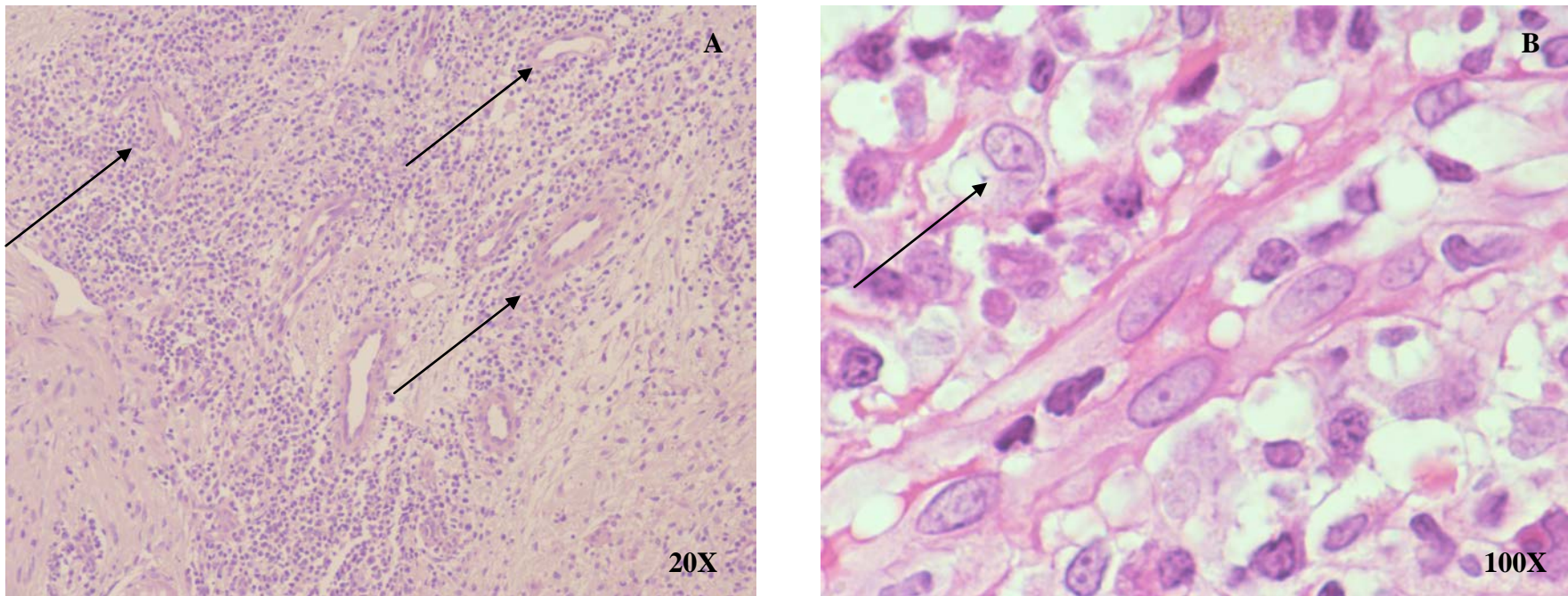


Figura 9: A: Vasos e edema com presença de inflamação (setas) (20x). B: Vaso capilar em grande aumento com infiltrado perivascular detalhado (seta) (100x).



Os vasos foram identificados por imunohistoquímica através da reação com anti CD31 e anti fator de von Willebrand. Ambos os marcadores de células endoteliais marcaram semelhantemente. Há uma correlação linear significativa entre a quantidade de vasos a extensão da inflamação ( $r^2 = 0,2859$   $p = 0,027$ ) (Figura 10).

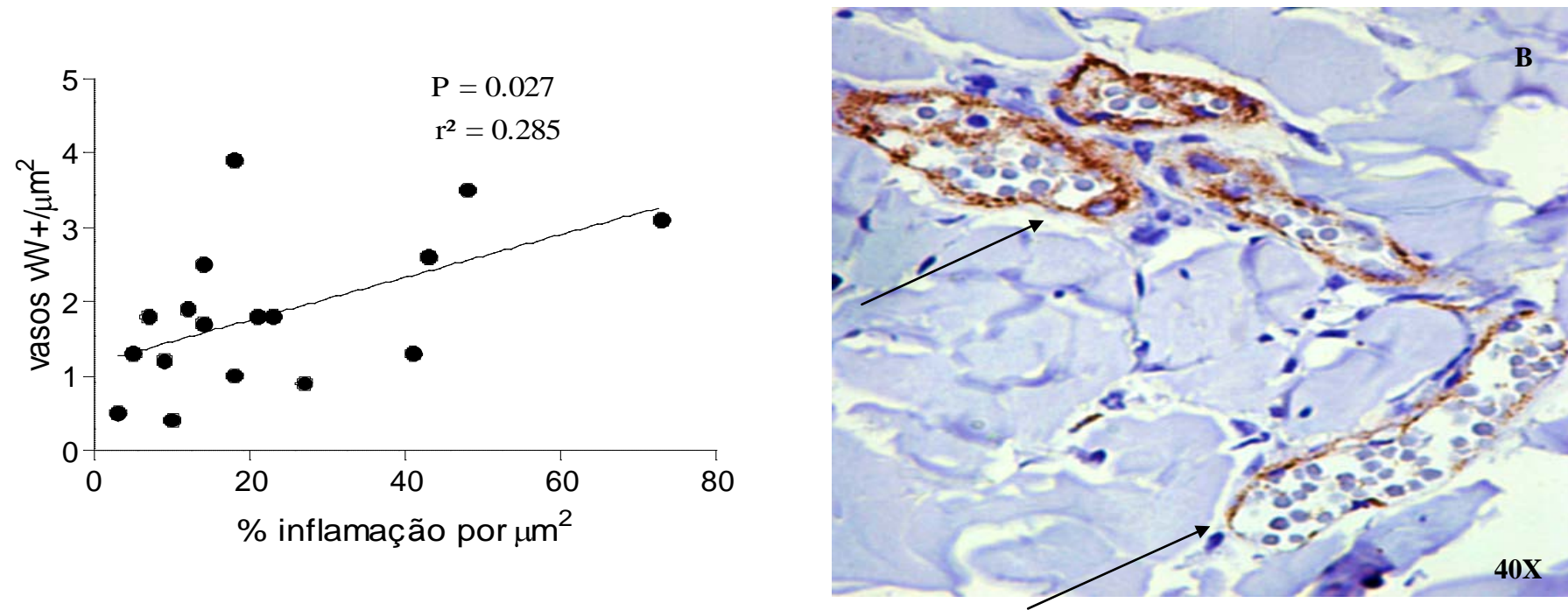


Figura 10: A: Correlação linear de Pearson entre vasos vW+ por  $\mu\text{m}^2$  e extensão da inflamação. B: Vasos na cor castanha com anticorpo anti- fator vW (setas).

