

Fabiana Pirani Carneiro

**Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3 nas
diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar
Americana**

Brasília

2009

Fabiana Pirani Carneiro

**Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3 nas
diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar
Americana**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília para obtenção do título de
Doutora em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

Brasília

2009

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incentivo e apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães pela oportunidade e por ser um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Mário Moraes a quem admiro pela sua sabedoria e paciência.

Aos colegas médicos do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília pela atenção e amizade.

Aos funcionários (secretários e técnicos) do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília pelo auxílio na confecção das lâminas e fornecimento dos laudos.

À Maria de Jesus Abreu Almeida Couto pela concessão de amostras e dados clínicos dos pacientes com Leishmaniose cutânea difusa.

Ao Gustavo Horita pelo desenvolvimento do programa de análise de imagem (Unbvision).

À doutoranda Gilcilene Maria dos Santos que gentilmente forneceu a identificação das espécies de leishmânia causadoras das lesões.

RESUMO

Considerando o papel importante da apoptose e da célula T reguladora (Treg) na modulação da resposta imune, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de proteínas envolvidas na apoptose e a expressão do fator de transcrição Foxp3 (marcador da célula Treg) em amostras de biópsia das diferentes formas clínicas da LTA (leishmaniose tegumentar americana): leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose recidiva cútis (LRC), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). Essa expressão foi correlacionada com dados clínico-laboratoriais, alterações histológicas e tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório. Foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de marcadores para linfócito T (CD45RO, CD4 e CD8), linfócito B (CD20), neutrófilo (CD15), macrófago (CD68), célula de Langerhans (CD1a), dos marcadores da apoptose (Bcl-2, Bak, Bcl-X, FasL, caspase-3 ativa) e do marcador para célula T reguladora (Foxp3) em 95 amostras de biópsias que foram distribuídas de acordo com as formas clínicas apresentadas pelos pacientes: LCL (n=68), LD (n=3), LRC (n=1), LCM (n=16) e LCD (n=7). Células apoptóticas (positivas para caspase-3 ativa) foram identificadas em apenas 49.33% (37/75) das amostras avaliadas. A maior expressão de caspase-3 ativa foi observada na LCL e houve uma correlação positiva entre a expressão de caspase-3 ativa e a expressão de FasL ($r=0,49$; $p=0,0009$; $n=43$) nesta forma clínica. Estes dados sugerem que a via Fas/FasL seja mediadora da apoptose na LTA e importante na evolução clínica das lesões, já que a LCL é a forma clínica caracterizada pela resolução espontânea das lesões. Houve um desequilíbrio na expressão de membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 em macrófagos e granulomas epitelioides, que expressaram Bak, mas não Bcl-2 e Bcl-X. Nas formas amastigotas, a expressão de Bcl-X sugere a possível existência de uma proteína, semelhante à Bcl-X encontrada em organismos multicelulares, mas esse achado deve ser investigado por outros métodos. Células Foxp3⁺ foram observadas apenas em 39.5% (32/81) das amostras avaliadas. A LCD, apesar de apresentar um menor número de células CD4⁺, mostrou um número significativamente maior de células Foxp3⁺ quando comparada com a LCL ($p<0,03$) e estes resultados podem indicar que o maior número de células Treg na LCD possa estar associado com a hiporresponsividade observada nessa forma clínica. Além disso, a correlação positiva ($r=0,6185$, $p=0,0001$, $n=64$) entre a expressão de Foxp3 e caspase-3 ativa observada na LCL e LCM, sugere que a apoptose possa ser um possível mecanismo de ação das células Treg nestas formas clínicas.

Descritores: Leishmaniose Tegumentar americana, apoptose, Célula T reguladora, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Considering the importance of apoptosis and regulatory T cell (Treg) in modulation of the immune response, our aim was to evaluate the expression of apoptosis-related proteins and Foxp3 (marker of regulatory T cell) in lesions of the different clinical forms of ATL (american tegumentary leishmaniasis): localized cutaneous leishmaniasis (LCL), disseminated leishmaniasis (DL), leishmaniasis recidiva cutis (LRC), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). To better characterize this expression, we also performed an analysis of histopathological findings and an identification of cell types found in inflammatory infiltrate. We analyzed, by immunohistochemistry, the expression of markers of cell subtypes (CD45RO, CD4, CD8, CD20, CD68, CD15, CD1a), markers of apoptosis (Bcl-2, Bak, Bcl-X, active caspase-3 and FasL) and presence of Foxp3⁺ cells in 95 biopsy samples that were divided according to the different clinical presentations of ATL: LCL (n=68), MCL (n=16), DCL (n=7), DL (n=3), LRC (n=1). Apoptotic cells (active caspase-3⁺) were observed in 49.33% (37/75) of the samples and the number of positive cells was low in all clinical forms. Apoptotic (active caspase 3⁺) cells were more frequent in LCL and a significant positive correlation between the expression of active caspase-3 and FasL was observed in this clinical form. As LCL is the clinical presentation characterized by self-healing evolution, our data suggest the Fas/FasL pathway may be important in clinical evolution of the lesions in ATL. An unbalance in expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family was observed in vacuolated macrophages and granuloma that expressed Bak but not Bcl-X and Bcl-2. The expression of Bcl-X in amastigote forms suggests a possible existence of “counterparts” or “homologues” of the Bcl-X observed in multicellular organisms, but this finding must be investigated by other methods. Foxp3⁺ cells were observed in 39.5% (32/81) of the samples and the number of positive cells was low in all the clinical forms. DCL (diffuse cutaneous leishmaniasis), even presenting a significantly lower number of CD4⁺ T cells, showed a higher expression of Foxp3 when compared with LCL and this data suggests that increased number of Treg cells may be associated to the hyporesponsiveness observed in DCL. In LCL and MCL, the number of Foxp3⁺ cells correlated positively with the number of apoptotic cells (active caspase 3⁺ cells) indicating that the apoptosis may be a possible mechanism of action of Foxp3⁺ regulatory T cell in these clinical forms.

Keywords: American tegumentary leishmaniasis, apoptosis, regulatory T cell, immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
HE	Hematoxilina & Eosina
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor-related protein</i>
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LD	Leishmaniose disseminada
LRC	Leishmaniose recidiva cútis
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
PCR	Reação de polimerase em cadeia
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T reguladora
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end Labeling)</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Ta	T auxiliar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais nas formas clínicas da LTA.....	34
Tabela 2 - Frequência (porcentagem e número de casos positivos) das alterações histopatológicas nas formas clínicas da LTA e no controle.....	36
Tabela 3 - Frequência (porcentagem e número de casos positivos) das alterações histopatológicas na LCL de acordo com a espécie de leishmânia.....	36
Tabela 4 - Mediana, número máximo e mínimo de células/mm ² positivas para marcadores celulares nas formas clínicas e no controle.....	41
Tabela 5 - Frequência de amostras positivas para os marcadores de apoptose e Foxp3 nas formas clínicas da LTA e no controle.....	50
Tabela 6 - Mediana, número máximo e mínimo de células/mm ² positivas para marcadores de apoptose e para Foxp3 nas diferentes formas clínicas e no controle.....	50
Tabela A1 - Anticorpos e seus respectivos clones, diluições, códigos e fabricantes utilizados nas reações imuno-histoquímicas.....	79
Tabela A2 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCL.....	83
Tabela A3 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LD.....	84
Tabela A4 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCM.....	84
Tabela A5 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCD.....	84
Tabela A6 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LRC.....	84
Tabela A7 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCL.....	86
Tabela A8 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LD.....	87
Tabela A9 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCM.....	87
Tabela A10 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCD.....	87
Tabela A11 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LRC.....	87
Tabela A12 - Alterações histopatológicas nas lesões do controle.....	87
Tabela A13 - N ^o de células/mm ² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LCL.....	89
Tabela A14 - N ^o de células/mm ² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LD.....	90
Tabela A15 - N ^o de células/mm ² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LCM.....	90
Tabela A16 - N ^o de células/mm ² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LCD.....	90
Tabela A17 - N ^o de células/mm ² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 na lesão de LRC.....	90

Tabela A18 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 no controle.....90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Infiltrado de mononucleares na amostra 10 da LCL (HE, 400X); (B) Granuloma epitelióide na amostra 16 da LCL (HE, 200X); (C) Fibrose com células gigantes multinucleadas na amostra 4 do controle (HE, 200X); (D) Fibrose na amostra 5 da LCD (HE, 200X); (E) Célula gigante multinucleada na amostra 2 da LCM (HE, 400X); (F) Infiltração da cartilagem por mononucleares na amostra 4 da LCM (HE, 200X); (G) Área de necrose na amostra 9 da LCM (HE, 200X); (H) Macrófagos vacuolizados na amostra 4 da LCD (HE, 400X).....37
- Figura 2 - (A) Hiperplasia epitelial na amostra 12 da LCM (HE, 100X); (B) Exocitose de linfócitos na amostra 15 da LCM (HE, 400X); (C) Ulceração na amostra 23 da LCL (HE, 100X).....38
- Figura 3 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica em amostras das formas clínicas. Células positivas coradas em marrom. (A) Células CD45RO⁺ na derme da amostra 16 da LCL (400X); (B) Células CD4⁺ na derme da amostra 13 da LCL (400X); (C) Células CD8⁺ na derme da amostra 13 da LCL (400X); (D) Células CD45RO⁺ na epiderme da amostra 3 da LCL (400X); (E) Células CD20⁺ na derme da amostra 31 da LCL (400X); (F) Células CD68⁺ na derme da amostra 6 da LCL (400X); (G) Células CD15⁺ na lâmina própria da amostra 1 da LCM (400X); (H) Células CD1a⁺ na epiderme da amostra 15 da LCL (400X).....42
- Figura 4 - Número de células/mm² CD45RO⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço indica a média de células/mm² positivas. A média de células positivas nas amostras de LCD foi significativamente menor do que a média nas amostras de LCL e LCM (ANOVA, p=0,0214).....43
- Figura 5 - Número de células/mm² CD8⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente menor de células CD8⁺ quando comparada com a LCL (Kruskal-Wallis, p= 0,0026).....43
- Figura 6 - Número de células/mm² CD4⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente menor de células CD4⁺ quando comparada com a LCL e LCM (Kruskal-Wallis, p= 0,0025).....44
- Figura 7 - Número de células/mm² CD20⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A mediana de células positivas foi significativamente maior na LCL e LCM quando comparada com a mediana na LCD (Kruskal-Wallis, p= 0,0085).....44
- Figura 8 - Número de células/mm² CD68⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço indica a média de células/mm² positivas. Não houve diferença significativa entre as formas clínicas.....45
- Figura 9 - Número de células/mm² CD15⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCM apresentou um número significativamente maior de células CD15⁺ quando comparada com a LCL e LCD (Kruskal-Wallis, p= 0,0016).....45
- Figura 10 - Número de células/mm² CD1a⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal indica a mediana de células/mm² positivas. Na LCM, a mediana foi significativamente menor do que na LCL (Kruskal-Wallis, p< 0,0001).....46
- Figura 11 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica no controle. Células positivas coradas em marrom. (A) Células CD4⁺ na derme (400X); (B) Células CD8⁺ na derme

- (400X); (C) Células CD20⁺ na derme (400X); (D) Células CD15⁺ na derme (400X); (E) Células CD68⁺ na derme (400X); (F) Células CD1a⁺ na epiderme (400X).....47
- Figura 12 - Células positivas (coradas em marrom) para caspase-3 ativa na amostra 4 da LCL (IHQ-400X).....50
- Figura 13 - Número de células/mm² caspase-3 ativa⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A diferença entre as formas clínicas não foi significativa.....51
- Figura 14 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica. Células positivas coradas em marrom. (A) Plasmócitos intensamente positivos para FasL com marcação paranuclear (seta) na amostra 5 da LCL (1000X). (B) Macrófagos vacuolizados negativos para FasL (seta) na amostra 7 da LCD (400X); (C) Células mononucleares positivas para FasL ao redor de um granuloma negativo na amostra 2 da LCL (400X);(D) Células mononucleares positivas para FasL no controle (400X).....52
- Figura 15 - Número de células/mm² FasL⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. Não houve diferença significativa entre as formas clínicas.....53
- Figura 16 - Correlação entre o número de células/mm² FasL⁺ e o número de células caspase-3 ativa⁺ na LCL. Houve uma correlação positiva entre a expressão de FasL e caspase-3 ativa ($r=0,49$; $p=0,0009$; $n=43$).....53
- Figura 17 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica. Células positivas coradas em marrom. (A) Células mononucleares positivas para Bcl-2 e macrófagos vacuolizados negativos (seta) na amostra 2 da LCD (400X); (B) Células mononucleares positivas para Bcl-2 ao redor de um granuloma negativo na amostra 4 da LCL (400X); (C) Leishmânias dentro dos macrófagos positivos para Bcl-X na amostra 2 da LCD (1000X); (D) Células mononucleares positivas para Bcl-2 no controle (400X).....54
- Figura 18 - Número de células/mm² Bcl-2⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente menor de células Bcl-2⁺ quando comparada com a LCL e LCM (Kruskal-Wallis, $p= 0,0316$).....55
- Figura 19 - Células positivas (coradas em marrom) para Foxp3 na amostra 1 LCD (IHQ-1000X).....55
- Figura 20 - Número de células/mm² Foxp3⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente maior de células Foxp3⁺ quando comparada com a LCL (Kruskal-Wallis, $p= 0,03$).....56
- Figura 21 - Correlação entre o número de células/mm² Foxp3⁺ e o número de células caspase-3 ativa⁺ na LCL e LCM. Houve uma correlação positiva entre a expressão de Foxp3 e caspase-3 ativa ($r=0,6185$, $p=0,0001$, $n=64$).....56
- Figura A1 - Demonstração do uso do Unbvision na identificação manual de células positivas e contagem automática (seta).....81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Leishmaniose tegumentar americana	17
2.1.1 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana	18
2.2 Apoptose	21
2.2.1 Apoptose e leishmaniose	22
2.3 Célula T reguladora Foxp3⁺	23
2.3.1 Célula T reguladora Foxp3⁺ e leishmaniose	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Pacientes e amostras de biópsia	28
4.2 Histopatologia	28
4.3 Imuno-histoquímica	29
4.4 Análise estatística	30
5. RESULTADOS	32
5.1 Descrição e análise da casuística	32
5.2 Descrição e análise das alterações histopatológicas	35
5.3 Descrição e análise da expressão imuno-histoquímica	39
5.3.1 População celular	39
5.3.2 Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3	48
6. DISCUSSÃO	58
6.1 Discussão sobre os métodos	58
6.2 Discussão sobre os resultados	59
7. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICES	78

A Etapas da técnica de imuno-histoquímica e anticorpos utilizados.....	78
B Demonstração do uso do Unbvision.....	81
C Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCL, LD, LCM, LCD e LRC.....	83
D Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCL, LD, LCM, LCD e LRC.....	86
E N ^o de células/mm ² positivas para os marcadores imuno-histoquímicos na LCL, LD, LCM, LCD e LRC.....	89
ANEXOS	92
A Parecer do comitê de ética.....	92
B Artigo aceito para publicação em revista.....	94
C Artigo submetido e revisado pela revista.....	111

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é caracterizada por um espectro de manifestações clínicas que varia da leishmaniose cutânea localizada (LCL) até formas clínicas mais graves como a leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose recidiva cutis (LRC), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). Estas diferentes formas clínicas são determinadas principalmente pela espécie de leishmânia envolvida e pela resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. No Brasil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* é um dos principais agentes etiológicos da LCL e LCM, enquanto *Leishmania (Leishmania) amazonensis* predomina na LCD (GRIMALDI; TESH, 1993). A susceptibilidade do hospedeiro à doença está associada principalmente ao comprometimento da resposta imune mediada pelos subtipos de linfócitos T CD4⁺. A LCM é caracterizada por hiper-responsividade e destruição tecidual, enquanto a LCD tem sido associada com hiporresponsividade tissular e persistência do parasito (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; CARVALHO *et al.*, 1985).

Vários fatores estão envolvidos na regulação da resposta imune, entre eles, a apoptose das células do sistema imune e a ação de células T reguladoras (Treg). A importância da apoptose das células do sistema imune na resolução da leishmaniose tem sido demonstrada em lesões causadas por diferentes espécies de *Leishmania* (CHAKOUR *et al.*, 2003; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1998; MOORE; MATLASHEWSKI, 1994). A apoptose também tem sido descrita nos parasitas, contudo os mecanismos envolvidos e sua importância na patogênese da doença, ainda não estão bem definidos (NGUEWA *et al.*, 2004). As células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ controlam a resposta imune excessiva mediada pelas células T e apresentam diferentes mecanismos supressivos, entre eles a apoptose das células T efetoras (TANG; BLUESTONE, 2008; ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008). Na infecção pela *Leishmania major*, há evidências de que a presença dessa célula Treg está associada à persistência do parasito nas lesões (PETERS; SACKS, 2006). Apesar de já ter sido identificada em lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, o papel da Treg na determinação das diferentes formas clínicas da LTA ainda não está bem definido (JI *et al.*, 2005; CAMPANELLI *et al.*, 2006).