Além da variação na extensão da inflamação observamos também uma variação qualitativa. Desde apenas focos inflamatórios perivascularares locais até uma inflamação difusa às vezes, com uma necrose focal. Em algumas biópsias observamos uma inflamação aparentemente mais organizada com formação de granulomas, alguns mais desorganizados e outros bem delimitados, com presença de células gigantes. Necrose caseosa não foi observada, somente necrose lítica focal foi observada nas análises dessas biópsias.

Tabela 2: Aspectos Histopatológicos

Variáveis	Positivo	Negativo	%
Edema papilar perivascular	16	2	88,9
Necrose	9	9	50
Granulomas formados	9	9	50
Plasmócitos	18	0	100
Células gigantes	4	14	22,2
Neutrófilos	6	12	33,3
Incontinência Pigmentar	14	4	77,8
amastigotas (HE)	9	9	50
amastigotas (IHQ)	10	8	55,6

## 7 DISCUSSÃO

Na análise histopatológica de lesões fechadas (pápulas) decorrentes da disseminação de *L. (V.) braziliensis*, observaram-se semelhanças com aspectos já descritos sobre biópsias de úlceras cutâneas. Em análise subjetiva, as biópsias dessas lesões fechadas revelaram a presença de muitas células plasmocitárias, linfócitos, macrófagos e alguns focos de necrose lítica, que fazem parte da descrição das bordas de úlceras de LC clássica (BITTENCOURT; BARRAL 1991).

A análise objetiva morfométrica revelou uma correlação entre a análise subjetiva em graus, com a extensão da inflamação. Esse achado corrobora com a hipótese de que algumas dessas lesões foram obtidas de lesões recentes e outras mais antigas com grau maior de organização. Esses achados, em lesões após disseminação da *L. (V.) braziliensis*, sugerem que a inflamação crônica ocorre desde o início, é progressiva que posteriormente pode evoluir para microulceração superficial ou ainda ulcerar.

O uso da técnica de imunomarcagem permitiu a constatação das células T, B e macrófagos são predominantes. Os macrófagos estão em maior número, seguidos de células B e T. No entanto, neste estudo não foi avaliado através da IHQ células como plasmócitos que são muito comuns em infiltrados inflamatórios. Com o aumento da inflamação observou-se também maior número de CD68, linfócitos T CD4+ e B CD20+. Os achados apontaram dois aspectos ainda pouco abordados em estudos histológicos anteriores de LD. Como por exemplo, a alta frequência de células B e plasmócitos encontrados nas lesões papulares que podem indicar a participação de seus anticorpos no processo patológico ou a na resposta imune para leishmaniose.

Este estudo traz pela primeira vez na literatura atenção para a histopatologia das lesões fechadas e secundárias da LD além da inflamação perivascular e associação da frequência de células endoteliais com a intensidade de áreas inflamadas no tecido. O presente estudo revelou também, pela primeira vez na literatura, que amastigotas estão presentes nas lesões secundárias na LD.

A inflamação encontrada variou de mínima até uma extensa participação, abrangendo quase todo fragmento analisado. Tal variação revela a progressão das lesões. Assim, a presença variável de infiltrado inflamatório crônico pode sugerir que o

desenvolvimento das lesões é um processo contínuo. As biópsias analisadas são de tecido acometido após a disseminação da leishmaniose a partir de um sítio inicial.

Essas lesões secundárias são pápulas que de certo modo podem ter semelhanças com a lesão inicial da leishmaniose cutânea humana ainda pouco avaliada. Por outro lado deve-se considerar que a disseminação ocorre algum tempo após a lesão inicial em somente alguns indivíduos. Se o intervalo de tempo até o início da disseminação for levado em consideração, vale ressaltar a possibilidade da sensibilização e o desenvolvimento de uma forte reação imune adquirida já ter ocorrido ao se analisar as biópsias de lesões secundárias.

Portanto ao atingir locais distante da pele, as amastigotas livres ou fagocitadas induzem uma resposta imune inflamatória específica e diferente do que ocorre nos primeiros momentos da infecção. A inflamação cutânea atinge a epiderme induzindo acantose, espongirose e exocitose. A presença de edema perivascular foi encontrada comumente e provavelmente está associada com a progressão da patologia. Infiltrações linfoplasmocitária perivascular na derme foram observadas em todas as biópsias.

Foi possível observar amastigotas com o auxílio da IHQ em 10 das 18 amostras de tecido. Todas as 18 lesões tiveram aspirado local cultivado *in vitro* positivo para *Leishmania*. Estes resultados são fortes indícios de que a inflamação do tecido exibe uma resposta antígeno específico contra a *Leishmania*. Somando os achados de amastigotas no tecido diretamente detectadas ao HE, por imunohistoquímica e crescimento em cultivo *in vitro* de *L. braziliensis* comprova que esta inflamação crônica tecidual resulta de uma resposta imune contra antígenos desse parasito após a disseminação da lesão ulcerada primária.

Portanto, em lesões por disseminação da *Leishmania* para outros locais da pele, em fase fechada, sem ter havido rompimento da epiderme, desde o início é crônica com predomínio de macrófagos, linfócitos T e B.

Os achados que se referem às células B CD20+ estão de acordo com o que foi encontrado no tecido de lesões ulceradas de pacientes com a forma difusa de leishmaniose cutânea (SCHURR et al, 1986; VIEIRA et al, 2002).

De acordo com Vieira (2002), grande quantidade de IFN $\gamma$  se encontra presente nas lesões altamente inflamadas e podem induzir a liberação de IgG, o que contribui para a fagocitose do parasita, permitindo assim a contenção do mesmo. A presença de edema em

todas as biópsias analisadas neste estudo reforça esta hipótese. Os parasitas podem usar dessa resposta e penetrar nos fagócitos (WANASEN et al, 2008).

A inflamação presente nas úlceras tem sido comumente associada com as células T, como demonstrado pela correlação positiva entre a frequência de células T CD4 produzem TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , a frequência de células de expressão da resposta de ativação de células T e a frequência de células T CD8+ expressando grupo e tamanho da lesão da úlcera ou do processo inflamatório no tecido (FARIA et al, 2009).

## 8 CONCLUSÃO

### 8.1 CONCLUSÕES PONTUAIS

Pela análise histopatológica de lesões após a disseminação da *Leishmania (Vianna) braziliensis* pode-se concluir que em pápulas acneiformes fechadas

- É uma resposta inflamatória crônica.
- Em 9 das 18 biópsias foram encontrados granulomas.
- Macrófagos foram mais frequentes que linfócitos B e T.
- Há uma correlação linear significativa entre CD20+, CD4+ e a extensão da inflamação.
- Há uma correlação linear positiva entre vasos CD31+ e vW+ com a extensão da inflamação.