Considerando a resposta imune do hospedeiro fundamental na evolução das lesões, nossa hipótese é de que a presença da célula Treg e a apoptose das células

do sistema imune sejam fatores importantes na determinação das diferentes formas clínicas da LTA. O objetivo deste estudo foi, portanto, determinar a expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3 nas lesões das diferentes formas clínicas da LTA e correlacionar essa expressão com dados clínicos, alterações histológicas e tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose tegumentar americana

Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por espécies do protozoário do gênero *Leishmania* e amplamente distribuída nos países da América Latina (BASANO; CAMARGO, 2004). No Brasil, a LTA tem sido descrita em todas as regiões geográficas e apresenta elevada prevalência nas regiões norte, nordeste e centro-oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

As leishmanioses são antroponoses e seus ciclos de transmissão variam de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasitos, vetores, reservatórios e hospedeiros (GRIMALDI; TESH, 1993). No Brasil, já foram identificadas sete espécies causadoras da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies envolvidas na doença são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sendo a maioria dos casos causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes ao Gênero *Lutzomyia*. Como reservatórios da doença, têm sido descritas várias espécies de animais silvestres (roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres) e domésticos (canídeos felídeos e equídeos).

A transmissão da leishmaniose ocorre através da picada dos vetores infectados pela *Leishmania* (de ALMEIDA *et al.*, 2003). A fêmea do flebotomíneo, ao picar os reservatórios infectados, adquire a forma amastigota do protozoário, que se transforma em forma promastigota (forma flagelada) no intestino dos vetores. As promastigotas são as formas infectantes do parasito que interagem com as células do sistema fagocítico mononuclear, perdem o flagelo e, sob a forma amastigota, passam a se multiplicar no interior dos macrófagos.

A partir da inoculação da leishmânia na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro (BARRAL-NETO *et al.*, 1986; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; CARVALHO *et al.*, 1985; CASTES *et al.*, 1983). A leishmânia é um parasito intracelular obrigatório e a imunidade específica na leishmaniose é basicamente mediada por células T CD4⁺. Os linfócitos T auxiliares (T_a) CD4⁺ estão subdivididos em duas subpopulações funcionalmente diferentes no que se refere à secreção de citocinas, correlacionadas com a

resistência ou a susceptibilidade à infecção por leishmânia: o subtipo Ta1, que secreta interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e o subtipo Ta2, secretor de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e TGF- β (Transforming Growth Factor-beta). Além da célula T CD4⁺, há evidências de que a célula T CD8⁺ seja necessária para o controle da infecção, liberando IFN- γ e provocando citólise das células hospedeiras infectadas (RUIZ; BECKER, 2007).

Dependendo da resposta imune do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* envolvida, o indivíduo infectado pode permanecer assintomático ou desenvolver um espectro de formas clínicas (CONVIT *et al.*, 1993; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

2.1.1 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose cutânea (LC) pode ser subdividida clinicamente em forma localizada (LCL), forma disseminada (LD), forma recidiva cútis (LRC) e forma cutânea difusa (LCD) (MARZORCHI; MARZORCHI, 1994). A LCL é a forma mais comum e de melhor prognóstico sendo causada predominantemente por *L. (V.) braziliensis*. Na LCD, o principal agente etiológico é *L. (L.) amazonensis* e, pelo predomínio da resposta do tipo Ta2, apresenta o pior prognóstico. A LD e a LRC são formas clínicas muito raras.

Na LCL, a lesão é geralmente do tipo úlcera, única ou múltipla, ocorre na mesma região da picada do vetor, apresenta tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento.

A LD apresenta lesões numerosas e distantes do local das picadas, que surgem provavelmente por disseminação do parasito por via hemática ou via linfática. A resposta ao tratamento é satisfatória, embora, para a maioria dos pacientes, uma ou mais séries adicionais de tratamento sejam necessárias para alcançar a cura clínica (CARVALHO *et al.*, 1994).

A LRC caracteriza-se por evoluir com cicatrização do centro da lesão e atividade nas bordas (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998).

Na leishmaniose cutânea difusa (LCD), as lesões podem ser de vários tipos (nódulos, verrugas ou placas). O tratamento geralmente é ineficaz e as recidivas são frequentes.

A leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) é causada predominantemente por *L. (V.) braziliensis* sendo caracterizada por predomínio da resposta do tipo Ta1. As lesões acometem principalmente a mucosa nasal e causam coriza, obstrução nasal e até ulceração e perfuração de septo nasal. A resposta terapêutica não é adequada e as recidivas são freqüentes (LESSA *et al.*, 2007; MARSDEN, 1994). De acordo com a classificação proposta por Marzochi e Marzochi (1994), a LCM pode ser dividida clinicamente em: tardia, concomitante, contígua, primária e indeterminada. A forma tardia caracteriza-se pelo aparecimento da lesão mucosa anos após o surgimento da lesão cutânea; na forma indeterminada, não há identificação da porta de entrada, supondo-se que as lesões mucosas sejam originadas de infecção sem manifestação cutânea clínica prévia; na forma concomitante, a lesão mucosa é simultânea a uma lesão ativa da pele; na forma contígua, o envolvimento da mucosa ocorre em decorrência da expansão de uma lesão cutânea pré-existente e, na forma primária, a lesão da mucosa é causada pela picada do vetor diretamente na mucosa, sendo restrita às mucosas labial e genital.

O diagnóstico laboratorial da LTA se constitui fundamentalmente dos seguintes grupos de exames: parasitológicos, imunológicos, moleculares e histopatológico.

Os exames parasitológicos consistem em demonstração direta do parasito, isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo) e isolamento *in vivo* (inoculações em animais). Em lesões causadas por *L. (V.) braziliensis*, a escassez parasitária, característica dessa espécie, diminui a sensibilidade desses exames, aumentando a probabilidade de resultados falso-negativos. Quanto mais recente for a lesão, maior será a chance de a *Leishmania* ser encontrada (FURTADO, 1980; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os exames imunológicos são constituídos pelos testes sorológicos (reação de imunofluorescência indireta - IFI) e pela intradermoreação de Montenegro (IDRM). Os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes são diretamente proporcionais à atividade da infecção. Após a cura clínica, os títulos dos testes sorológicos tendem a diminuir rapidamente (em poucos meses) (MENDONÇA, 1988). O teste de Montenegro, que indica a presença de resposta imune celular, é positivo (≥ 5 mm) na grande maioria dos pacientes com LCL e LCM e negativo na LCD. Apesar da sua grande importância diagnóstica, a positividade

desse teste não significa doença em atividade, mas exposição a antígenos do parasito (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os exames moleculares consistem principalmente em diversas técnicas de PCR (reação de polimerase em cadeia) de alta sensibilidade e especificidade e que permitem também a identificação da espécie (LASKAY, 1995; VICTOIR *et al.*, 2003). Utilizando técnicas de PCR, é possível identificar a presença de DNA da *Leishmania* na maioria das amostras das lesões de formas clínicas com escassez parasitária, como a LCL e LCM, e até mesmo em cicatrizes, sugerindo que há persistência do parasito apesar da cura clínica (MENDONÇA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SCHUBACH *et al.*, 2001).

O exame histopatológico, além de contribuir para a eventual demonstração do parasito, possibilita o diagnóstico diferencial com outras entidades de etiologia infecciosa ou não, que apresentam aspectos clínicos e epidemiológicos semelhantes aos da leishmaniose tegumentar. Com relação às alterações histopatológicas, várias classificações têm sido propostas e correlacionadas com aspectos clínicos (BITTENCOURT; BARRAL, 1991; MAGALHÃES *et al.*, 1986; RIDLEY *et al.*, 1980). Nas regiões onde há predomínio de *L. (V.) braziliensis*, Magalhães *et al.* (1986) observaram que o infiltrado inflamatório nas lesões de LCL e LCM se caracterizava por um predomínio de linfócitos, plasmócitos e histiócitos, com escassez parasitária e quantidade variável de granulomas e necrose. Esses achados foram classificados em seis tipos de reação tissular: reação exsudativa celular, reação exsudativa e necrótica, reação exsudativa e necrótico-granulomatosa, reação exsudativa e granulomatosa, reação exsudativa e sarcoidiforme e reação exsudativa e tuberculóide. Na LCD, diferentemente das outras formas, o infiltrado é constituído predominantemente por macrófagos vacuolizados repletos de leishmânias.

A técnica de imuno-histoquímica aumenta a probabilidade de detecção do parasito nos cortes histológicos e identifica os tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório na LTA e, por isso, tem sido amplamente utilizada em pesquisas (AMATO; ANDRADE; DUARTE, 2003; DIAZ *et al.*, 2002; KENNER *et al.*, 1999; MORGADO *et al.*, 2008). As células mais frequentes no infiltrado inflamatório são os linfócitos T de memória (CD45RO⁺). Não há consenso na literatura sobre o tipo de células T (CD4⁺ ou CD8⁺) predominante nas formas clínicas. A LCD é a forma clínica que apresenta o menor número de células T. Os outros tipos de célula observados no infiltrado são os linfócitos B (CD20⁺), macrófagos (CD68⁺) e

neutrófilos (CD15⁺). Através da análise da expressão imuno-histoquímica das citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β) também é possível saber se há predomínio da resposta Ta1 ou Ta2.

2.2 Apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular programada que ocorre em numerosos eventos fisiológicos e patológicos. As células apoptóticas apresentam algumas alterações morfológicas típicas como retração celular, condensação e marginação da cromatina na membrana nuclear, cariorrexe e formação de corpos apoptóticos. Além disso, uma série de alterações bioquímicas tem sido observada tais como exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática, alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de proteínas mitocondriais, ativação de caspases e clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais (SARASTE; PULKKI, 2000). A identificação destas alterações morfológicas e bioquímicas permite distinguir a apoptose dos outros tipos de morte celular (GALLUZI *et al.*, 2007).

A apoptose é basicamente mediada pelas vias extrínseca e intrínseca que resultam na ativação da cascata das caspases, que são as proteases que atuam em uma série de proteínas celulares e, portanto, responsáveis pelas alterações morfológicas características da apoptose. A caspase executora mais importante é a caspase-3 (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006).

A via extrínseca é desencadeada por sinais que surgem dos receptores da morte, localizados na superfície celular, os quais são ativados por ligantes, tais como fator de necrose tumoral (TNF) e FasL (CD95L). A apoptose mediada por Fas e pelo seu ligante FasL é uma das vias de sinalização mais bem definida e é importante na eliminação das células T ativadas durante a resposta imune, limitando assim, a resposta do hospedeiro (VAN PARIJS; BIUCKIANS; ABBAS, 1998).

A via intrínseca da apoptose é desencadeada por vários estímulos tais como radiação, privação de hormônios e citocinas e é regulada pelo equilíbrio de proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X_i) da família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) envolvidas no controle na permeabilidade da membrana

mitocondrial. Com o aumento da permeabilidade mitocondrial, há liberação do citocromo C no citosol que desencadeia a ativação das caspases (BURLACU, 2003).

A microscopia eletrônica é considerada “padrão ouro” na identificação da célula apoptótica, mas não tem sido usada rotineiramente nas pesquisas em que a quantificação é importante (TAATJES; SOBEL; BUDD, 2008).

Nos tecidos, a apoptose tem sido frequentemente identificada através da técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling) que detecta fragmentos do DNA. A fragmentação do DNA também pode ocorrer em outras situações como necrose, autólise e, por isso, ao se utilizar a técnica de TUNEL, os resultados devem ser associados com o aspecto morfológico e expressão de marcadores da apoptose (BAIMA; STICHERLING, 2002).

A apoptose também pode ser indicada pela expressão imuno-histoquímica de caspase-3 ativa (GOWN, 2002). Através dessa técnica, pode ser avaliada também a expressão de outras proteínas relacionadas com a apoptose como Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, Fas e FasL (KRAJEWSKI *et al.*, 1994, KRAJEWSKI; KRAJEWSKA; REED, 1996; STRATER *et al.*, 2001)

2.2.1 Apoptose e leishmaniose

A alteração na regulação da apoptose tem sido envolvida na imunopatogênese de várias doenças infecto-parasitárias (BARCINSKI; dos REIS, 1999; DOCKREL, 2003; LUDER; GROSS; LOPES, 2001; SCHAUMBURG *et al.*, 2006).

Na leishmaniose, assim como em outras doenças parasitárias, a apoptose pode ser induzida tanto nos parasitos quanto nas células da resposta imune do hospedeiro.

Os mecanismos envolvidos na morte celular programada em espécies do gênero *Leishmania*, assim como sua importância na patogênese da leishmaniose, ainda não estão bem definidos (NGUEWA *et al.*, 2004). Algumas características, semelhantes às da apoptose de organismos multicelulares, têm sido observadas na apoptose da *Leishmania*: exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C, ativação de proteases, condensação e fragmentação da cromatina (ARNOULT *et al.*, 2002). Além disso, assim como em organismos multicelulares, a apoptose pode ser

desencadeada por diversos estímulos (privação de nutrientes, drogas e estresse oxidativo) (DEBRABANT *et al.*, 2003).

A importância da apoptose na resolução de lesões causadas por várias espécies de *Leishmania* tem sido demonstrada em várias pesquisas.

Na infecção por *Leishmania donovani*, há evidências de que ocorre inibição da apoptose do macrófago infectado, facilitando a persistência do organismo no hospedeiro (MOORE; MATLASHEWSKI, 1994). Além disso, de acordo com Das *et al.* (1999), a susceptibilidade à doença também está associada à apoptose das células T CD4⁺ que coincide com a diminuição das citocinas produzidas pelas células do tipo T_H1.

Nas lesões causadas por *Leishmania major*, há evidências de que a expressão de Fas/FasL seja essencial para a resistência à infecção. O aumento na expressão de Fas em macrófagos em resposta ao IFN- γ , torna essas células mais susceptíveis à apoptose mediada pelo FasL expresso em linfócitos T (CHAKOUR *et al.*, 2003; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1998)

Há poucos trabalhos publicados sobre o papel da apoptose na leishmaniose tegumentar americana. Nas lesões cutâneas de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis*, Bertho *et al.* (2000) demonstraram, através de citometria de fluxo, que a porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ apoptóticas é maior nas lesões ativas do que naquelas em cicatrização. A apoptose de células T também pode ser um dos mecanismos responsáveis pela anergia presente nas lesões causadas pela *L. (L.) amazonensis* de acordo com Pinheiro *et al.* (2004).

Contudo, a importância da apoptose na determinação das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana ainda não está bem definida.

2.3 Célula T reguladora Foxp3⁺

Vários tipos de células T reguladoras (Treg) tais como Th3, Tr1 e CD4⁺CD25⁺, são capazes de controlar a resposta imune em doenças auto-imunes, neoplasias e infecções crônicas (JONULEIT; SCHMITT, 2003).

As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ representam 5-10% da população de células T CD4⁺ no sangue periférico. Além de expressarem CD25, essas células expressam uma série de outros marcadores: fator de transcrição Foxp3 (*forkhead*

box protein 3), GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor-related protein*) e CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) (COOLS *et al.*, 2007). Desses marcadores, o mais específico é o Foxp3, fator de transcrição considerado fundamental no desenvolvimento e funcionamento da célula Treg (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003).

As células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ controlam a resposta imune excessiva mediada pelas células Ta1 e Ta2 e apresentam diferentes mecanismos supressivos: supressão da proliferação e produção de citocinas pelas células T efectoras; secreção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF-β; apoptose de células T efectoras, entre outros (TANG; BLUESTONE, 2008; ASKENASY; KAMINITZ; YARKONI, 2008). A apoptose tem sido considerada um mecanismo de homeostasia e supressão das Treg e isto se deve à sua menor susceptibilidade à apoptose e capacidade de induzir a apoptose nas células efectoras (YOLCU *et al.*, 2008; BANZ; PONTOUX; PAPIERNIK, 2002).

2.3.1 Célula T Foxp3⁺ e leishmaniose

Em várias doenças infecto-parasitárias, observa-se que o equilíbrio entre as células T reguladoras e as células T efectoras influencia na resolução dessas doenças (BELKAID, 2007).

O papel da célula T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na resposta imune da leishmaniose cutânea tem sido avaliado principalmente nas infecções por *L. major* (PETERS; SACKS, 2006). Nos camundongos susceptíveis, a célula Treg provoca supressão da resposta imune excessiva mediada pelas células Ta2. Nos camundongos resistentes, a célula Treg controla a resposta Ta1 permitindo a persistência do parasito e a manutenção da imunidade contra reinfecção (MENDEZ *et al.*, 2004).

Nas lesões de pele infectadas com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, sabe-se que as células Treg se acumulam, secretam IL-10 e TGF-β, inibem a proliferação de células T assim como a produção de citocinas (IL-2 e IFN-γ) por essas células e, dessa forma, possivelmente, contribuem para o controle da resposta imune mediada pelas células T efectoras (JI *et al.*, 2005; CAMPANELLI *et al.*, 2006).

Contudo, a importância das células Treg na determinação das diferentes formas clínicas da LTA ainda não está bem definida.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão de marcadores de apoptose e do fator de transcrição Foxp3 nas lesões das diferentes formas clínicas da LTA e correlacionar essa expressão com dados clínicos dos pacientes, alterações histopatológicas e tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações histopatológicas nas lesões das diferentes formas clínicas da LTA.
- Identificar os tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório nas lesões das diferentes formas clínicas da LTA
- Analisar a expressão de marcadores de apoptose e do fator de transcrição Foxp3 nas lesões das diferentes formas clínicas da LTA.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes e amostras de biópsia

Foram analisadas amostras de biópsias de lesões de pacientes com LTA atendidos no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão no período de 2001 a 2008.

Foram incluídas amostras de biópsias (a maioria por *punch* de 4 mm) de lesões sem tratamento prévio, de pacientes com dados clínicos e epidemiológicos suspeitos e com, pelo menos, um exame laboratorial (imunológico, parasitológico ou histopatológico) positivo. Foram excluídas as amostras de tecido que não possuíam áreas representativas da lesão.

Dos prontuários dos pacientes, foram obtidos os seguintes dados clínicos: forma clínica (LCL, LD, LRC, LCM e LCD), sexo, idade, procedência, resultado dos exames laboratoriais (IFI, IDRM, cultura, esfregaço, inoculação em hamster), número, tamanho, localização e tempo de evolução das lesões. As amostras de biópsia e os dados clínicos/ laboratoriais dos pacientes com a LCD foram cedidos por uma pesquisadora do Hospital Universitário Presidente Dutra do Maranhão. As espécies de leishmânia utilizadas neste trabalho já haviam sido previamente identificadas, pelo Serviço de Dermatologia do HUB, através de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais e através reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando imprint de tecido em papel de filtro e cultura criopreservada de leishmânia.

Foram utilizadas como controle seis amostras de biópsias de granuloma do tipo corpo estranho a fio de sutura as quais foram obtidas de cirurgias de ampliação de margens de ressecção (MUSTAFA *et al.*, 2001).

4.2 Histopatologia.

Os fragmentos de tecido foram fixados em formol a 10% e embebidos em parafina. Com o auxílio de um micrótomo, foram obtidos dos blocos de parafina cortes de cerca de 4 μ m que foram corados pela técnica Hematoxilina & Eosina (HE). Outras técnicas de coloração foram utilizadas para o diagnóstico diferencial com

micobacterioses (Fite-Faraco) e com micoses (ácido periódico/reactivo de Schiff e impregnação pela prata de Grocott).

Análise qualitativa das alterações histopatológicas. Nos cortes histológicos corados por HE foi avaliada a presença de alterações no epitélio de revestimento (hiperplasia, ulceração, exocitose de linfócitos) e na derme/lâmina própria (necrose, fibrose, macrófagos vacuolizados, granulomas, célula gigante multinucleada e leishmânias).

4.3 Imuno-histoquímica (IHQ)

Cortes histológicos de blocos de parafina contendo as amostras das biópsias foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica com a utilização do protocolo da estreptovidina peroxidase e revelação da reação com 3,4-Diaminobenzidina (APÊNDICE A). Foi avaliada a expressão *in situ* de marcadores dos tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório como linfócito T (CD45RO, CD4 e CD8), neutrófilo (CD15), linfócito B (CD20), macrófago (CD68), célula de Langerhans (CD1a), dos marcadores da apoptose Bcl-2, Bak, Bcl-X, FasL, caspase-3 ativa e do marcador para célula T reguladora (Foxp3). Os anticorpos primários usados nas reações estão em APÊNDICE A na Tabela A1. Foram utilizados como controle externo das reações cortes histológicos de tonsila palatina. Para CD1a, CD45RO, CD4, CD8 e CD15 foi considerada positiva a marcação na membrana, para Bcl-2, Bak, Bcl-X e caspase-3 ativa a marcação citoplasmática, para FasL a marcação na membrana e citoplasmática e para Foxp3 a marcação nuclear.

Análise quantitativa da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos. Para a análise dos marcadores dos tipos celulares (CD4, CD8, CD15, CD20, CD45RO, CD68, Bcl-2 e FasL) foram avaliados 2 campos aleatórios no aumento de 400x em cada secção histopatológica. As imagens desses campos foram capturadas utilizando um fotomicroscópio Carl Zeiss (modelo Axioskope 2) e transferidas para o computador. A contagem das células foi realizada com o auxílio de um sistema de processamento e análise de imagem Unbvision. As células positivas foram identificadas manualmente e contadas simultaneamente pelo programa como demonstrado na Figura A1 do APÊNDICE B. A área de cada imagem capturada foi de 0,0432mm². Para a análise de caspase-3 ativa, Foxp3 e CD1a foram avaliados 16 campos aleatórios no aumento de 400x e a contagem foi realizada com o auxílio

de uma ocular reticulada Olympus com área de $0,0625\text{mm}^2$. O número de células positivas foi expresso em mm^2 . Optou-se por fazer uma análise apenas qualitativa da expressão do Bcl-X e Bak.

4.4 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 testes estatísticos para a comparação entre as amostras basearam-se nos tipos de distribuição (paramétricas ou não paramétricas).

Os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis/Dunn foram utilizados para a comparação entre as médias de variáveis quantitativas não paramétricas e o ANOVA/Tukey para a comparação entre as médias de variáveis quantitativas paramétricas.

Para a verificação da existência de correlação entre duas variáveis contínuas, utilizou-se o teste de correlação de Spearman. Por definição, os valores do coeficiente de correlação estão entre -1 e 1 e o sinal do coeficiente indica a direção da associação. Alto valor absoluto ($> 0,7$) indica uma forte associação entre as variáveis e os valores próximos de zero indicam independência entre as variáveis.

Para todos os testes adotou-se o valor de significância estatística menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em três etapas:

5.1 Descrição e análise da casuística

5.2 Descrição e análise dos achados histopatológicos

5.3 Descrição e análise da expressão imuno-histoquímica

5.1 Descrição e análise da casuística

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes em cada amostra estão dispostos, de acordo com a forma clínica, no APÊNDICE C – Tabelas A2, A3 A4, A5 e A6. A frequência dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, em cada forma clínica da LTA, está disposta na Tabela 1.

As 95 amostras de biópsias, obtidas de 95 pacientes, foram distribuídas de acordo com as formas clínicas apresentadas pelos pacientes: LCL (n=68), LCM (n=16), LCD (n=7), LD (n=3) e LRC (n=1). Dos 95 pacientes avaliados, 88 foram atendidos no Hospital Universitário de Brasília e apresentaram LCL, LCM LRC e LD. Os 7 pacientes com LCD foram obtidos no Hospital da Universidade Federal do Maranhão. Dos 95 pacientes, dois eram HIV-positivos (com critérios de AIDS) e apresentaram LD e LCM concomitante.

Dos 95 pacientes, 76 (80%) eram do gênero masculino. A idade dos pacientes variou de 3 a 78 anos e a média \pm dp da idade (em anos), de acordo com a forma clínica, foi a seguinte: 39,09 (\pm 16,88) na LCL, 50,75 (\pm 16,43) na LCM, 34,85 (\pm 20,56) na LCD, 38,33 (\pm 5,13) na LD. Na LRC, o paciente tinha 40 anos de idade. Os pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília eram provenientes do Distrito Federal e dos estados de Goiás, Bahia, Mato Grosso, Tocantins e Minas Gerais; aqueles obtidos no Hospital da Universidade do Maranhão eram do próprio estado do Maranhão.

Com relação às lesões, em todos os casos de LCD, LD e LRC os pacientes apresentaram mais de uma lesão, na LCL apenas 20/57 (35,08%). Nas formas cutâneas, o tamanho variou de 0,5 a 15 cm e a localização mais comum foi em membros inferiores. Na LCM, a mucosa nasal foi a mais acometida. A média \pm dp do tempo de evolução das lesões (em meses), de acordo com a forma clínica, foi a

seguinte: LCL ($9,27 \pm 14,71$), LCM ($40,25 \pm 35,64$) e LCD ($63,33 \pm 51$) e LD ($4,5 \pm 4,95$). Na LRC, o tempo de evolução foi de 3 meses.

Nos exames laboratoriais, a LCD apresentou, em todos os casos, IDRMM negativa. Diferentemente da LCD, a IDRMM foi sempre positiva na LCM e positiva na maioria dos casos de LCL (56/63).

Foram obtidas as espécies de leishmânia causadoras das lesões em 21 pacientes. A *L. (V.) braziliensis* foi encontrada em 16 casos de LCL e em um caso de LD (paciente HIV-positivo). Os outros quatro pacientes estavam parasitados por *L. (L.) amazonensis*, três apresentaram LCL e um LCM (paciente HIV-positivo). Nos pacientes com *L. (L.) amazonensis*, a IDRMM foi positiva em 2/2 casos de LCL e no caso de LCM. De 12 casos de LCL causados pela *L. (V.) braziliensis* apenas um apresentou IDRMM negativa.

Tabela 1- Frequência dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais nas formas clínicas da LTA.

	LCD	LCL	LCM	LD	LRC
sexo					
masculino	3/7(42,86%)	56/68 (82,35%)	13/16 (81,25%)	3/3 (100%)	1/1(100%)
feminino	4/7(57,14%)	12/68 (17,65%)	3/16 (18,75%)	0/3(0%)	0/1(0%)
Faixa etária (anos)					
0-19	1/7(14,28%)	11/66(16,67%)	0/16 (0%)	0/3 (0%)	0/1(0%)
20-39	4/7(57,14%)	24/66 (36,36%)	5/16 (31,25%)	2/3 (66,67%)	0/1(0%)
40-60	1/7(14,28%)	23/66 (34,85%)	5/16(31,25%)	1/3 (33,33%)	1/1(100%)
>61	1/7(14,28%)	8/66 (12,12%)	6/16 (37,5%)	0/3 (0%)	0/1(0%)
Procedência					
DF	0/7(0%)	31/55 (56,36%)	8/16 (50%)	1/2 (50%)	x
GO	0/7(0%)	11/55 (20%)	3/16 (18,75%)	0/2 (0%)	x
BA	0/7(0%)	8/55 (14,54%)	1/16 (6,25%)	0/2 (0%)	x
TO	0/7(0%)	3/55 (5,45%)	2/16 (12,5%)	0/2 (0%)	x
MG	0/7(0%)	1/55 (1,82%)	1/16(6,25%)	1/2(50%)	x
MT	0/7(0%)	1/55 (1,82%)	1/16(6,25%)	0/2 (0%)	x
MA	7/7(100%)	0/55(0%)	0/16(0%)	0/2 (0%)	x
Lesões					
Múltiplas(+ de 1)	7/7(100%)	20/57(35,08%)	-	3/3(100%)	1/1(100%)
Tempo de evolução (meses)	63,33	9,27	40,25	4,5	3
Localização mais frequente	mi	mi	nasal	mi/tronco	mi
Exames					
IDRM	0/7(0%)	56/63 (88,89%)	15/15 (100%)	1/1(100%)	1/1(100%)
IFI	6/7(85,71%)	36/47(76,59%)	11/13 (84,61%)	1/2 (50%)	1/1(100%)
Esfregaço	7/7(100%)	18/37(48,64%)	2/3 (66,67%)	1/1(100%)	x
Cultura	x	24/40 (60%)	1/6 (16,67%)	1/1(100%)	x
Inoculação	x	7/11(63,63%)	0/1(0%)	x	x
HIV+			1	1	
Espécie de leishmânia					
<i>L.(V.) braziliensis</i>	x	16/19 (84,29%)	x	1/1	x
<i>L.(L.)amazonensis</i>	x	3/19 (15,78%)	1/1	x	x

LCD=leishmaniose cutânea difusa, LCL=leishmaniose cutânea localizada, LCM=leishmaniose cutâneo-mucosa,

LD=leishmaniose disseminada, LRC=leishmaniose recidiva cútis.

DF=Distrito Federal, GO= Goiás, BA= Bahia, MT=Mato Grosso, TO=Tocantins, MG= Minas Gerais

IDRM=intradermorreação de Montenegro, IFI=imunofluorescência indireta, x=não disponível

5.2 Descrição e análise das alterações histológicas

As alterações histopatológicas presentes no controle e, em cada amostra, estão dispostas, de acordo com a forma clínica, no APÊNDICE D – Tabelas A7, A8, A9, A10, A11 e A12. A frequência (porcentagem e número de casos positivos) das alterações histopatológicas, em cada forma clínica da LTA e no controle, está disposta nas Tabelas 2 e 3. As alterações na derme/lâmina própria estão ilustradas na Figura 1 e as epiteliais na Figura 2.

Em todas as amostras foi observado um infiltrado inflamatório difuso constituído predominantemente por mononucleares (linfócitos, plasmócitos e histiócitos). Contudo, houve uma diferença na frequência de algumas alterações histopatológicas, principalmente entre a LCD e as outras formas clínicas.

Na LCD, os macrófagos vacuolizados e as formas amastigotas das leishmânias estavam presentes em todas das amostras. Outras alterações dérmicas como granuloma, célula gigante multinucleada e necrose não foram encontradas. As alterações epidérmicas (ulceração, exocitose e hiperplasia) estiveram presentes em apenas uma amostra.

Em contraste com a LCD, na LCL e LCM o parasito foi identificado em um número pequeno de amostras (25/68 e 2/15, respectivamente) e alterações epiteliais e na derme/lâmina própria como hiperplasia, ulceração, exocitose, granuloma e necrose foram frequentemente observadas. A fibrose foi evidenciada em apenas 6 amostras das formas clínicas, todas da LCM e LCD.

Na LCL causada pela *L.(L.)amazonensis*, as amastigotas foram observadas em apenas uma amostra (1/3) e as alterações epidérmicas e dérmicas foram frequentes (Tabela 3).

No controle, o infiltrado de mononucleares foi escasso e esteve associado em 100% das amostras com fibrose e células gigantes multinucleadas.

Nos pacientes HIV-positivos, as leishmânias foram evidenciadas apenas na amostra de LD.

Tabela 2 - Frequência (porcentagem e número de casos positivos) das alterações histopatológicas nas formas clínicas da LTA e no controle

Alterações histopatológicas	controle	LCD	LCL	LCM	LD	LRC
hiperplasia epitelial	33,33% (2/6)	16,66% (1/6)	94,11% (64/68)	80% (12/15)	100% (2/2)	0/1
ulceração	16,66% (1/6)	16,66% (1/6)	36,76% (25/68)	73,33% (11/15)	0 (0/2)	1/1
exocitose de linfócitos	0 (0/6)	0 (0/7)	32,35% (22/68)	53,33% (8/15)	100% (2/2)	1/1
necrose	0 (0/6)	0 (0/7)	32,35% (22/68)	53,33% (8/15)	100% (2/2)	1/1
fibrose	100% (6/6)	42,85% (3/7)	0 (0/68)	20% (3/15)	0 (0/2)	0/1
macrófagos vacuolizados	0 (0/6)	100% (7/7)	7,35% (5/68)	0 (0/15)	0 (0/2)	0/1
granuloma	0 (0/6)	0 (0/7)	54,41% (37/68)	53,33% (8/15)	50% (1/2)	0/1
célula gigante multinucleada	100%(6/6)	0 (0/7)	42,64% (29/68)	40% (6/15)	50% (1/2)	0/1
amastigota	0 (0/6)	100% (7/7)	36,76% (25/68)	13,33% (2/15)	50% (1/2)	0/1

LCD= leishmaniose cutânea difusa, LCL= leishmaniose cutânea localizada, LCM= leishmaniose cutâneo-mucosa, LD=leishmaniose disseminada, LRC=leishmaniose recidiva cútis.

Tabela 3 - Frequência (porcentagem e número de casos positivos) das alterações histopatológicas na LCL de acordo com a espécie de leishmânia.