### 8.2 CONCLUSÕES GERAIS

Esta é a primeira descrição histopatológica de lesões papulares, fechadas da leishmaniose cutânea humana. As demais descrições encontradas na literatura abordam apenas a histopatologia de lesões ulceradas. No presente estudo observamos que estas pápulas resultam de uma inflamação crônica que por vezes formam granulomas em resposta á presença de *Leishmania (Vianna) braziliensis*.

A extensão da inflamação é variável e compõem se principalmente de macrófagos e linfócitos T e B além de plasmócitos. Neste estudo foi possível observar que presença de linfócitos T e B é diretamente proporcionais à extensão da área de inflamação. Um aspecto descrito aqui e ainda pouco explorado nas investigações sobre a patogênese das leishmanioses é a correlação entre vasos e a inflamação tecidual.

De acordo com os achados demonstrados aqui, os vasos aumentam á medida que a inflamação se expande. Portanto, ainda que estejam relacionadas com a resposta imune, as células endoteliais contribuem com a resposta inflamatória e devem ter um papel fundamental na patogênese da leishmaniose cutânea e disseminada. A proliferação de vasos pode permitir a s disseminação do parasita e de seu crescimento. Este fenômeno vascular pode conduzir e sustentar a evolução e disseminação das lesões cutâneas.

## 9 REFERÊNCIAS

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n. 3, p. 256-9, 1995.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W. O.; GOLLOB K. J.; CARVALHO E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-40, 2002.

BARRETTO, A.C.; CUBA, C.A.C.; MARSDEN, P.D.; VEXANAT, J.A.; DE BELDER, M. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do Estado da Bahia, Brasil. 1. Leishmaniose Humana. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 90, n. 5, p. 415-24, 1981.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 51-56, 1991.

BOAVENTURA, V. S.; DE OLIVEIRA, J. G.; COSTA, J.M.; NOVAIS, F.O.; DE OLIVEIRA, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 13, p. 384-6, 2009.

BRYCESON, A. D. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 6, p. 708-37, 1969.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 135, n. 6, p. 4144-8, 1985.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S.G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 152, n. 12, p. 5949-56, 1994.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315-25, 1994.

CASTELLUCCI, L.; JAMIESON, S. E.; MILLER, E. N.; MENEZES, E.; OLIVEIRA, J.; MAGALHÃES, A.; GUIMARÃES, L. H.; LESSA, M.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; BLACKWELL, J. M. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **BMC Medical Genetics**, v. 20, p. 10-11, 2010.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDON, A. G. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 27, n. 2, p. 176-86, 1983.

CHUNG, E. S.; CHAUHAN, S. K.; JIN, Y.; NAKAO, S.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; VAN ROOIJEN, N.; ZHANG, Q.; CHEN, L.; DANA, R. Contribution of macrophages to angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor-3-specific ligands. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 5, p. 1984-92, 2009.

COSTA, J. M.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; NETTO, E. M.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; ROSA, A. C.; CUBA, C. C.; MAGALHÃES, A. V.; BARRETO, A. C. 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, 1986.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L. M.; BARRAL, A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, p. 70-83, 2009.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861-70, 2003.

FARIA, D. R.; SOUZA, P. E.; DURÃES, F. V.; CARVALHO, E. M.; GOLLOB, K. J.; MACHADO, P. R.; DUTRA, W. O. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 432-439, 2009.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 687-725, 1989.

JONES, T. C.; JOHNSON, W. D. JR.; BARRETO, A. C.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S. G.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANCA, F.; WIESE, K.; GOLIGHTLY, L.; FIKRIG, E.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN P. D. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania braziliensis brasiliensis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 73-83, 1987.

JORDAN, K. A.; HUNTER, C. A. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 318-25, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. **Robbins Basic Pathology**. 8 Ed., Saunders, 2007.



LLAMBRICH, A.; ZABALLOS, P.; TERRASA, F.; TORNE, I.; PUIG, S.; MALVEHY, J. Dermoscopy of Cutaneous Leishmaniasis. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 4, p. 756-61, 2009.

LESSA, H. A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A. A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E. M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87-9, 2001.

GUIMARÃES, L. H.; MACHADO, P. R. L.; LESSA, H. A.; LESSA, M.; D'OLIVEIRA, A.; CARVALHO, E. M. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, p. 66-74, 2005.

MACHADO, P.; ARAÚJO, C.; DA SILVA, A.T.; ALMEIDA, R. P.; D'OLIVEIRA, Jr. A.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E. M. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 12, p. 69-73, 2002.

MACHADO, P. R.; ROSA, M. E.; COSTA, D.; MIGNAC, M.; SILVA, J. S.; SCHRIEFER, A.; TEIXEIRA, M. M.; BACELLAR, O; CARVALHO, E. M. 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, 2011.

DE MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253-62, 1986.

DE MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopathology of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Histopathological classification. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 6, p. 421-30, 1986.

MANTOVANI, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 369-73, 2010.

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, 1986.

MARSDEN, P. D.; LESSA, H. A.; OLIVEIRA, M. R.; ROMERO, G. A.; MAROTTI, J. G.; SAMPAIO, R. N.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; CUBA, C. C.; MAGALHÃES, A. V.; MACÊDO, VO. Clinical observations of unresponsive mucosal leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 4, p. 543-5, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde/Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis. Burden of disease. Disponível em: [www.who.int/leishmaniasis/burden](http://www.who.int/leishmaniasis/burden). Acessado em 25 de agosto de 2010.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, p. 39-51, 2010.

RAMASAWMY, R.; MENEZES, E.; MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, J.; CASTELLUCCI, L.; ALMEIDA, R.; ROSA, M. E.; GUIMARÃES, L. H.; LESSA, M.; NORONHA, E.; WILSON, M. E.; JAMIESON, S. E.; KALIL, J.; BLACKWELL, J. M.; CARVALHO, E. M.; DE JESUS, A. R. The - 2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 5, p. 607-13, 2010.

REAL, C.; CAIADO, F.; DIAS, S. Endothelial progenitors in vascular repair and angiogenesis: how many are needed and what to do? **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 8, n. 3, p. 185-93, 2008.

RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BRÖCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 699-709, 1996.

ROCHA-VIEIRA, E.; FERREIRA, E.; VIANNA, P.; DE FARIA, D. R.; GAZE, S. T.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Histopathological outcome of *Leishmania major*-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine. **Immunology**, v. 108, n. 3, p. 401-8, 2003.

RUSSO, D. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; REED, S. G. Human T-cell responses in *Leishmania* infections. **Progress in Clinical Parasitology**, v. 3, p. 119-44, 1993.

RYAN, T. J. The blood vessels of the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, p. 110-8, 1976.

SANTOS, J. B.; LAUAND, L.; SOUZA, G. S.; MACÊDO, V. O. Socioeconomic factors and attitudes towards household prevention of American cutaneous leishmaniasis in an endemic area in Southern Bahia, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública / Ministério da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 701-8, 2000.

SAHARINEN, P.; BRY, M.; ALITALO, K. How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors? **Current Opinion in Hematology**, v. 17, n. 3, p. 198-205, 2010.

SCHRIEFER, A.; SCHRIEFER, A. L.; GÓES-NETO, A.; GUIMARÃES, L. H.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; MACHADO, P. R.; LESSA, H. A.; DE JESUS, A. R.; RILEY, L. W.; CARVALHO, E. M. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 508-14, 2004.

SCHURR, E.; KIDANE, K.; YEMANEBERHAN, T.; WUNDERLICH, F. Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre. **American Journal of Tropical Medicine Parasitology**, v. 37, p. 403-408, 1986.

SOUZA-LEMOS, C.; DE-CAMPOS, S. N.; TEVA, A.; CÔRTE-REAL, S.; FONSECA E. C.; PORROZZI, R.; GRIMALDI, G. Jr. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. **Journal of Pathology**, v.216, n. 3, p. 375-86, 2008.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 32-40, 2006.

TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R. P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, Jr. W.; CARVALHO, E. M. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1829-1834, 2002.

VIEIRA, L. Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 827-35, 1996.

VIEIRA, M. G. S.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, A. L.; BARBOSA, Jr. A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell Infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 979-983, 2002.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 417-429, 2008.

ZAHN, S.; KIRSCHSIEFEN, P.; JONULEIT, H.; STEINBRINK, K.; VON STEBUT, E. Human primary dendritic cell subsets differ in their IL-12 release in response to *Leishmania major* infection. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 10, p. 924-6, 2010.

## ANEXO 1



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisas



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

### PARECER Nº 221/2010

**Protocolo: 321**

**Projeto de Pesquisa:** “Diagnóstico e Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Humana”.

**Pesquisador(a) Responsável:** Dr. Sérgio Marcos Arruda

**Instituição ou Departamento:** LASP - Laboratório Avançado de Saúde Pública

#### Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios anual e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

**Vigência:** 28/04/2010 a 31/03/2012

**Envio de Relatório Anual em:** 28/04/2011

**Relatório Final:** 28/04/2012

*The present study, entitled “Diagnóstico e Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Humana”. (protocol number 321) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in April 28<sup>th</sup> 2010 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008. In the present version, this project is licensed and valid until April 28<sup>th</sup> 2012.*

Salvador, 29 de Abril de 2010.

*Adriana Lanfredi Rangel*

**Dr<sup>a</sup> Adriana Lanfredi Rangel**

Coordenadora em Exercício do Comitê de Ética em Pesquisa  
 CPqGM/FIOCRUZ  
 IORG-0002090 / IRB-00002612

**ANEXO 2***CARTA DE APROVAÇÃO REFERENTE À BOLSA PARA O CONGRESSO  
INTERNACIONAL DE PATOLOGIA (IAP)***Sao Paulo 2010 IAP International Congress IAP Education Committee****LETTER OF APPROVAL**

Dear Dr. Mendes,

I am pleased to inform you that your application for a Sao Paulo Congress Bursary has been approved by the IAP Education Committee.

You should shortly receive the letter of instruction from Jim Crimmins, Assistant Treasurer, at the USCAP Office e-mail: [jim@uscap.org](mailto:jim@uscap.org) as to how the Bursary money will be administered and paid.

Please note, that at the conclusion of the Congress you will be expected to send a brief report to the Education Committee on your participation and activities at the Athens Congress.

Please note also, that should you encounter a problem in the next few months which prevents you from taking up the Bursary, please inform me immediately as there is a waiting list of standby pathologists.

With best wishes

Kristin Henry. Chairman, IAP Education Committee

## APÊNDICE 1

ABSTRACT APRESENTADO NO CONGRESSO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA E

PUBLICADO NA HISTOPATHOLOGY EM EDIÇÃO ESPECIAL

### Histopathology

Special Issue: Abstracts of the XXVIIIth International Congress of the International Academy of Pathology, 10-15 October 2010, Transamérica Hotel Conference Center, São Paulo, Brazil

Volume 57, Issue Supplement s1, pages 1–270, October 2010

Article first published online: 28 SEP 2010 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03637.x

### Histopathology of human disseminated leishmaniasis lesions

Mendes DS<sup>1</sup>, Loyola M<sup>1</sup>, Gomes J<sup>1</sup>, dos-Santos WLC<sup>2</sup>, Queiroz A<sup>3</sup>, Guimarães LH<sup>3</sup>, D'Oliveira Jr<sup>3</sup>, A, Machado PR<sup>3</sup>, Carvalho EM<sup>3</sup>, Arruda S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública - <sup>2</sup>Serviço de Histotecnologia - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. <sup>3</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia. Salvador – Bahia – Brazil

### Abstract

**Background:** Skin infection by *Leishmania braziliensis* leads to different clinical forms. Among clinical spectrum, disseminated leishmaniasis (DL) differs from others by the clinical manifestation of multiple acneiform papules and non-ulcerated lesions. Our aim was to describe the histopathology of DL lesions, correlating them with inflammation, CD4, CD20, CD68, CD31 cells and Von Willebrand factor (VW) amount.

**Design:** Biopsies from 18 patients diagnosed by clinical criteria, positive skin test and FNA in vitro cultivation were analyzed. Histopathological aspects were obtained by analysis of H&E stained slides. To quantify inflammation and cell positivity for CD4, CD20, CD 68, CD31 and VW Image-Pro (Media Cybernetics) software was used.

**Results:** Diffuse lymphoplasmocytic perivascular infiltrate and granulomas not well organized was found in dermal skin. Inflammation extent varied from 3% to 73% presenting a significant linear correlation with VW+ vessels and with graded patterns. The most frequent inflammatory cells were macrophages (CD68+) followed by B cells (CD20+) and T cells (CD4+). Significant linear correlation between CD4+ and CD20+ cells and inflamed area was also found. In biopsies higher inflamed we found greater amount of CD31+ cells. Amastigotes were visualized or immunostained in 8 biopsies.

**Conclusions:** Our findings suggests that inflammatory cells might play contradictory roles in the pathogenesis of leishmaniasis. Inflammation found in DL increases proportionally with vessels. Thus, the present study highlights the possible role small vessels may have in clinical evolution and spectrum from acneiform papules to larger nodular skin lesions.

**Dayana Santos Mendes:** [dayanasantosmendes@gmail.com](mailto:dayanasantosmendes@gmail.com). Rua Waldemar Falcão 121 Horto - 40296-710 Salvador- Bahia- Brazil- FIOCRUZ.