Alterações histológicas	LCL - <i>L. (V.) braziliensis</i>	LCL- <i>L. (L.) amazonensis</i>
hiperplasia epitelial	15/16 (93,75%)	3/3 (100%)
ulceração	4/16 (25%)	1/3 (33,34%)
exocitose de linfócitos	14/16 (87,5%)	3/3 (100%)
necrose	6/16 (37,5%)	2/3 (66,67%)
fibrose	0/16 (0%)	0/3 (0%)
macrófagos vacuolizados	1/16 (6,25%)	0/3 (0%)
granuloma	9/16 (56,25%)	3/3 (100%)
célula gigante multinucleada	5/16 (31,25%)	2/3 (66,67%)
amastigota	5/16 (31,25%)	1/3 (33,34%)

LCL= leishmaniose cutânea localizada

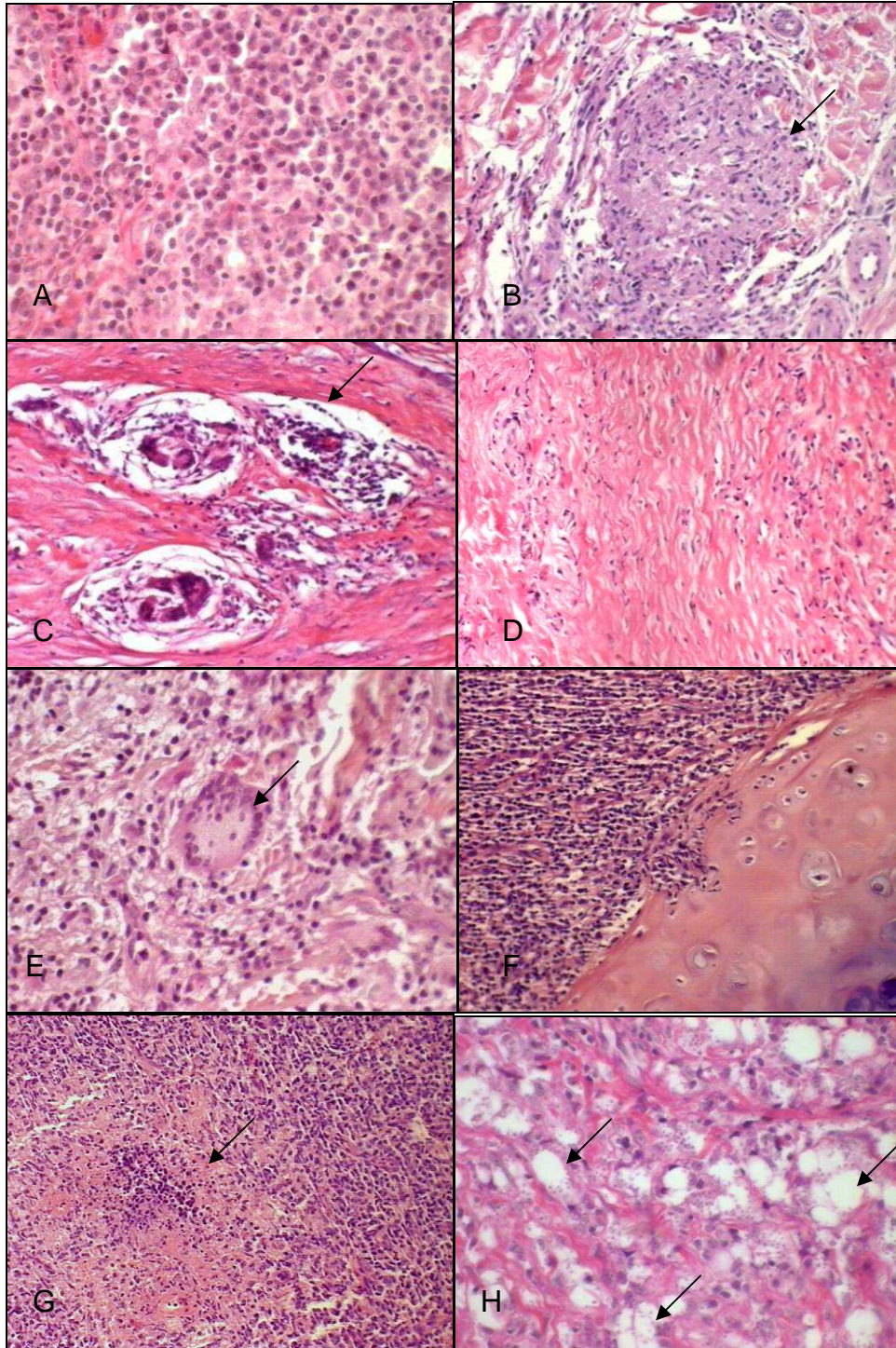


Figura 1 - (A) Infiltrado de mononucleares na amostra 10 da LCL (HE, 400X); (B) Granuloma epitelióide (seta) na amostra 16 da LCL (HE, 200X); (C) Fibrose com células gigantes multinucleadas (seta) na amostra 4 do controle (HE, 200X); (D) Fibrose na amostra 5 da LCD (HE, 200X); (E) Célula gigante multinucleada (seta) na amostra 2 da LCM (HE, 400X); (F) Infiltração da cartilagem por mononucleares na amostra 4 da LCM (HE, 200X); (G) Área de necrose (seta) na amostra 9 da LCM (HE, 200X); (H) Macrófagos vacuolizados (seta) na amostra 4 da LCD (HE, 400X).

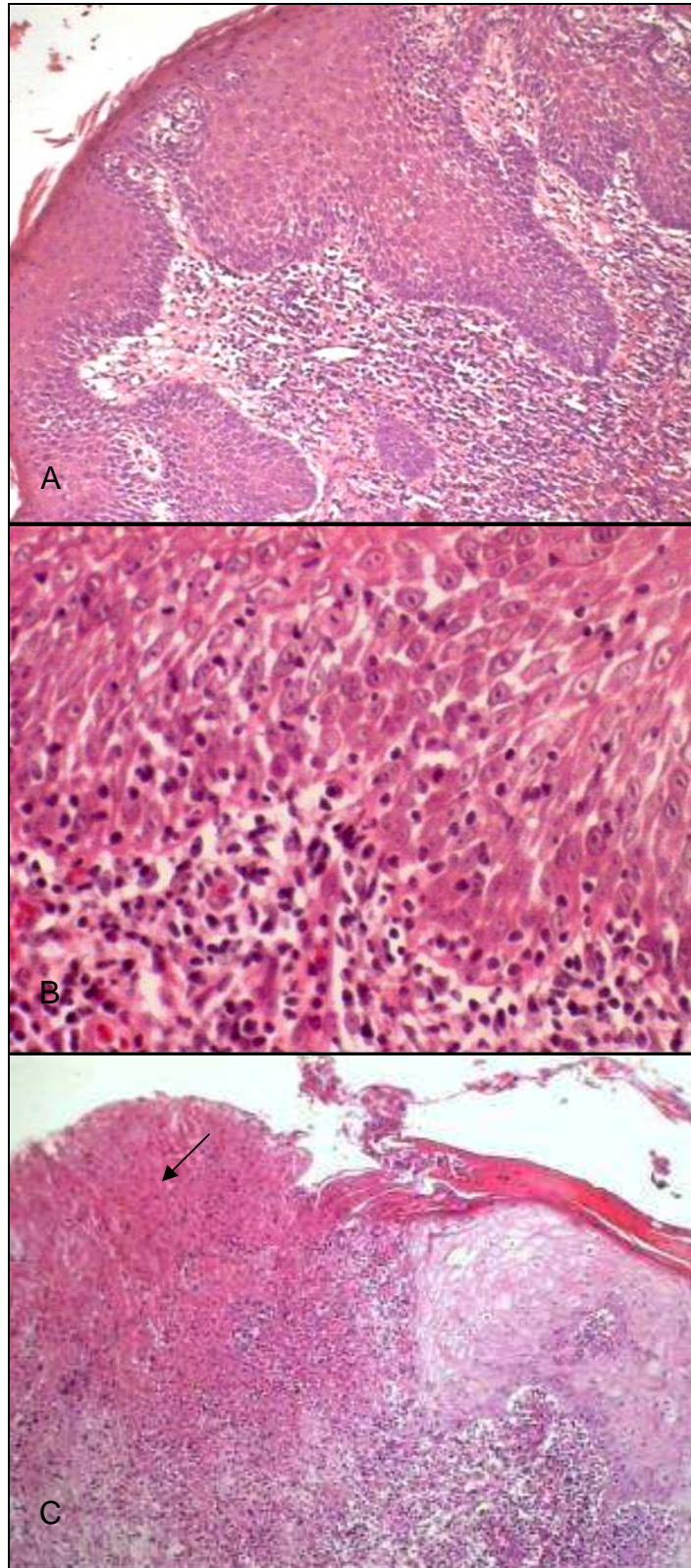


Figura 2 - (A) Hiperplasia epitelial na amostra 12 da LCM (HE, 100X); (B) Exocitose de linfócitos na amostra 15 da LCM (HE, 400X); (C) Ulceração (seta) na amostra 23 da LCL (HE, 100X)

5.3 Descrição e análise da expressão imuno-histoquímica

5.3.1 População celular

O número de células/mm² presentes no controle e, em cada amostra, está disposto, de acordo com a forma clínica, no APÊNDICE E – Tabelas A13, A14, A15, A16, A17 e A18. O número (mediana) de células/mm² positivas para os marcadores celulares (CD4, CD8, CD20, CD15, CD1a) nas diferentes formas clínicas e no controle está mostrado na Tabela 4.

Linfócitos T (células CD45RO⁺), linfócitos B (células CD20⁺), neutrófilos (células CD15⁺) e macrófagos (células CD68⁺), estiveram presentes em todas as amostras de todas as formas clínicas.

Linfócitos T (células CD45RO⁺) foram as células predominantes no infiltrado de todas as formas clínicas e estavam distribuídos difusamente na derme/lâmina própria e, nas amostras com exocitose, no epitélio de revestimento (Figura 3A,3D). A média de células positivas nas amostras de LCD (828±358,27 células/mm²) foi significativamente menor do que a média na amostras de LCL e LCM (1660,73±344,13 e 1600±678,08 células/mm² respectivamente) (ANOVA, p=0,0214) (Figura 4).

Células CD4⁺ e CD8⁺ foram também observadas difusamente distribuídas na derme/lâmina própria e, nas amostras com exocitose, no epitélio de revestimento (Figuras 3B e 3C). A LCD apresentou um número menor de células CD8⁺ (mediana=560 células/mm²) quando comparada com a LCL (mediana=1092 células/mm²) (Kruskal-Wallis, p=0,0026) e um número significativamente menor de células CD4⁺ (mediana=320 células/mm²) quando comparada com a LCL e a LCM (mediana= 744 e 848 células/mm², respectivamente) (Kruskal-Wallis, p= 0,0025) (Figuras 5 e 6).

Linfócitos B (células CD20⁺) estavam difusamente distribuídos na derme/lâmina própria, no epitélio não foram evidenciados (Figura 3E). A mediana de células positivas foi significativamente maior na LCM (384 células/mm²) e na LCL (264 células/mm²) do que na LCD (90 células/mm²) (Kruskal-Wallis, p= 0,0085) (Figura 7).

Devido ao número limitado de amostras, as amostras de LCL causadas por *L.(L.)amazonensis* não foram comparadas estatisticamente com as amostras das outras formas clínicas, mas o número de células positivas para os marcadores de células T se aproximou mais das medianas observadas na LCL do que das medianas observadas na LCD, também causada pela *L.(L.)amazonensis*.

A expressão de CD68 foi difusa na derme/lâmina própria, inclusive nos granulomas, macrófagos vacuolizados e nas células gigantes multinucleadas (Figura 3F). A média de células/mm² positivas para CD68 na LCL (476 ± 258,98), LCM (654,15 ± 362,76) e LCD (573,71 ± 150,14) não foi diferente entre as formas clínicas de maneira significativa (Figura 8).

Os neutrófilos (células CD15⁺) foram mais freqüentes ao redor das áreas de ulceração e necrose (Figura 3G). A LCM apresentou um número significativamente maior de células positivas (mediana=288 células/mm²) quando comparada com a LCL (mediana=116 células/mm²) e a LCD (mediana=72 células/mm²) (Kruskal-Wallis, p= 0,0016) (Figura 9).

As células de Langerhans (células CD1a⁺) foram observadas no epitélio e na derme/lâmina própria (Figura 3H). No epitélio, a LCM apresentou uma mediana de células positivas (10 células/mm²) significativamente menor quando comparada com a LCL (120 células/mm²) (Kruskal-Wallis, p< 0,0001) (Figura 10).

No controle, a expressão de todos os marcadores celulares, com a exceção de CD1a, foi menor do que nas formas clínicas da LTA (Figura 11).

Nos pacientes HIV-positivos, o número de células CD4⁺ foi de 460 e 732 células/mm² nas amostras de LD e LCM, respectivamente (APÊNDICE E na Tabela A14, biópsia 2 e na Tabela A15, biópsia 13).

Tabela 4 – Mediana, número máximo e mínimo de células/mm² positivas para marcadores celulares nas formas clínicas e no controle.

Marcador	Controle	LCL	LCM	LCD
CD1a	96(40-176)	120(0-240)	10(0-80)	44(8-96)
CD8	124(56-200)	1092(96-2568)	840(168-1608)	560(96-1044)
CD4	109(69-178)	744(240-1536)	848(160-1416)	320(96-396)
CD20	40(32-64)	264(24-960)	384(128-960)	90(8-252)
CD15	28(0-144)	116(0-480)	288(48-1848)	72(40-204)

LCD= leishmaniose cutânea difusa, LCL= leishmaniose cutânea localizada, LCM= leishmaniose cutâneo-mucosa,

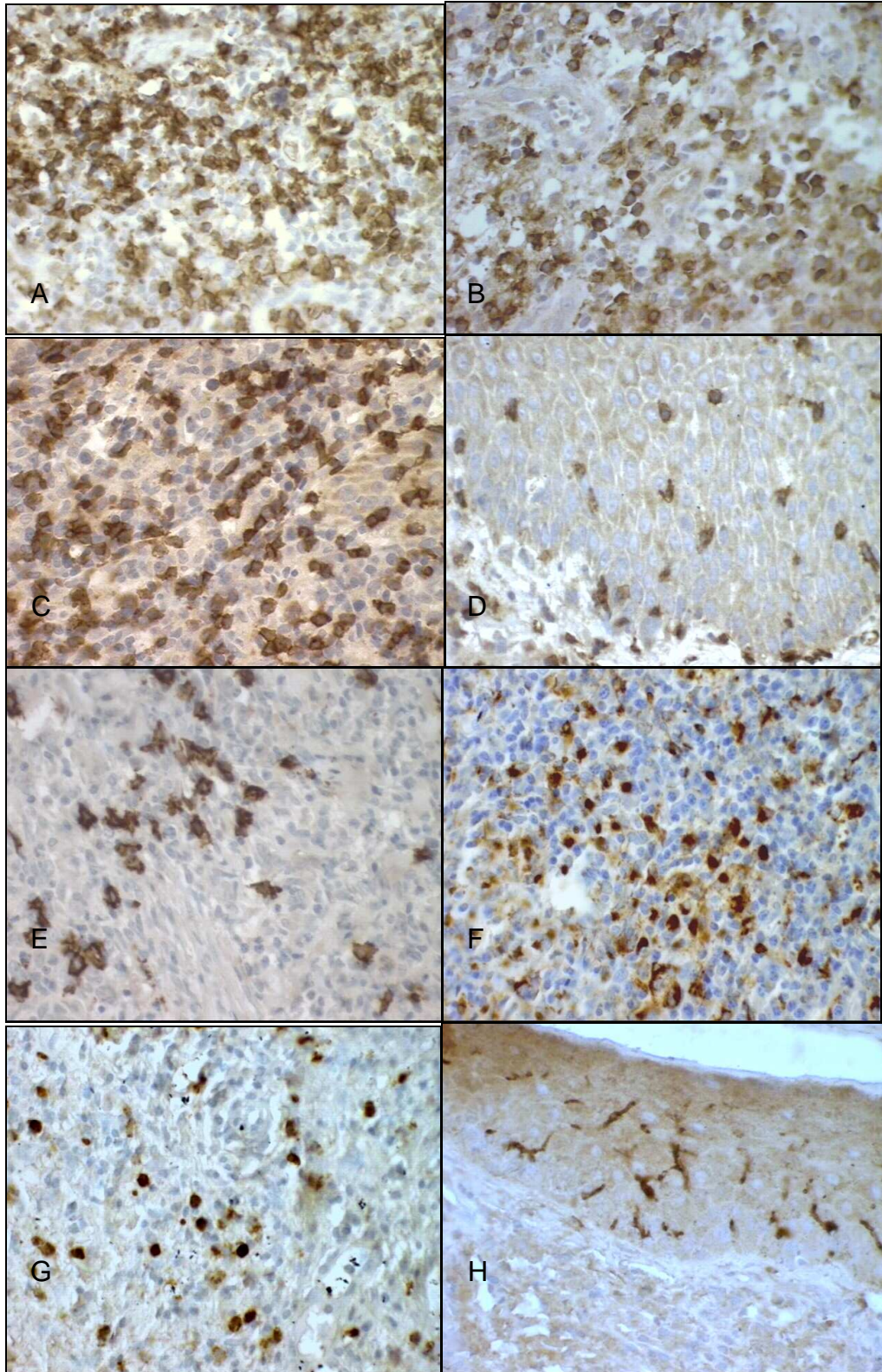


Figura 3 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica em amostras das formas clínicas. Células positivas estão coradas em marrom. (A) Células CD45RO⁺ na derme da amostra 16 da LCL (400X); (B) Células CD4⁺ na derme da amostra 13 da LCL (400X); (C) Células CD8⁺ na derme da amostra 13 da LCL (400X); (D) Células CD45RO⁺ na epiderme da amostra 3 da LCL (400X); (E) Células CD20⁺ na derme da amostra 31 da LCL (400X); (F) Células CD68⁺ na derme da amostra 6 da LCL (400X); (G) Células CD15⁺ na lâmina própria da amostra 1 da LCM (400X); (H) Células CD1a⁺ na epiderme da amostra 15 da LCL (400X).