## APÊNDICE 2

### **Inflammation correlates to cells and vessels in disseminated leishmaniasis**

Dayana S Mendes BS<sup>\*</sup>, Marina L Dantas BS<sup>\*</sup>, Juliana M Gomes<sup>\*</sup>, Maria Elisa A Rosa MD<sup>†</sup>, Washington Luis C dos Santos MD PhD<sup>\*</sup>, Adriano Q Silva MS<sup>†</sup>, Luiz Henrique Guimarães MD<sup>†</sup>, Paulo R Machado MD PhD<sup>†</sup>, Edgar M de Carvalho MD PhD<sup>†</sup> and Sérgio Arruda MD PhD<sup>\*</sup>

*<sup>\*</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.*

*<sup>†</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brazil.*

#### **ABSTRACT**

Disseminated leishmaniasis (DL) differs from other clinical forms by the presence of many non-ulcerated lesions (papules and nodules) in non-contiguous areas of the body. We describe the histopathology of DL non-ulcerated lesions correlating CD4, CD20, CD68, CD31 and von Willebrand factor (vW) positivity with inflamed area.

Eighteen biopsies from non-ulcerated lesions were analyzed. We quantified the inflamed area and the expression of CD4, CD20, CD68, CD31 and vW using the Image-Pro software (Media Cybernetics).

Diffuse lymphoplasmacytic perivascular infiltrates were also found in dermal skin. Inflammation extension varied from 3% to 73%, presenting a significant linear correlation with vW+ vessels. The most frequent cells were CD68+ macrophages, CD20+ B cells and CD4+ T cells. A significant linear correlation between CD4+ and CD20+ cells and inflamed area was also found. Our findings showed chronic inflammation in all DL non-ulcerated lesions predominantly formed by macrophages, plasmacytes, T and B cells. As the inflammation area expands the amount of granulomas and vascular framework increases. Thus, we highlight that vessels may have an important role in the clinical evolution of DL lesions.

**Keywords:** Disseminated leishmaniasis, histopathology, immunohistochemistry.

Corresponding author and reprints: Sérgio Arruda, e-mail: sa@bahia.fiocruz.br, postal address: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão n°121, ZIP Code: 40296-710, Salvador, Bahia, Brazil. Telephone: +55 71 3176-2232/fax: +55 71 3176-2300.

**Support:** This study was supported by the National Institutes of Health (NIH) grant AI-30639.

## 1. Introduction

Skin infection by *L. braziliensis* promastigotes results in different forms of cutaneous lesions that include but are not limited to localized (CL), disseminated (DL) and mucocutaneous forms. DL was first described clinically in 1986<sup>1</sup> and immunologically described in 2002<sup>2</sup>. DL can be distinguished from other forms of leishmaniasis by the clinical manifestation of multiple acneiform, papules and nodular lesions in two or more non-contiguous areas of the body<sup>3-4</sup>. The ulcer, likely in the same place as the hematophagous insect bite, is the primary lesion of CL and DL<sup>4</sup>. These ulcerated lesions share the same histopathological aspects in both CL and DL<sup>5</sup>. Although the dissemination mechanism remains unclear, the ulcerated lesions in CL and DL are indistinguishable. Tissue analyses of typical CL are required to diagnose CL or DL. Histopathological analysis of the CL ulcer reveals a chronic perivascular infiltrate of lymphocytes, plasmacytes, macrophages, epithelioid and giant cells, all of which eventually arrange in granulomas with or without necrosis<sup>4</sup>. Prior to the formation of ulcers, patients with early CL present with a non-ulcerated lesion<sup>6</sup>. However, biopsies of early CL are difficult to obtain because patients usually seek out for medical attention until when they have an ulcerated lesion. Therefore, in this study we have analyzed non-ulcerated lesions from DL patients to construct a hypothetical model for early CL. We have chosen to study these lesions given that primary lesions in CL are similar to non-ulcerated disseminated lesions. Lesions were analyzed by quantifying the extension of inflammation and their with vessels expressed by CD31 and von Willebrand's factor (vW). In parallel, we have also quantified and correlated inflammation with the expression of CD4, CD20, and CD68 cell markers.

## 2. Material and Methods

### 2.1. DL Patient selection

All patients included in this study were recruited from Corte de Pedra, a village located southwest of Salvador in the state of Bahia, Brazil. Informed consent was obtained from all patients, and the project was approved by the Human Ethics Committee of the Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ. Patients under 18 years of age were included with the



approval of their parents or other guardian. Patients who were on treatment and children under 4 years old were excluded from the study.

## **2.2. DL Diagnostic criteria**

Patients were clinically diagnosed for disseminated leishmaniasis. The diagnosis was confirmed by positive delayed-type hypersensitivity (DTH) to leishmanial antigens via the Montenegro skin test, histopathological identification of *Leishmania* amastigotes and positive culture of *Leishmania in vitro*. The DTH test was considered positive when the skin induration measurement was  $\geq 5$  mm after 48 to 72 hours after the injection of *Leishmania* promastigote antigens (0.1 ml) intradermally into the internal side of the left forearm.

## **2.3. Biopsies**

Only non-ulcerated, papular and nodular lesions were biopsied and included in this study. A 4-mm-diameter punch was used after application of local anesthesia as routinely done at the health care facility for posterior diagnosis. All biopsies were maintained in formalin (10%) for a period of 24 hours or less. The tissue samples were dehydrated and embedded in paraffin blocks. Five-micron slices were stained by hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) to exclude the possibility of infection by fungi.

## **2.4. Histopathological analysis**

The histological analysis included objective and subjective reasoning as well as morphometry and immunohistochemistry procedures. Conventional methodology (paraffin embedding and HE staining) was also used.

## 2.5. Immunohistochemistry (IHC)

Four-micrometer sections were obtained from paraffin-embedded tissue and mounted onto 3-aminopropyltriethoxysilane-coated glass slides. Sections were deparaffinized with xylene and rehydrated with descending graded alcohols and distilled water. Peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes. Sections were antigen-retrieved in a 96 °C bath with citrate buffer (DAKO target retrieval solution) as needed, and nonspecific reactions were blocked with 3% powder milk for 20 minutes. The slides were incubated for one hour with anti-CD4, anti-CD20, anti-CD31, anti-CD68, anti-vW and rabbit anti-*Leishmania braziliensis* antibodies with respective dilutions of 1:10, 1:20, 1:15, 1:500, 1:50 and 1:1600 at 25°C. The immunostaining was performed using an Envision TM+Dual Link System- HRP (DAB) (DAKO K4065-1). All slides were counter-stained with Harris hematoxylin, dehydrated and mounted with Canadian balsam and glass cover slips. Sections were analyzed by optic microscopy (NIKON E-600).

## 2.6. Morphometric analysis

All stained sections were captured using an optical microscope coupled to a digital color video camera at 400x magnification. The resulting images were morphologically analyzed semi-automatically with the Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) software.

Positivity was defined as the identification of structures marked in brown as visualized with the chromogen diaminobenzidine. For amastigotes, the size, shape and location of structures within vacuoles of macrophages were also considered.

Quantitative analysis of cell populations of CD4+ T-lymphocytes, CD20+ B-lymphocytes, CD68+ macrophages, CD31+ and vW factor + endothelial cells was determined by measuring the positive areas in captured images. Positive cells were manually counted on a computer monitor by circling stained cells. Vessel areas marked with anti-CD31 and anti-vW factor were quantified by circling all of the marked vessel lumen. The number of positive cells was expressed in cells/ $\mu\text{m}^2$ .

## 2.7. Representation and statistical analysis of results

The data were presented in tables and graphics in which the numbers represent absolute values or proportions. The data was validated by applying the linear correlation of Pearson. Significance was accepted at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

Secondary skin lesions emerged after *L. braziliensis* dissemination. These secondary lesions were in general acneiform, papular or nodular and non-contiguous with the primary ulcer. In this study, we biopsied and analyzed non-ulcerated lesions that occurred in 18 patients with DL (Fig. 1A).

DL was not equally distributed between males (65%) and females (35%). The mean age  $\pm$  standard deviation (SD) was  $29 \pm 14$  years (median: 27; ranges: 5-50 years). Patients presented more than 10 nodular lesions (Table 1). Histopathological analysis revealed a chronic inflammatory reaction in all 18 biopsies.

All fragments of non-ulcerated lesions displayed a lymphoplasmacytic infiltrate, which varied from 3% to 73% in its extension; a rich vascularized framework was also observed (Fig. 1B). Other general histopathological findings aside of vessels in papillary dermis in all 18 biopsies: perivascular and papillary edema (16), vasculitis (6), necrosis (9), granulomas (9), giant cells (4), rare neutrophils (6) and pigmentary incontinence (14).

Amastigotes were observed frequently in HE stained slide (9) biopsies; by Immunohistochemistry, we were able to detect amastigotes in 10 of 18 biopsies (Fig. 1C).

All fine needle aspirates from non-ulcerated lesions grew *L. braziliensis*.

The inflammatory cells in non-ulcerated biopsies were quantified by number of cells per  $\mu\text{m}^2$ . The following results were calculated: CD68+ macrophages in  $103.4 \pm 64.1$  cells/ $\mu\text{m}^2$ , CD20+ B cells in  $100.2 \pm 72.2$  cells/ $\mu\text{m}^2$  and CD4+ T cells in  $62.7 \pm 32.8$  cells/ $\mu\text{m}^2$  (Fig. 1D; Fig. 2A). CD20+ B cells and CD4+ T cells were significantly associated with the extent of inflammation (Fig. 2B; Fig. 3A and B). Other cells at the site of inflammation were not identified with the three cell markers used. It is likely that CD8+ T cells, plasmocytes and undifferentiated cells could also be associated with inflammation in skin lesions after *Leishmania* dissemination.

Vessels and activated endothelial cells were prominent in the skin lesions. Small capillaries were seen at the papillary dermis as well as in the superior dermis. Perivascular edema and a lymphoplasmacytic infiltrate were also seen even in the less inflamed biopsies (Fig. 3C). Vessels were identified by immunostaining using anti-CD31 and anti-vW factor (Fig. 4A and B). Both endothelial cell markers reacted similarly (data not shown). There is a significant linear correlation between vessels and the inflammation extent ( $r^2 = 0.2859$ ;  $P = 0.027$ ) (Fig. 4C).

#### 4. Discussion

DL lesions differ clinically from CL lesions, which are characterized by ulcerated skin lesions. DL leads to the formation of multiple non-ulcerated lesions with a greater number of pleomorphic cells than CL lesions, which indicates the participation of inflammation during early infection.

However, our data pointed out two aspects not previously emphasized in the histological studies of CL. First, the high frequency of B cells and plasmocytes in non-ulcerated lesions points to a role of antibodies in the pathological process of or immune response to *Leishmania*. Secondly, this is the first time attention has been given to the perivascular inflammation and the association of frequency of endothelial cells with the inflamed area in non-ulcerated lesions.

Inflammation ranged from minimal to extensive infiltration in the analyzed tissues that demonstrated evidence of pathological changes in the evolution of the disease. Thus, the varying extent of chronic inflammatory infiltrates may suggest that the development of lesions is a continuous process.

Dermal inflammation reaches the epidermis, causing acanthosis, spongiosis and exocytosis (data not shown). Perivascular edema was commonly found and is probably associated with the progression of pathology. Lymphoplasmacytic perivascular infiltrations in the dermis were observed in all non-ulcerated lesions. We observed amastigotes by IHC in 10 out of 18 tissue samples and in all 18 aspirations taken from non-ulcerated lesions grown *in vitro*. These results are strong indications that tissue inflammation displays a *Leishmania* antigen-specific response.

A great number of CD20+ B cells were found in ulcerated lesions and in the Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) which is a rare manifestation of leishmaniasis, characterized by multiple, slowly progressive nodules or plaques without ulcers<sup>8-9</sup>. According to a previous study<sup>9</sup>, large amounts of IFN- $\gamma$  from highly inflamed lesions may induce B cells to release anti-IgG, which may contribute to efficient phagocytosis, allowing parasite containment. The presence of edema in all biopsies analyzed for this study may reinforce this assumption. Parasites may take advantage of this response by penetrating into phagocytes<sup>10</sup>.

Inflammation in CL has been associated with T cells, as demonstrated by a positive correlation between the frequency of CD4 T cells producing TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ , the frequency of cells expression and lesion size of the ulcer or the inflammatory process in tissue<sup>10</sup>. Here we show that B cells are also involved in the pathology because there is a correlation between the presence of CD20+ B cells and tissue inflammation. Further studies exploring the role of B cells in the pathogenesis of *L. braziliensis* should be performed.

CD4+ T cells are well implicated in the immune response against *Leishmania* and are the main source of IFN- $\gamma$  in CL<sup>12</sup>. With the evolution of the disease, a higher number of CD4+ T cells become related to the presence of IFN- $\gamma$ <sup>11-13</sup>. As the disease evolves, a growing number of CD4+ T cells produce IFN- $\gamma$ . Our analysis of CD4+ T cells is consistent with a mechanism of inflammation progression in which CD4+ T cells activate macrophages against amastigotes. Our analysis of CD4+ T cells was expected given the growing chronic inflammation seen in *L. braziliensis* tissue<sup>14-15</sup>.