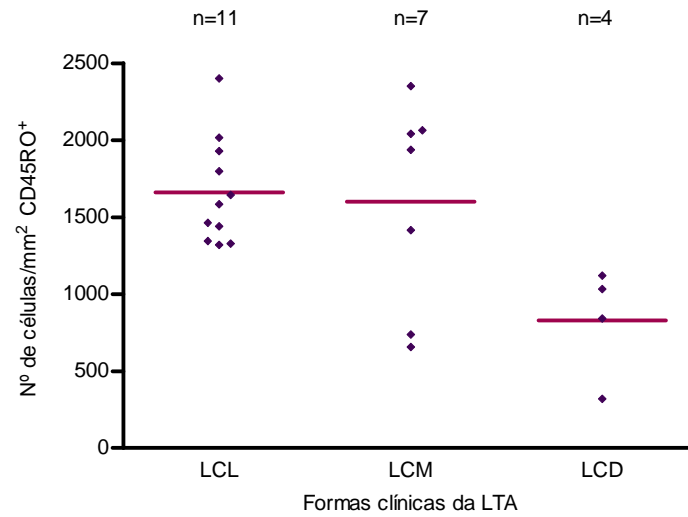


Figura 4 - Número de células/mm² CD45RO⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço indica a média de células/mm² positivas. A média de células positivas nas amostras de LCD foi significativamente menor do que a média nas amostras de LCL e LCM (ANOVA, $p=0,0214$).

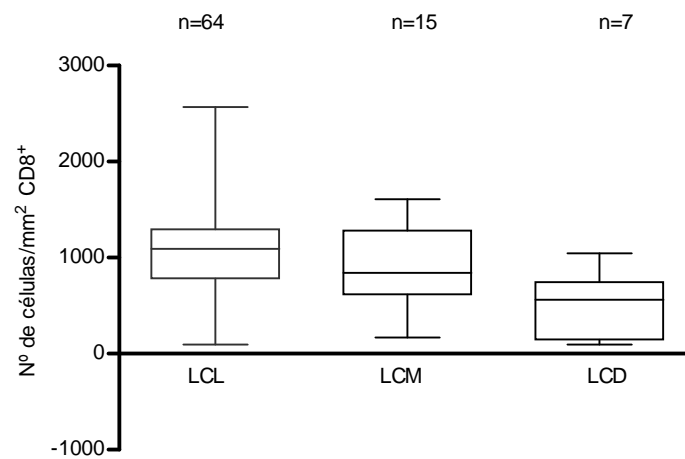


Figura 5 - Número de células/mm² CD8⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente menor de células CD8⁺ quando comparada com a LCL (Kruskal-Wallis, $p=0,0026$).

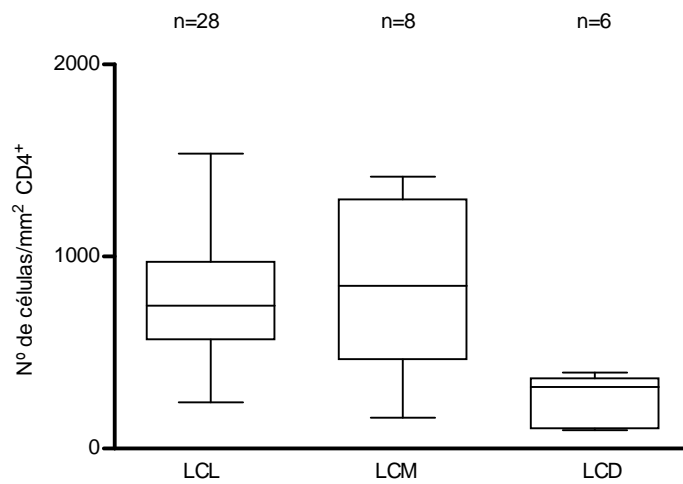


Figura 6 - Número de células/mm² CD4⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente menor de células CD4⁺ quando comparada com a LCL e LCM (Kruskal-Wallis, p= 0,0025).

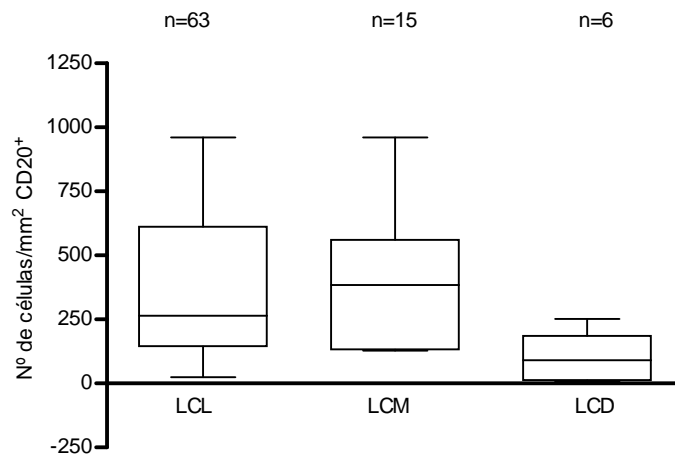


Figura 7 - Número de células/mm² CD20⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A mediana de células positivas foi significativamente maior na LCL e LCM quando comparada com a mediana na LCD (Kruskal-Wallis, p= 0,0085).

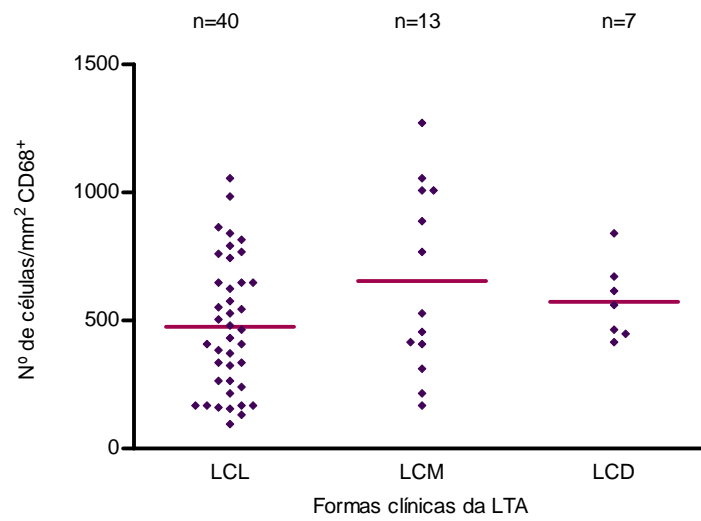


Figura 8 - Número de células/mm² CD68⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal indica a média de células/mm² positivas. Não houve diferença significativa entre as formas clínicas.

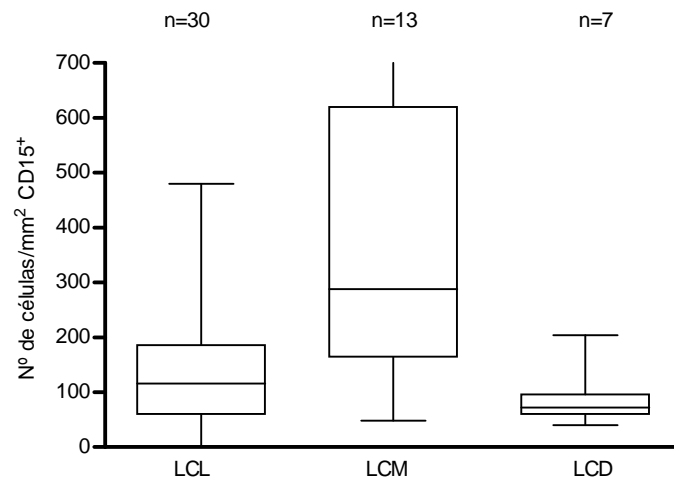


Figura 9 - Número de células/mm² CD15⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCM apresentou um número significativamente maior de células CD15⁺ quando comparada com a LCL e LCD (Kruskal-Wallis, $p=0,0016$).

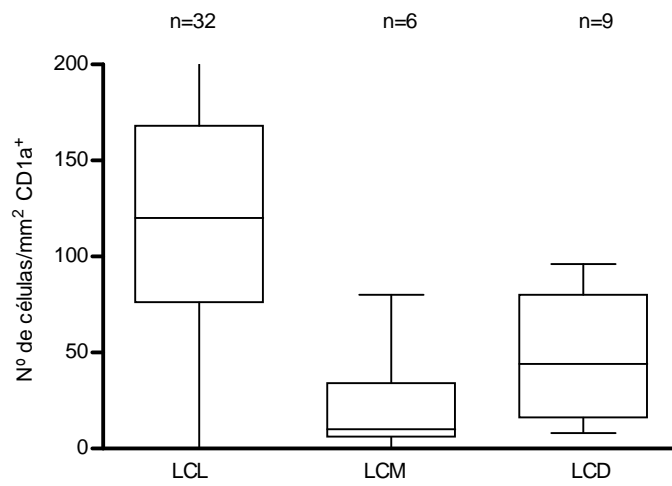


Figura 10 - Número de células/mm² CD1a⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. Na LCM, a mediana foi significativamente menor que na LCL (Kruskal-Wallis, p< 0,0001).

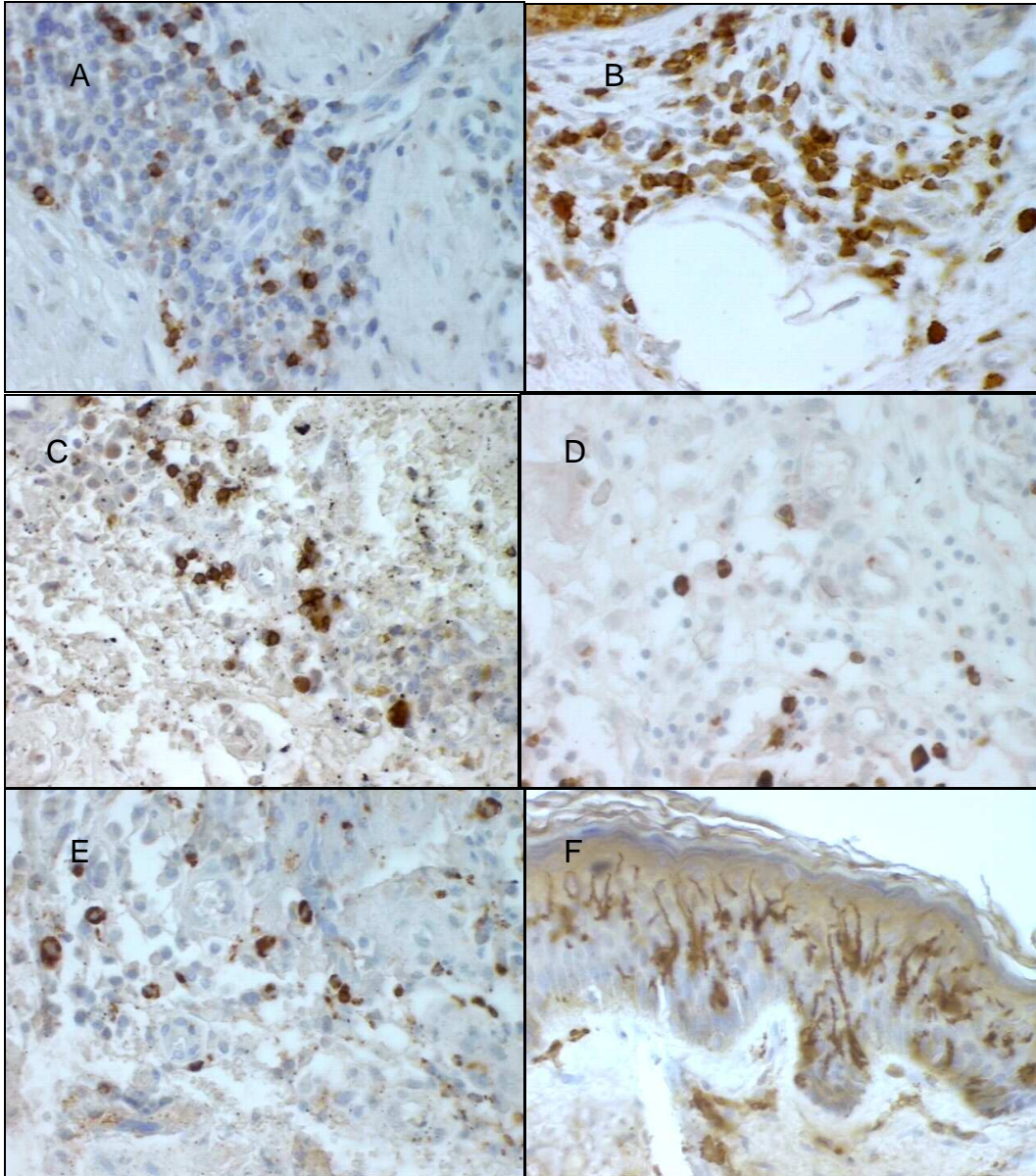


Figura 11 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica no controle. Células positivas estão coradas em marrom. (A) Células CD4⁺ na derme (400X); (B) Células CD8⁺ na derme (400X); (C) Células CD20⁺ na derme (400X); (D) Células CD15⁺ na derme (400X); (E) Células CD68⁺, na derme (400X); (F) Células CD1a⁺ na epiderme (400X).

5.3.2 Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3

O número de células/mm² presente no controle e, em cada amostra, está disposto, de acordo com a forma clínica, no APÊNDICE E – Tabelas A13, A14, A15, A16, A17 e A18. O número de amostras positivas e a mediana \pm dp de células/mm² positivas para os marcadores da apoptose e Foxp3 nas diferentes formas clínicas e no controle são mostrados nas Tabelas 5 e 6.

Células apoptóticas (positivas para caspase-3 ativa) foram identificadas em apenas 49,33% (37/75) das amostras avaliadas. O número de lesões com células positivas, de acordo com a forma clínica, foi a seguinte: LCL (28/53), LCM (6/13), LCD(1/6), LD (1/2) e LRC (1/1). O número de células positivas foi baixo em todas as formas clínicas (Figura 12). A maior expressão de caspase-3 ativa foi observada na LCL, mas a diferença entre as formas clínicas não foi significativa (Figura 13). Não houve correlação entre a expressão de caspase-3 ativa e a duração da lesão. Células caspase-3 ativa⁺ foram encontradas principalmente adjacente às áreas de necrose. O número de células apoptóticas em amostras com necrose foi significativamente maior quando comparado com o número em amostras sem necrose (Mann-Whitney, $p=0.0002$). No epitélio de revestimento, foram observadas raras células apoptóticas.

O FasL foi expresso em todas as amostras de todas as formas clínicas. Na derme/lâmina própria, a expressão foi mais intensa nas células mononucleares constituintes do infiltrado inflamatório, principalmente em plasmócitos (Figura 14A). Macrófagos e granulomas epitelioides foram negativos ou fracamente positivos (Figuras 14B e 14C). A LCL apresentou o maior número de células positivas (mediana=240 células/mm²), mas não houve diferença significativa na expressão de FasL entre as formas clínicas (Figura 15). Houve uma correlação positiva entre a expressão de caspase-3 ativa e a expressão de FasL ($r=0.49$; $p=0.0009$; $n=43$) na LCL (Figura 16).

O Bcl-2 foi expresso em todas as amostras nas células mononucleares constituintes do infiltrado inflamatório. Os macrófagos vacuolizados e as células

epitelioides do granuloma foram negativos (Figuras 17A e 17B). A LCD apresentou um número significativamente menor de células Bcl-2⁺ (mediana=352 células/mm²), quando comparada com a LCL e LCM que apresentaram medianas de 560 células/mm² e 532 células/mm², respectivamente (Kruskal-Wallis, p= 0,0316) (Figura 18). Na epiderme, foram observadas esparsas células positivas, algumas vezes coincidindo com as áreas de exocitose de linfócitos e presença de melanócitos, células que normalmente expressam Bcl-2. Os ceratinócitos foram negativos.

O Bcl-X foi expresso na epiderme, em mononucleares do infiltrado e nas leishmânias e negativo nos granulomas (Figura 17C). O Bak apresentou uma positividade difusa na epiderme e no infiltrado inflamatório.

Células Foxp3⁺ foram observadas apenas em 39.5% (32/81) das amostras avaliadas. O número de lesões com células positivas, de acordo com a forma clínica, foi a seguinte: LCL (19/59), LCM (6/14), LCD (5/5), LD (1/2) e LRC (1/1). O número de células positivas foi baixo em todas as formas (Figura 19). Na LCD, o número de células Foxp3⁺ foi significativamente maior quando comparado com LCL (Kruskal-Wallis, p=0.03) (Figura 20). Diferentemente do observado na LCD, na LCL causada pela *L.(L.) amazonensis*, nenhuma amostra expressou Foxp3. Uma variação no número de células positivas foi obtida entre as amostras na mesma forma clínica: LCL (0-190 células/mm²), LCM (0-70 células/mm²), LCD (3-30 células/mm²) e LD (0-64 células/mm²). O número de células Foxp3⁺ não se correlacionou com o tempo de evolução das lesões e a idade dos pacientes. Nenhuma diferença significativa na expressão de Foxp3 foi observada entre as amostras de pacientes com teste parasitológico positivo e negativo. Nos pacientes HIV-positivos, o número de células Foxp3⁺ foi de 22 células/mm² e 12 células/mm² na LD e LCM, respectivamente (APÊNDICE E, na Tabela A14, biópsia 2 e na Tabela A15, biópsia 13). Obteve-se uma correlação positiva entre a expressão de Foxp3 e a expressão de caspase-3 ativa na LCL e na LCM (r=0.6185, p=0.0001, n=64) (Figura 21).

No controle, a mediana de células caspase-3 ativa⁺ não foi significativamente diferente da mediana das outras formas clínicas, mas a expressão de Bcl-2 e FasL foi significativamente menor quando comparada com a da LCL e LCM (Kruskal-Wallis, p< 0,05). Nenhuma célula Foxp3⁺ foi observada nas amostras do controle.

Tabela 5 - Frequência de amostras positivas para os marcadores de apoptose e Foxp3 nas formas clínicas da LTA e no controle

Marcador	Controle	LCD	LCL	LCM	LD	LRC
Bcl-2	100% (6/6)	100% (5/5)	100% (53/53)	100% (14/14)	100% (2/2)	100%(1/1)
FasL	100% (6/6)	100% (4/4)	100%(47/47)	100% (11/11)	100% (2/2)	100%(1/1)
Caspase	16,66% (1/6)	16,66% (1/6)	54,71%(28/53)	46,15%(6/13)	50%(1/2)	100%(1/1)
Foxp3	0(0/6)	100% (5/5)	32,20%(19/59)	42,85%(6/14)	50%(1/2)	100%(1/1)

LCD= leishmaniose cutânea difusa, LCL= leishmaniose cutânea localizada, LCM= leishmaniose cutâneo-mucosa, LD=leishmaniose disseminada.

Tabela 6- Mediana, número máximo e mínimo de células/mm² positivas para marcadores de apoptose e para Foxp3 nas diferentes formas clínicas e no controle

Marcador	Controle	LCL	LCM	LCD
Bcl-2	120(48-144)	560(144-1320)	532(144-1360)	352(72-360)
FasL	52(24-104)	240(36-1216)	112(48-672)	78(40-684)
Caspase	0(0-2)	1(0-80)	0(0-23)	0(0-3)
Foxp3	0(0-0)	0(0-190)	0(0-70)	10(3-30)

LCD= leishmaniose cutânea difusa, LCL= leishmaniose cutânea localizada, LCM= leishmaniose cutâneo-mucosa.

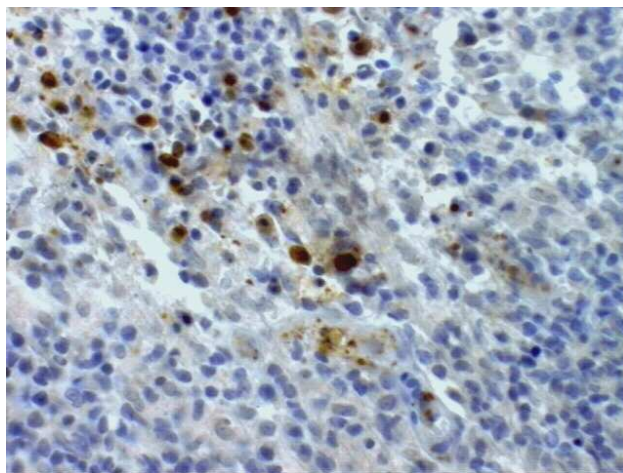


Figura 12 - Células positivas para caspase-3 ativa na amostra 4 da LCL (IHQ-400x).

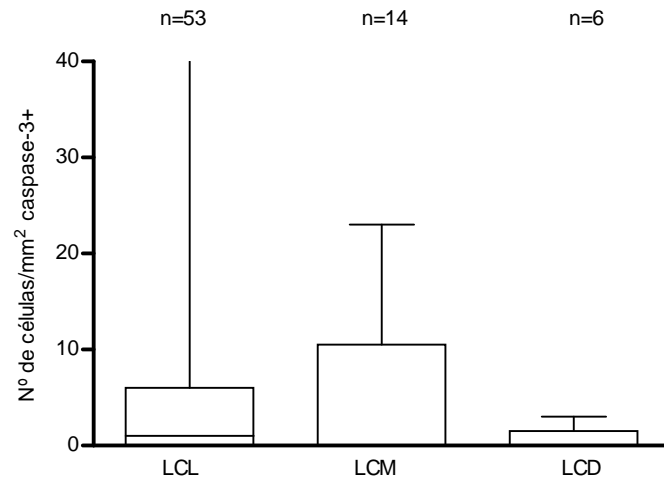


Figura 13 - Número de células/mm² caspase-3 ativa⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A diferença entre as formas clínicas não foi significativa.

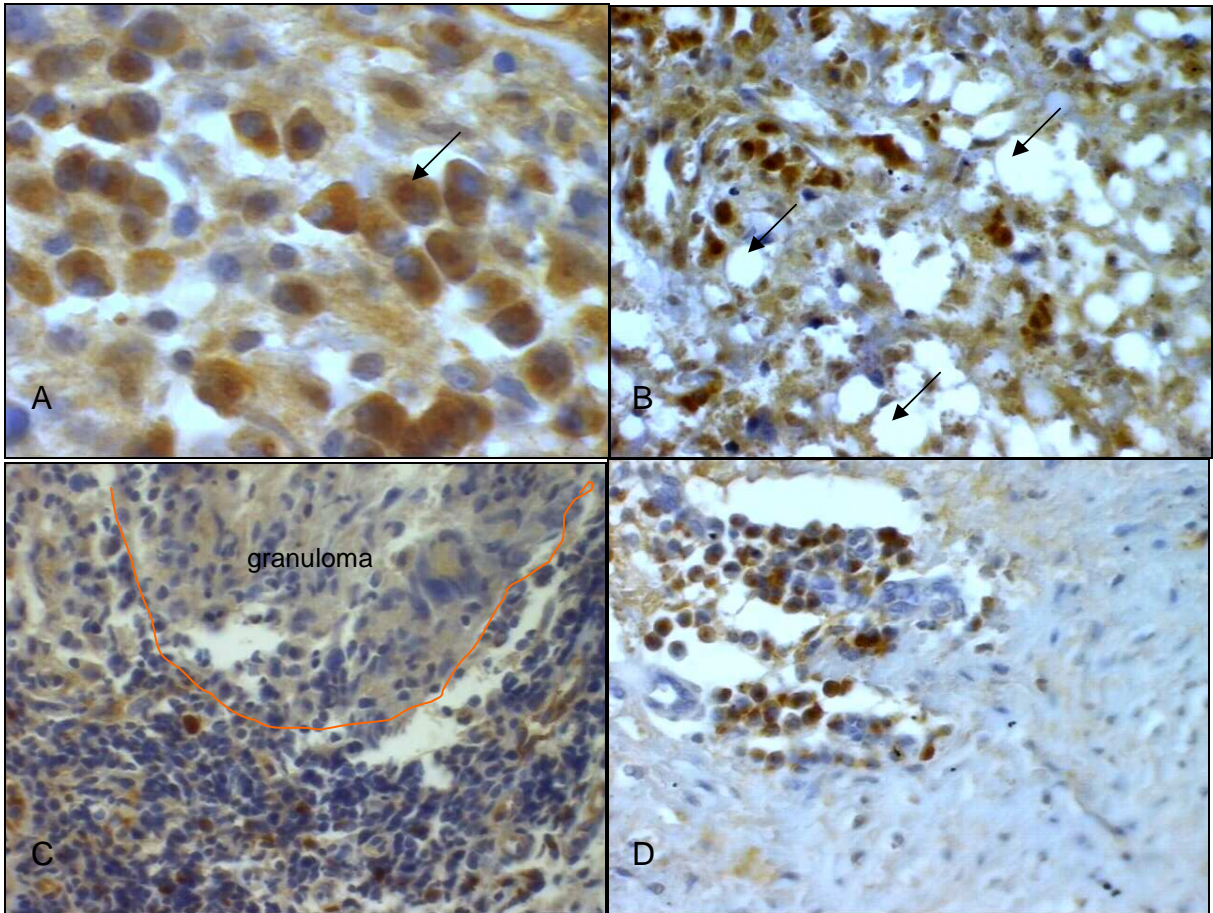


Figura 14 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica. Células positivas coradas em marrom. (A) Plasmócitos intensamente positivos para FasL com marcação paranuclear (seta) na amostra 5 da LCL (1000X); (B) Macrófagos vacuolizados negativos para FasL (seta) na amostra 7 da LCD (400X); (C) Células mononucleares positivas para FasL ao redor de um granuloma negativo na amostra 2 da LCL (400X); (D) Células mononucleares positivas para FasL no controle (400X).

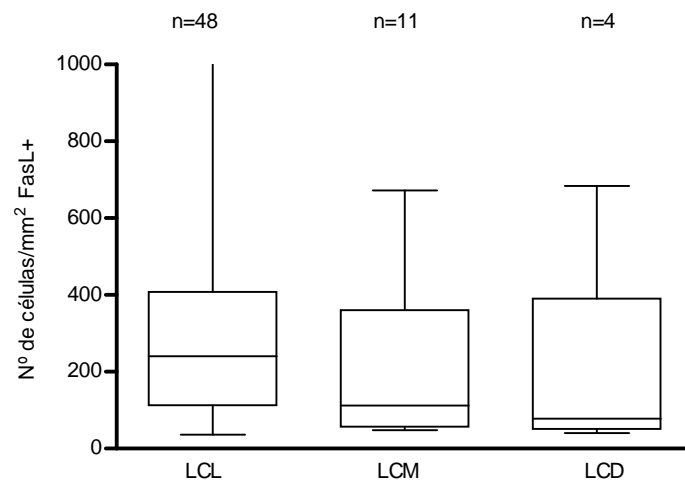


Figura 15 - Número de células/mm² FasL⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço horizontal dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. Não houve diferença significativa entre as formas clínicas.

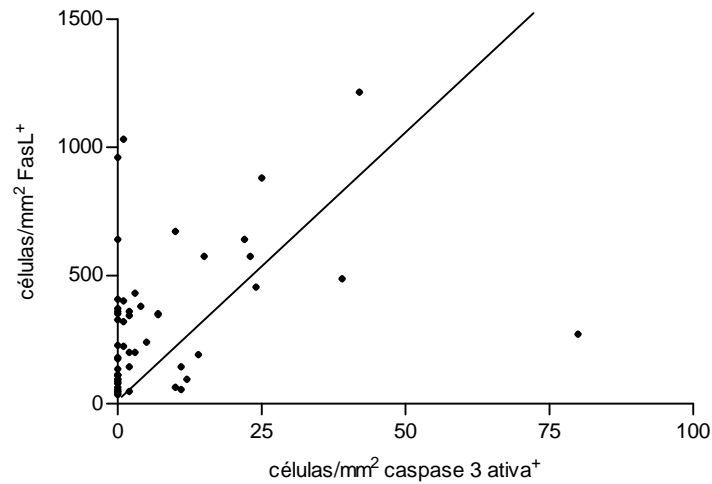


Figura 16 - Correlação entre o número de células/mm² FasL⁺ e o número de células caspase-3 ativa⁺ na LCL. Houve uma correlação positiva entre a expressão de FasL e caspase-3 ativa ($r=0.49$; $p=0.0009$; $n=43$).

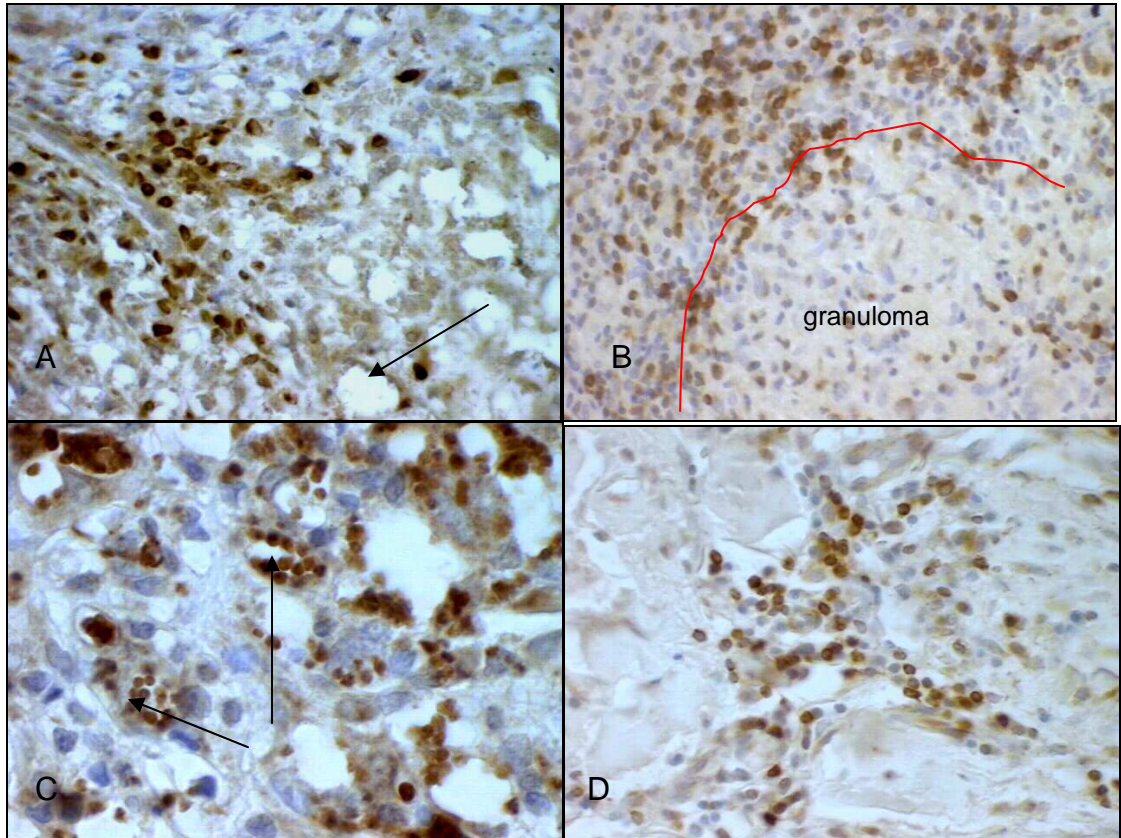


Figura 17 - Cortes histológicos corados por imuno-histoquímica. Células positivas coradas em marrom. (A) Células mononucleares positivas para Bcl-2 e macrófagos vacuolizados negativos (seta) na amostra 2 da LCD (400X); (B) Células mononucleares positivas para Bcl-2 ao redor de um granuloma negativo na amostra 4 da LCL (400X); (C) Leishmânias dentro dos macrófagos positivas para Bcl-X (seta) na amostra 2 da LCD (1000X); (D) Células mononucleares positivas para Bcl-2 no controle (400X).

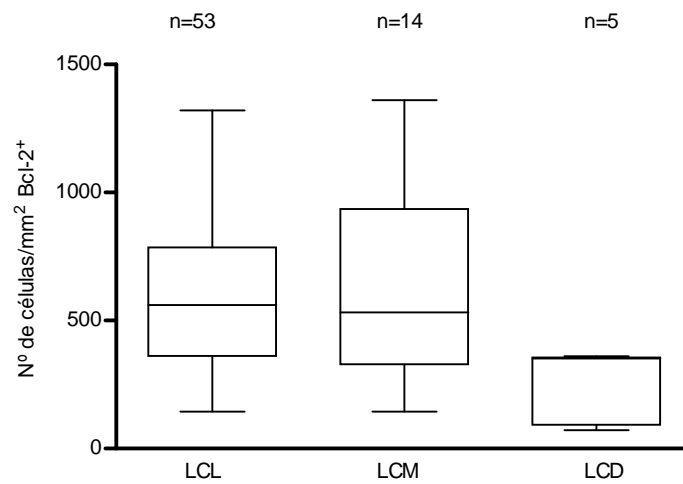


Figura 18 - Número de células/mm² Bcl-2⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente menor de células Bcl-2⁺ quando comparada com a LCL e LCM (Kruskal-Wallis, p= 0,0316).

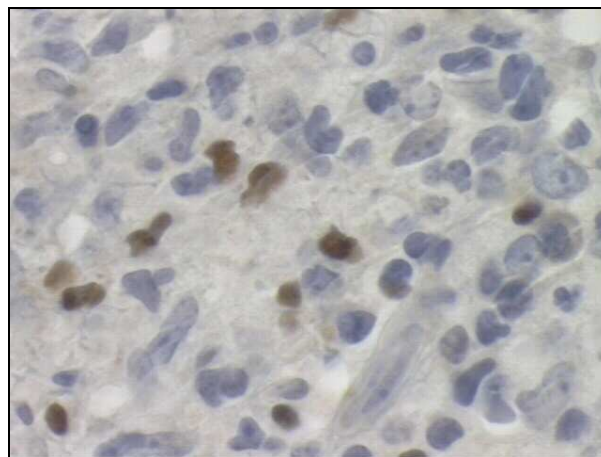


Figura 19 - Células positivas (coradas em marrom) para Foxp3 na amostra 1 da LCD (IHQ-1000X).