Macrophages are not the only type of cell that host *Leishmania* amastigotes, but once activated, they may control the parasite's growth. Th1 and Th2 lymphocytes, as well as macrophages, generate IL-10, which may down regulate IFN- $\gamma$ <sup>11</sup>. Previous studies have shown that CD68+ cells release IL-10 during different stages of leishmaniasis lesions. Greater expression of IL-10 at more inflamed sites may regulate the host response to tissue damage and posterior healing. In accordance with the cited studies, DL demonstrated a higher quantity of macrophages in biopsies from more inflamed samples, but we found no significant correlation among them<sup>11</sup>.

Our study highlights a correlation between the presence of granulomas and inflammation in *L. braziliensis* infected tissue. This finding may be an indication of the immune

modulation of tissue inflammation. Among numerous T cells and macrophages, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the inflamed tissue lead a more organized inflammatory response that results in granulomas<sup>6</sup>. Granulomas were present in 50% of the biopsies analyzed, these biopsies were also observed to be among the ones with more inflammation area. The total amount of cells that were immune-marked in tissue samples added 30% of the entire fragment measured. All other cells composing the fragment inflammatory infiltrate may be plasmocytes, CD8 + T cells, natural killer or mast cells, among other cells not analyzed in this study.

Furthermore, in less inflamed tissue, a diffuse cellular infiltration remained surrounding small venules. Our data demonstrates a relevant correlation between vW+ cells and inflammatory infiltrates. Therefore, our analysis presents the possibility that vessels are present and may proliferate from an early stage of the disease. The amount of CD31+ cells were similar to vW factor when vessels were enumerated (data not demonstrated).

We hypothesize that vessels play a crucial role in the early events after *L. braziliensis* dissemination. Thus, the increasing expression of vW in the vasculature of DL non-ulcerated lesions is a potential regulator of lesion growth<sup>16-17</sup>.

As our results indicate, vessel proliferation may allow parasite survival and growth. This phenomenon could lead and sustain the evolution of cutaneous lesions. Tissue immune inflammation in non-ulcerated lesions functions as a low-level simulator for the infiltrate of the ulcerated lesions.

Non-ulcerated lesions apparently have a variety of inflammation intensities, ranging from moderate to intense and organized within granulomas. Our findings suggest that chronic inflammation was present in all non-ulcerated lesions and was predominantly formed by macrophages, plasmocytes, T cells and B cells. As the area of inflammation expands, granulomas and vascular frameworks increase proportionally. Thus, this study highlights the possible role small vessels may have in the clinical evolution and spectrum from nodular skin lesions to large skin ulcers. Further analysis to evaluate the role of angiogenesis in early lesions may further elucidate this process.

## References

1. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field

- clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986; 89; 319-321.
2. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson Jr W, Carvalho EM. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002; 186; 1829-1834.
  3. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HÁ, Ribeiro de Jesus A, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004; 72; 508-514.
  4. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86; 51-56.
  5. Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994;56; 315-325.
  6. Machado P, Araujo C, Silva AT. Failure of Early Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Preventing the Development of an Ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002; 34; 69-73.
  7. Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba-Cuba C, Marsden PD. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões Histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop.* 1986; 28; 253-262.
  8. Schurr E, Kidane K, Yemaneberhan T, Wunderlich F. Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Am J Trop Med Parasito.* 1986; 37; 403-408.
  9. Vieira MGS, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa Jr AA, Barral-Netto M, Barral A. B-cell Infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97; 979-983.
  10. Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *International Journal for Parasitology.* 2008; 38; 417-429.
  11. Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31; 432-439.
  12. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005; 101; 226-230.
  13. Carneiro FP, De Magalhães AV, Couto AJALA, Bocca al, Muniz-Junqueira MI, Sampaio

- RNR. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31; 646-651.
14. De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98; 861-870.
15. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100; 525-534.
16. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54; 385-395.
17. Low EQ, DiPietro LA. Quantification of Wound Angiogenesis. 2003; 78; 319-327.

**Table 1. Clinical characteristics**

Variable	<i>n</i> = 18
Age (mean in years = SD)	29 ± 14
Sex (female/male)	06/12
Number of positive <i>Leishmania</i> cultures	18
Duration of disease (mean in days = SD)	44 ± 25
Number of secondary lesions	10 to < 1000



Figures:

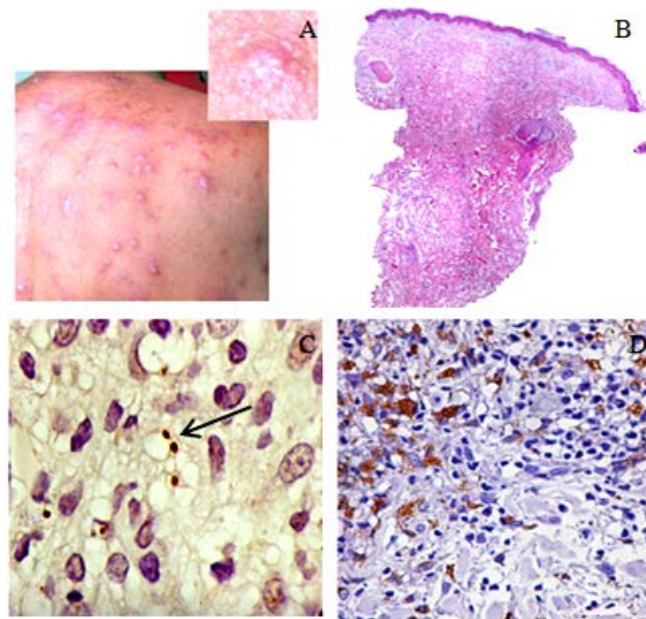


Fig.1. (A) Clinical characteristics of patient diagnosed with DL due to *L. braziliensis* dissemination. The insert shows a detail of a typical non-ulcerated lesion. (B) HE stained section of a non-ulcerated lesion biopsy with 3% of inflammation (C) Immunostained *Leishmania* amastigotes (x 1000) (arrow). (D) Immunostained CD68+ macrophages (x 400).

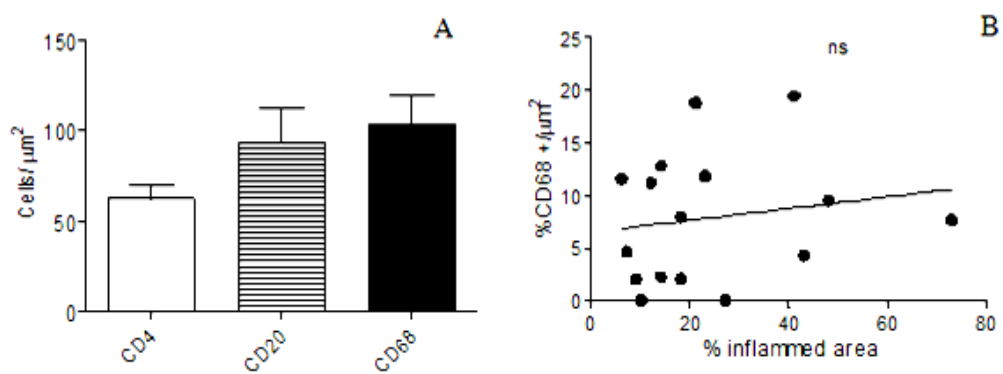


Fig. 2. (A) CD4+T cells, CD20+ B cells and CD68+ macrophages per  $\mu\text{m}^2$ ; CD68+ macrophage cells are the most abundant cells and increase with the extent of inflammation. (B) Pearson's correlation (not significant) coefficient between CD68+ cells and the inflammation extent of skin lesions after *L. braziliensis* dissemination.