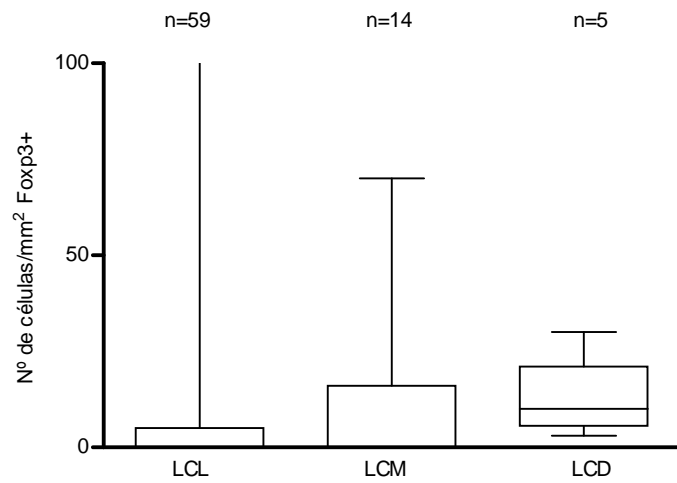


Figura 20 - Número de células/mm² Fcp3⁺ nas lesões de LCL, LCM e LCD. O traço dentro da caixa indica a mediana de células/mm² positivas. A LCD apresentou um número significativamente maior de células Fcp3⁺ quando comparada com a LCL (Kruskal-Wallis, p= 0,03).

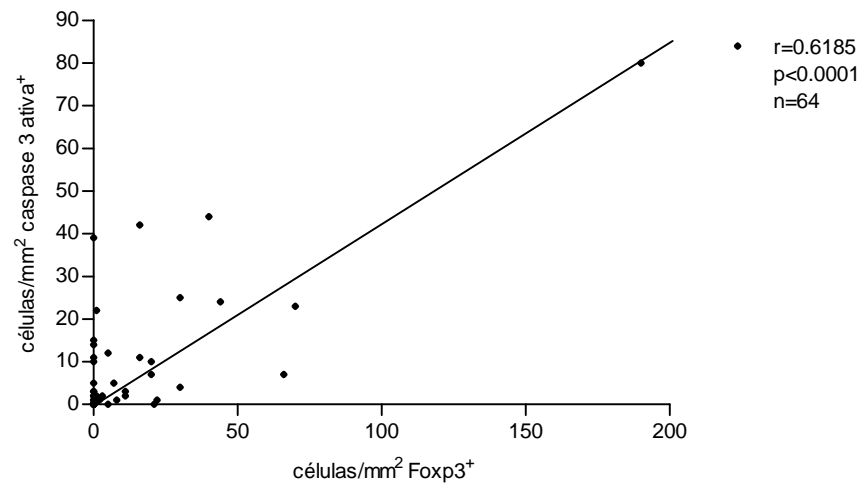


Figura 21 - Correlação entre o número de células/mm² Fcp3⁺ e o número de células caspase-3 ativa⁺ na LCL e LCM. Houve uma correlação positiva entre a expressão de Fcp3 e caspase-3 ativa (r=0,6185, p=0,0001, n=64).

6 DISCUSSÃO

A discussão é apresentada em 2 partes: discussão sobre os métodos e discussão sobre os resultados.

6.1 Discussão sobre os métodos.

O objetivo do presente estudo foi fazer uma análise comparativa da expressão de marcadores imuno-histoquímicos em amostras de biópsia das diferentes formas clínicas da LTA. Com a exceção da LCL, todas as outras formas clínicas são consideradas pouco frequentes. No HUB, nenhum caso de LCD foi encontrado e, por isso, utilizamos amostras de pacientes atendidos no Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão. Houve também dificuldade para a obtenção de um número suficiente de amostras da LD e LRC e o tamanho inadequado das amostras impossibilitou uma análise estatística envolvendo essas formas clínicas.

Os dados clínicos e laboratoriais foram fundamentais tanto para a inclusão das amostras nos estudos quanto para correlação com os achados microscópicos. Na maioria das biópsias de LTA, o diagnóstico não foi conclusivo pela dificuldade de se encontrar o parasita e, por isso, houve necessidade de se confirmar o diagnóstico e descartar outras doenças granulomatosas através dos outros exames realizados pelo paciente. Contudo, houve também uma limitação na obtenção de alguns dados clínicos e laboratoriais já que os mesmos não constavam no prontuário.

No presente estudo, foi obtida a identificação da espécie de apenas 21 amostras de leishmânia, todas as amostras eram de pacientes atendidos no HUB. Entretanto, em estudo recente foi determinado que a *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie causadora da leishmaniose cutânea no HUB (SANTOS; ROSELINO; SAMPAIO, 2009). Nos casos de LCD, provenientes do Maranhão, a provável espécie envolvida é a *L. (L.) amazonensis*, já que esta é a espécie responsável por essa forma clínica no Brasil.

Para a avaliação histológica e imuno-histoquímica vários cortes histológicos tiveram que ser obtidos dos blocos de parafina. Devido ao pequeno tamanho do fragmento, algumas amostras de biópsia tiveram que ser excluídas e, de outras, o

número de cortes obtidos não foi suficiente para a realização de todas as reações imuno-histoquímicas. Neste estudo, optou-se pela imuno-histoquímica por se tratar de uma técnica que vem sendo amplamente utilizada em pesquisa envolvendo a imunopatologia das doenças infecciosas, já que permite a detecção do agente infeccioso, identificação dos tipos celulares envolvidos na resposta tecidual inflamatória *in situ* e identificação de uma série de marcadores celulares. Em nosso estudo, tentou-se utilizar um anticorpo anti-leishmânia produzido na Universidade de São Paulo, mas os cortes apresentaram reação de fundo e, por isso, não foram considerados.

Na análise da expressão de marcadores dos tipos celulares (CD4, CD8, CD15, CD20, CD45RO, CD68, FasL e Bcl-2) foram utilizados dois campos microscópicos no aumento de 400x de acordo com estudo prévio (MUSTAFÁ *et al.*, 2001). A contagem das células positivas foi realizada com o auxílio de um programa de análise digital de imagens (Unbvision) as quais foram capturadas dos campos microscópicos. Esse programa realiza a contagem das células à medida que elas são identificadas pelo observador, facilitando as análises de amostras em que a expressão é elevada e, além disso, permite que a contagem seja salva.

Para a análise de caspase-3, Foxp3 e CD1a foi avaliado um maior número de campos microscópicos, já que a expressão era baixa e nem sempre homogênea. Não foi utilizado o programa de análise digital de imagens porque várias imagens teriam que ser capturadas e, portanto, o seu uso não seria vantajoso.

6.2 Discussão sobre os resultados

Considerando o papel importante da apoptose e da célula T reguladora na modulação da resposta imune, o objetivo deste estudo foi avaliar, em amostras de biópsia das diferentes formas clínicas, a expressão de proteínas envolvidas na apoptose e a expressão do fator de transcrição Foxp3. Essa expressão foi correlacionada com dados clínico-laboratoriais, alterações histológicas e tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório.

Com relação aos dados clínicos e laboratoriais obtidos, nossos resultados estão de acordo com os descritos previamente (NAME *et al.*, 2005; SAMPAIO; de PAULA, *et al.*, 1999; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Algumas diferenças foram observadas entre as formas clínicas. Na LCD, forma cutânea mais grave, as

lesões eram múltiplas, de longa duração e a IDRМ negativa, enquanto a maioria dos pacientes com LCL apresentou lesão única e IDRМ positiva. Na LCM, a faixa etária de acometimento foi mais elevada do que nas outras formas clínicas, já que geralmente as lesões se iniciam alguns anos após o surgimento da lesão cutânea. Os casos de LCL e LCM causados por *L. (L.) amazonensis* apresentaram IDRМ positiva, diferentemente dos casos de LCD, também causados por essa espécie. Em estudo prévio, MORAES e SILVEIRA (1994) obtiveram IDRМ positiva em 50% dos casos de LCL causada pela *L. (L.) amazonensis*.

As alterações histopatológicas observadas neste estudo estão de acordo com as descritas previamente por diversos autores (BITTENCOURT; BARRAL, 1991; MAGALHÃES *et al.*, 1986; RIDLEY *et al.*, 1980). Entre as formas clínicas, a LCD é a que histologicamente mais se diferencia das outras pela presença de numerosos parasitos, infiltrado inflamatório de mononucleares escasso e ausência de alterações dérmicas como (granuloma, célula gigante multinucleada, e necrose). As outras formas clínicas são caracterizadas por um intenso e difuso infiltrado inflamatório de mononucleares, escassez parasitária e presença variável de alterações no epitélio de revestimento (ulceração, exocitose de linfócitos e hiperplasia) e na derme/lâmina própria (granuloma, célula gigante multinucleada, fibrose e necrose). Neste estudo, observou-se que, no controle, o infiltrado inflamatório é mais escasso e sempre associado à fibrose, aspecto semelhante ao de uma lesão cicatricial da LTA. A fibrose foi mais frequente na LCM e na LCD, formas clínicas que apresentaram maior tempo de evolução. Em estudo prévio, MORAES e SILVEIRA, (1994) observaram que as alterações histológicas na LCL causada por *L. (L.) amazonensis*, eram semelhantes às encontradas na LCD. Contudo, amastigotas foram observadas em apenas 1 das 3 amostras de LCL causadas por essa espécie, no presente estudo.

Os tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório identificados pela análise imuno-histoquímica foram similares aos descritos previamente por outros autores (AMATO; ANDRADE; DUARTE, 2003; DIAZ *et al.*, 2002; KENNER *et al.*, 1999; MORGADO *et al.*, 2008). No presente estudo, diferenças significativas no número de linfócitos T e B foram observadas principalmente entre a LCD e as outras formas clínicas (LCL e LCM). Na LCL causada pela *L. (L.) amazonensis*, o número de células positivas para os marcadores de células T se aproximou mais do observado na LCL do que do número observado na LCD, também causada pela

L. (L.) amazonensis, o que mostra que a mesma espécie pode desencadear resposta imune diferente. Com relação à expressão de CD1a observou-se que a média de células positivas foi significativamente menor na LCM, quando comparada com a LCL, sendo o número de células positivas/mm² semelhante ao encontrado por outros autores (AMATO; ANDRADE; DUARTE, 2003). Estudo recente, que analisou o número de células de Langerhans nas lesões da IDR, também observou um número menor de células de Langerhans nas lesões dos pacientes com LCM, apesar da intensidade da IDR ter sido maior na LCM do que na LCL (NOGUEIRA; SOTTO; CUCÉ, 2008). Xavier *et al.* (2005) observaram ainda que, na LCL causada pela *L. (L.) amazonensis* e com IDR negativa, a quantidade de células de Langerhans é maior do que na LCL causada pela *L. (V.) braziliensis* com IDR positiva. Estes estudos sugerem, portanto, que a densidade de células de Langerhans no epitélio não está diretamente associada à intensidade da IDR e, conseqüentemente, com a intensidade da resposta imune. Em concordância com estes estudos, na presente pesquisa, apesar de a IDR ser negativa na LCD e ser positiva em apenas 56 de 63 pacientes na LCL, obteve-se um menor número de células de Langerhans na LCM que apresentou IDR positiva em todos os pacientes e com intensidade geralmente maior do que na LCL. O papel da célula de Langerhans na regulação da resposta imune tem sido questionado em trabalhos recentes (MORENO 2007; RITTER; OSTERLOH, 2007). Além da célula de Langerhans, outros tipos de células dendríticas têm sido identificados, na pele (BRANDONISIO; SPINELLI; PEPE, 2004) e na mucosa nasal mas o papel dessas células apresentadoras de antígeno ainda não está bem definido (JAHNSEN *et al.*, 2004). No controle, todas as células constituintes do infiltrado inflamatório estão em menor número do que na LTA, com a exceção da expressão de CD1a que foi menor na LCM. Esse menor número de células no infiltrado do controle ocorre por que a lesão já está em processo de cicatrização, um número reduzido de células inflamatórias também é observado na lesão cicatricial da LTA.

Com relação à expressão dos marcadores da apoptose, células apoptóticas (caspase-3 ativa ⁺) foram identificadas em apenas 37 das 75 amostras avaliadas e o número de células positivas foi baixo em todas as formas clínicas. Mustafá *et al.* (2001), analisando a apoptose na tuberculose, também observaram um baixo número de células apoptóticas nas lesões. Diferentemente da necrose, a apoptose ocorre em células isoladas que são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos. O

processo tem duração de poucas horas e não provoca inflamação, tais fatos explicariam, portanto, a dificuldade de identificação dessas células (KERR; WYLLIE; CURRIE, *et al.*, 1972; KRYSKO *et al.*, 2008).

O maior número de células apoptóticas na LCL, observado neste estudo, pode estar associado à presença de necrose nas lesões dessa forma clínica, já que a apoptose foi significativamente mais frequente nas amostras com necrose. Essa associação entre necrose e apoptose também já havia sido observada nas lesões da tuberculose (FAYYAZI *et al.*, 2000). O maior número de células apoptóticas na LCL também pode ser explicado pela maior expressão de FasL e pela correlação positiva significativa entre a expressão de caspase-3 ativa e FasL obtida nessa forma clínica. A maior frequência de células apoptóticas e de células FasL⁺ na LCL, forma clínica caracterizada por resolução espontânea, está de acordo com trabalhos prévios que mostraram que a resolução das lesões causadas por *Leishmania major* em camundongos necessita da via Fas/FasL (CHAKOUR *et al.*, 2003; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1998).

O FasL foi expresso em todas as amostras de todas as formas clínicas. Na derme/lâmina própria a expressão foi mais intensa nas células mononucleares constituintes do infiltrado inflamatório, principalmente em plasmócitos. A expressão de FasL em plasmócitos já foi evidenciada em estudo prévio. Strater *et al.* (1999) observaram, através de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, que os plasmócitos são os principais produtores de FasL no sistema imune periférico normal, e concluíram que o papel destas células na regulação da resposta imune pode estar sendo subestimado. Esses autores observaram ainda que os plasmócitos exibiam um padrão de expressão do FasL do tipo paranuclear, o que sugere que essas células liberam o FasL solúvel. O FasL solúvel é menos eficiente do que o FasL ligado à membrana e, pode inclusive bloquear a apoptose mediada por FasL ligado à membrana (TANAKA *et al.*, 1998).

Ainda com relação à expressão de FasL, Mustafa *et al.* (2001) observaram que na Tuberculose e na Hanseníase os macrófagos com maior número de bactérias apresentaram uma maior expressão de FasL. De acordo com esses autores, o FasL expresso na superfície dos macrófagos quando em contato com o Fas na superfície dos linfócitos seria responsável pela apoptose desses linfócitos. Assim, nas formas multibacilares, a apoptose dos linfócitos seria um mecanismo de evasão da bactéria. Contudo, diferentemente do observado nas formas

multibacilares da TB e hanseníase, na LTA os macrófagos com numerosos parasitas não apresentaram uma maior expressão de FasL.

Nos macrófagos vacuolizados e nos granulomas não houve expressão de Bcl-2 e de Bcl-X, mas a expressão de BaK foi intensa. Esse desequilíbrio na expressão de membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 também foi observado na TB, e pode ser um dos mecanismos responsáveis pela apoptose dos macrófagos segundo Mustafá *et al.*, (2005). Na LCD, o menor número de células Bcl-2⁺ positivas pode ser explicado pela menor quantidade de linfócitos nesta forma clínica.

Em trabalho recente, Eidsmo *et al.*, (2005) sugeriram que a apoptose via Fas/FasL seria um dos mecanismos contribuintes para a ulceração nas lesões da LCL. Esses autores observaram, através da técnica de TUNEL, maior número de células apoptóticas na epiderme hiperplásica adjacente à úlcera do que na normal. De acordo com esses autores, a apoptose seria desencadeada pela interação entre FasL expresso nas células inflamatórias e o Fas expresso pelos ceratinócitos já que na epiderme normal geralmente não há expressão de FasL (BAIMA; STICHERLING, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2002). No presente estudo, numerosas células inflamatórias subepidérmicas positivas para Fas L foram evidenciadas. Contudo, raras células apoptóticas foram evidenciadas na epiderme hiperplásica adjacente à úlcera. Portanto, não foi possível estabelecer uma associação entre a apoptose dos ceratinócitos e a formação da úlcera. A técnica de TUNEL, empregada pelos autores tem sido criticada em trabalhos recentes, pela falta de especificidade e seus resultados devem ser sempre correlacionados com a morfologia e expressão de marcadores de apoptose (BAIMA; STICHERLING, 2002). A apoptose dos ceratinócitos tem sido associada à ulceração em algumas doenças cutâneas (e.g. Erupção fixa à droga, Síndrome de Stevens-johnson) entretanto, nessas dermatoses, ao contrário do que acontece na leishmaniose, numerosas células apoptóticas são evidenciadas nos cortes corados por HE (CHOI *et al.*, 2006; ABE *et al.*, 2003). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para melhor definir a contribuição da apoptose na ulceração.