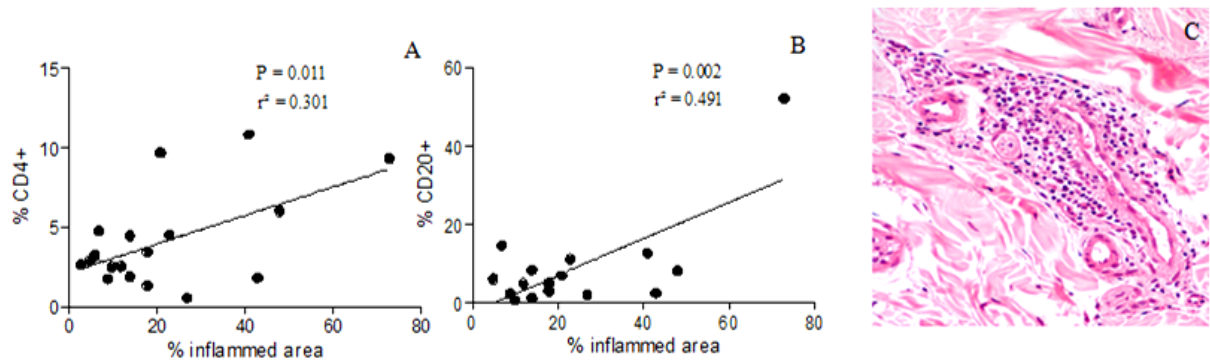


Fig. 3. (A) Linear correlations of Pearson between CD4+T and inflamed area. (B) Linear correlations of Pearson between CD20+ B cells and inflamed area. (C) Chronic perivascular vascular inflammation stained with HE (x 200).

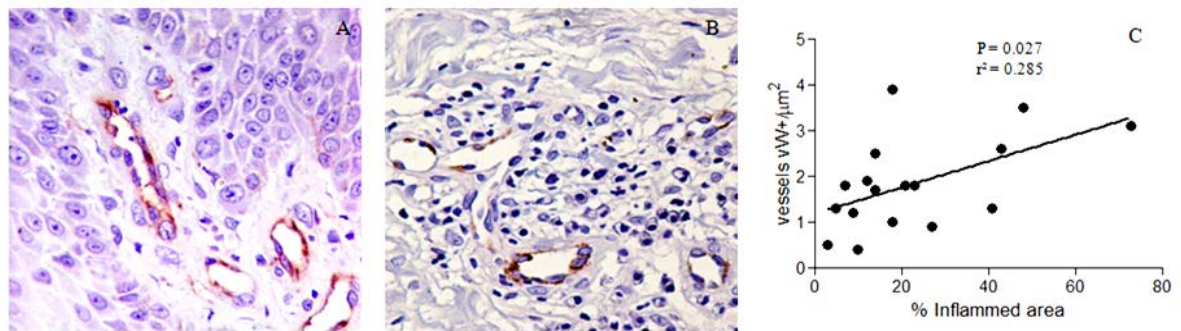
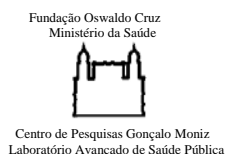


Fig. 4. (A) Immunostained CD31+ small vessels (x 400). (B) Immunostained von Willebrand factor + in the dermis (x 400). (C) Linear correlation of Pearson between vW+ vessels and inflammation in the eighteen non-ulcerated lesions analyzed after *L. braziliensis* dissemination.

## APENDICE 3



### 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 não participação na pesquisa 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 (LC).

#### **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 em 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 4 mm) será realizada no local da lesão para o diagnóstico e pesquisa desta 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 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:**

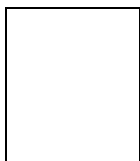
Está assegurada a liberdade do paciente de recusar ou de se retirar do estudo, o consentimento do paciente também assegura a comunicação junto aos pesquisadores para esclarecimentos e conhecimento dos resultados dos exames e condições de acompanhamento bem como orientação e tratamento nos ambulatórios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

Estou ciente e fui esclarecido (a) de que as informações obtidas estão submetidas às normas éticas sobre a pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, resolução nº196/96 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 sobre as minhas dúvidas.

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

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



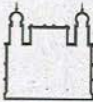

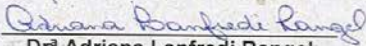
Impressão Datiloscópica (em caso de não saber assinar o nome)

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

Assinatura do (a) pesquisador (a): \_\_\_\_\_



## APENDICE 4

 <p>Ministério da Saúde  <b>FIOCRUZ</b>  <b>Fundação Oswaldo Cruz</b>          Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisas</p>  <p>CEP          FIOCRUZ-BA</p>
<b>Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ</b>	
<h3>PARECER Nº 221/2010</h3>	
<p><b>Protocolo: 321</b></p>	
<p><u>Projeto de Pesquisa:</u> “<b>Diagnóstico e Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Humana</b>”.</p>	
<p><u>Pesquisador(a) Responsável:</u> <b>Dr. Sérgio Marcos Arruda</b></p>	
<p><u>Instituição ou Departamento:</u> <b>LASP - Laboratório Avançado de Saúde Pública</b></p>	
<p><b>Considerações:</b></p>	
<p>Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.</p>	
<p>Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga <b>aprovado</b> o projeto supracitado.</p>	
<p>O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios anual e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.</p>	
<p><u>Vigência:</u> <b>28/04/2010 a 31/03/2012</b></p>	
<p><u>Envio de Relatório Anual em:</u> <b>28/04/2011</b></p>	
<p><u>Relatório Final:</u> <b>28/04/2012</b></p>	
<p><i>The present study, entitled “<b>Diagnóstico e Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Humana</b>”, (protocol number 321) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in April 28<sup>th</sup> 2010 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008. In the present version, this project is licensed and valid until April 28<sup>th</sup> 2012.</i></p>	
<p>Salvador, 29 de Abril de 2010.</p>  <p><b>Drª Adriana Lanfredi Rangel</b>          Coordenadora em Exercício do Comitê de Ética em Pesquisa          CPqGM/FIOCRUZ          IORG-0002090 / IRB-00002612</p>	
<hr/> <p>Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40.296-710, Brasil. Tel: (55)-(71) 3176-2285          Fax: (55)-(71) 3176-2327, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br</p>	