Atualmente a existência de morte celular programada, similar a apoptose que ocorre em organismos multicelulares, tem sido amplamente aceita nas leishmânias. Contudo, as proteínas que regulam esse processo ainda não são conhecidas. Genes que codificam proteínas similares aos membros da família Bcl-2 e caspases não foram identificados na análise de sequência genética da leishmânia. Contudo,

recentemente proteínas semelhantes às caspases, denominadas metacaspases, foram encontradas (AMBIT *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrada que a expressão de Bcl-X humana em *L. infantum* protege o parasito da morte celular induzida pelo calor (ALZATE *et al.*, 2006). Em nosso estudo, a expressão de Bcl-X nas formas amastigotas sugere a possível existência de uma proteína semelhante a Bcl-X encontrada em organismos multicelulares, mas esse achado deve ser investigado por outros métodos para se descartar reação cruzada.

Com relação à célula Treg, células Foxp3⁺ foram observadas em lesões de todas as formas clínicas, mas o número de amostras com células positivas e o número de células positivas nas amostras foram baixos em todas as formas clínicas. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos recentes que analisaram a expressão de células de Foxp3 no sangue periférico e em lesões de pele infectadas com *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* (JI *et al.*, 2005; CAMPANELLI *et al.*, 2006). Na pele normal, células Foxp3⁺ estiveram presentes em alguns estudos e ausentes em outros, provavelmente devido ao escasso número de células T no tecido (SUGIYAMA *et al.*, 2005; VERHAGEN *et al.*, 2006). Da mesma forma, no presente estudo, a ausência de célula Foxp3⁺ no controle pode ser explicada pelo menor número de células T no infiltrado inflamatório. No sangue periférico de indivíduos saudáveis, as células Treg representam apenas 5 a 10% das células T do sangue periférico.

A expressão de Foxp3 não foi evidenciada em todas as amostras e o número de células positivas foi variável em amostras da mesma forma clínica. Esta variação no número de células Foxp3⁺ também foi observada em estudo recente envolvendo lesões infectadas *L. (V.) braziliensis* (CAMPANELLI *et al.*, 2006). Em outras doenças inflamatórias da pele e na pele normal, de Boer *et al.*, (2007) obtiveram também uma grande variação na frequência de células Foxp3⁺. Na tentativa de explicar essas diferenças, a expressão de Foxp3 foi correlacionada com a idade do paciente e o tempo de evolução da doença, mas nenhuma associação foi observada.

No presente estudo, foi observado que a LCD, apesar de apresentar um menor número de células CD4⁺, mostrou um número significativamente maior de células Foxp3⁺ quando comparada com a LCL. Em outras doenças infecciosas, número aumentado de células Foxp3⁺ tem sido associado com a supressão da resposta imune (BELKAID e ROUSE, 2005; BELKAID, 2007). Considerando isso, nossos resultados podem sugerir que o maior número de células Treg em LCD pode

estar associado com a hiporresponsividade observada nessa forma clínica. Diferentemente do observado na LCD, na LCL causada pela *L.(L.) amazonensis*, nenhuma amostra expressou Foxp3 indicando que a espécie de leishmânia não foi o fator determinante para o maior número de células Treg na LCD.

Estudos prévios demonstraram que, em lesões causadas por *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*, células Treg secretam IL-10 e suprimem a proliferação e a produção de citocinas pelas células efetoras (JI *et al.*, 2005; CAMPANELLI *et al.*, 2006). Outro mecanismo de ação da célula Treg que tem sido descrito é a apoptose da célula T efetora (ASKENASY *et al.*, 2008; Yolcu *et al.*, 2008). No presente estudo, obteve-se uma correlação positiva entre a expressão de Foxp3 e caspase-3 ativa na LCL e na LCM, sugerindo que a apoptose possa ser um possível mecanismo de ação da células Treg nestas formas clínicas.

Nos pacientes HIV-positivos, as manifestações clínicas da LTA são diversas e dependem do estado imunológico do paciente. Formas clínicas mais severas, com lesões cutâneas múltiplas e envolvimento mucoso são comuns nesses pacientes e foram observadas nos pacientes do presente estudo (LINDOSO *et al.*, 2009; MATTOS *et al.*, 1998; SAMPAIO *et al.*, 2002). Nas amostras de nossos pacientes HIV-positivos, o número de células CD4⁺ foi menor do que o número (mediana) observado nas amostras de LCM e LD dos pacientes HIV-negativos. Mesmo com um menor número de células T CD4⁺, as lesões dos pacientes HIV-positivos apresentaram células Foxp3⁺. Na LCM, o número de células Foxp3⁺ foi inclusive maior do que o número (mediana) observado nos pacientes HIV-negativos. O papel das células Treg nos pacientes HIV-positivos é contraditório, mas há evidência de que essas células possam suprimir a resposta das células T efetoras contra o vírus (ALLAN *et al.*, 2008).

Resumidamente, no presente estudo, as diferenças observadas na expressão de marcadores de apoptose e da célula Treg, entre as diferentes formas cínicas da LTA, sugerem que a apoptose das células do sistema imune e a presença da célula Treg sejam fatores importante na determinação da evolução das lesões. As vias da apoptose e os mecanismos de ação da célula Treg têm sido alvos para o desenvolvimento de novas terapias em diversos tipos de doenças e, portanto, os resultados do nosso estudo poderão ser usados como base para estudos futuros.

7. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas na presente pesquisa foram as seguintes:

O número de células apoptóticas foi baixo em todas as formas clínicas da LTA e não foi significativamente diferente entre elas.

O maior número de células apoptóticas na LCL e a correlação positiva significativa entre a expressão de caspase-3 ativa e FasL obtida nessa forma clínica sugerem que a via Fas/FasL seja mediadora da apoptose na LTA e importante na evolução clínica das lesões, já que a LCL é a forma clínica caracterizada pela resolução espontânea das lesões.

A expressão de Bcl-X nas formas amastigotas sugere a possível existência de uma proteína semelhante à Bcl-X encontrada em organismos multicelulares, mas esse achado deve ser investigado por outros métodos.

O número de células Foxp3⁺ foi baixo em todas as formas clínicas da LTA

A LCD, apesar de apresentar um menor número de células CD4⁺, mostrou um número significativamente maior de células Foxp3⁺ quando comparada com a LCL. O maior número de células Treg na LCD pode estar associado com a hiporresponsividade observada nessa forma clínica.

A correlação positiva entre a expressão de caspase-3 ativa e a expressão de Foxp3 na LCL e LCM indica que a apoptose possa ser um dos mecanismos de regulação da célula Foxp3⁺ nestas formas clínicas.

O menor número de células Langerhans na LCM, quando comparada com outras formas e o controle, sugere que a densidade destas células no epitélio não está diretamente associada com a intensidade da IDRM e, portanto, com a intensidade da resposta imune.

REFERÊNCIAS

- ABE R.; SHIMIZU T.; SHIBAKI A.; NAKAMURA H.; WATANABE H.; SHIMIZU H. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. **American Journal Pathology**, 162:1515-1520, 2003.
- ALLAN S.E.; BROADY R.; GREGORI S.; HIMMEL M.E.; LOCKE N.; RONCAROLO M.G.; BACCHETTA R.; LEVINGS M.K. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. **Immunological Reviews**, 223: 391- 421, 2008.
- ALZATE J.F.; ALVAREZ-BARRIENTOS A.; GONZÁLEZ V.M.; JIMÉNEZ-RUIZ A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. **Apoptosis**, 11(2):161-71, 2006.
- AMATO V.S.; DE ANDRADE H.F.; DUARTE MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**, 85: 39-49, 2003.
- AMBIT A; FASEL N; COOMBS GH; MOTTRAM JC. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differentiation** 15(1):113-22, 2008.
- ARNOULT D.; AKARID K.; GRODET A.; PETIT P.X.; ESTAQUIER J.; AMEISEN J.C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death Differentiation**, 9(1): 65-81, 2002.
- ASKENASY N.; KAMINITZ A.; YARKONI S. Mechanisms of T regulatory cell function. **Autoimmunity Reviews**, 7(5):370-5, 2008.
- BAIMA B.; STICHERLING M. Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus. **British Journal of Dermatology**, 144(5):958-66, 2001.
- BAIMA B.; STICHERLING M. How specific is the TUNEL reaction? An account of a histochemical study on human skin. **American Journal of Dermatopathology**, 24(2):130-4, 2002.
- BANZ A.; PONTOUX C.; PAPIERNIK M. Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. **The Journal of Immunology**, 169(2):750-7, 2002.
- BARCINSKI M.A.; DOS REIS G.A. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32(4):395-401, 1999.

BARRAL-NETTO M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A; CARVALHO, E.M. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 19: 173-191, 1986.

BASANO S.A.; CAMARGO L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7: 328-337, 2004.

BELKAID Y.; PICCIRILLO C.A.; MENDEZ S.; SHEVACH E.M.; SACKS D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. **Nature**, 420:502-7, 2002.

BELKAID Y.; ROUSE B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nature Immunology**, 6: 353-60, 2005.

BELKAID Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews Immunology**, 7(11):875-88, 2007.

BERTHO A.L.; SANTIAGO M.A.; DA-CRUZ A.M.; COUTINHO S.G. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33:317-25, 2000.

BITTENCOUR T A.L.; BARRAL A. Evaluation of histopathological classifications of American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86:51-56, 1991.

BOGDAN C.; ROLLINGHOFF M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, 28:121-34, 1998.

BRANDONISIO O.; SPINELLI R.; PEPE M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes and Infection**, 6(15):1402-9, 2004.

BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 7: 249-257, 2003

CAMPANELLI A.P.; ROSELINO A.M.; CAVASSANI K.A.; PEREIRA M.S.; MORTARA R.A.; BRODSKYN C.I.; GONCALVES H.S.; BELKAID Y.; BARRAL-NETTO M.; BARRAL A.; SILVA J.S. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **The Journal of Infectious Disease**, 193 (9):1313-22, 2006.

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. **The Journal of Immunology**, 135: 4144 - 4148, 1985.

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

CASTES M.; AGNELLI A.; VERDE O.; RONDÓN A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 27:176-186, 1983.

CHAKOUR R.; GULER R.; BUGNON M.; ALLENBACH C.; GARCIA I.; MAUËL J.; LOUIS J.; TACCHINI-COTTIER F. Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. **Infection and Immunity**, 71(9): 5287-95, 2003.

CHOI H.J.; KU J.K.; KIM M.Y.; KANG H.; CHO S.H.; KIM H.O.; PARK Y.M. Possible role of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in the pathogenesis of fixed drug eruption. **British Journal of Dermatology**, 154(3):419-25, 2006.

CHOWDHURY I.; THARAKAN B.; BHAT GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 11(4):506-25, 2006.

CONCEIÇÃO-SILVA F.; HAHNE M.; SCHRÖTER M.; LOUIS J.; TSCHOPP J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **European Journal of Immunology**, 28(1):237-45, 1998.

CONVIT J.; ULRICH M.; FERNÁNDEZ C.T.; TAPIA F.J.; CÁCERES-DITTMAR G.; CASTÉS M.; RONDÓN A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 87:444-8, 1993.

COOLS N.; PONSARTS P.; VAN TENDELOO V.F.; BERNEMAN Z.N. Regulatory T cells and human disease. **Clinical and Developmental Immunology**, 2007:1-11, 2007.

DAS G.; VOHRA H.; RAO K.; SAHA B.; MISHRA G.C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scandinavian Journal of Immunology**, 49: 307-10, 1999.

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

DE BOER O.J.; VAN DER LOOS C.M.; TEELING P.; VAN DER WAL A.C.; TEUNISSEN M.B. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 55: 891-8, 2007.

DEBRABANT A.; LEE N.; BERTHOLET S.; DUNCAN R.; NAKHASI H.L. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **International Journal for Parasitology**, 33(3):257-67, 2003.

DIAZ N.L.; ZERPA O.; PONCE L.V.; CONVIT J.; RONDON A.; TAPIA F.J. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. **Experimental Dermatology**, 11(1):34-41, 2002.

DOCKRELL D.H. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. **Clinical Microbiology and Infection**, 9: 766-79, 2003.

EIDSMO L.; NYLEN S.; KHAMESIPOUR A.; HEDBLAD M.A.; CHIODI F.; AKUFFO H. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during Leishmania major-induced cutaneous Leishmaniasis. **American Journal Pathology**, 166(4):1099-108, 2005.

FAYYAZI A.; EICHMEYER B.; SORURI A.; SCHWEYER S.; HERMS J.; SCHWARZ P.; RADZUN H.J Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. **The Journal of Pathology**, 191(4):417-25, 2000.

FURTADO T. Critérios para diagnóstico de LTA. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 65: 51-86, 1980.

GALLUZZI L.; MAIURI M.C.; VITALE I.; ZISCHKA H.; CASTEDO M.; ZITVOGEL L.; KROEMER G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differentiation**, 14(7):1237-43, 2007.

GONTIJO B.; DE CARVALHO M.L.R. [American cutaneous leishmaniasis] **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1):71-80, 2003.

GRIMALDI G. JR.; TESH R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, 6:230-50, 1993.

HORI S.; NOMURA T.; SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, 14; 299 (5609):1057-61, 2003.

JAHNSEN F.L.; GRAN E.; HAYE R.; BRANDTZAEG P. Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes. **Am Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 30(1):31-7, 2004.

Jl J.; MASTERSON J.; SUN J.; SOONG L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during Leishmania amazonensis infection. **The Journal of Immunology**, 174:7147-53, 2005.

JONULEIT H.; SCHMITT E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **The Journal of Immunology**, 15;171(12): 6323-7, 2003.

KENNER J.R.; ARONSON N.E.; BRATTHAUER G.L.; TURNICKY R.P.; JACKSON J.E.; TANG D.B.; SAU P. Immunohistochemistry to identify Leishmania parasites in fixed tissues. **Journal of Cutaneous Pathology**, 26:130-6, 1999.

KERR J.F.; WYLLIE A.H.; CURRIE A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, 26(4):239-57, 1972.

KRAJEWSKI S.; KRAJEWSKA M.; SHABAIK A.; WANG H.G.; IRIE S.; FONG L.; REED J.C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. **Cancer Research**, 54(21):5501-7, 1994.

KRAJEWSKI S.; KRAJEWSKA M.; REED J.C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. **Cancer Research**, 56(12):2849-55, 1996.

KRYSKO D.V.; VANDEN BERGHE T.; PARTHOENS E.; D'HERDE K.; VANDENABEELE P. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. **Methods in Enzymology**, 442:307-41, 2008.

LASKAY T.; MIKÓ T.L.; NEGESSE Y.; SOLBACH W.; RÖLLINGHOFF M.; FROMMEL D. Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 89(3):273-5, 1995.

LESSA M.M.; LESSA H.A.; CASTRO T.W.; OLIVEIRA A.; SCHERIFER A.; MACHADO P.; CARVALHO E.M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 73(6):843-7, 2007.

LINDOSO J.A.; BARBOSA R.N.; POSADA-VERGARA M.P.; DUARTE M.I.; OYAFUSO L.K.; AMATO V.S.; GOTO H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **British Journal of Dermatology**, 160: 311-8, 2009.

LUDER C.G.; GROSS U.; LOPES MF. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends in Parasitology**, 17: 480-6, 2001.

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**, 28:421-30, 1986.

MARSDEN P.D. Mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 27(2): 93-101, 1994.

MARZOCHI M.C.; MARZOCHI K.B. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do Novo Mundo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 27: 91,1994.

MATTOS M.; CAIZA A.; FERNANDES O.; GONÇALVES A.J.; PIRMEZ C.; SOUZA C.S.; OLIVEIRA-NETO M.P. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 10(3):218-25, 1998.

MENDEZ S.; RECKLING S.K.; PICCIRILLO C.A.; SACKS D.; BELKAID Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, 200:201-10, 2004.

MENDONÇA S.C.; SOUZA W.J.; NUNES M.P.; MARZOCHI M.C.; COUTINHO S.G. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 83(3): 347-55, 1988.

MENDONÇA M.G.; DE BRITO M.E.; RODRIGUES E.H.; BANDEIRA V.; JARDIM M.L.; ABATH F.G. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **The Journal of Infectious Disease**, 189:1018-23, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília, DF, 2007.182 p.

MOORE KJ.; MATLASHEWSKI G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **The Journal of Immunology**, 152(6): 2930-7, 1994.

MORAES M.A.; SILVEIRA F.T. [Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*] **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 36(5):459-63, 1994.

MORENO J. Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, 23(3): 86-8, 2007.

MORGADO F.N.; SCHUBACH A.; ROSALINO C.M.; QUINTELLA L.P.; SANTOS G.; SALGUEIRO M.; CONCEIÇÃO-SILVA F. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **British Journal of Dermatology**, 158(1):50-8, 2008.

MUSTAFA T.; BJUNE T.G.; JONSSON R.; PANDO R.H.; NILSEN R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, 54(6):630-9, 2001.

MUSTAFA T.; MOGGA S.J.; MFINANGA S.G.; MØRKVE O.; SVILAND L. Significance of Fas and Fas ligand in tuberculous lymphadenitis. **Immunology**, 114: 255-62, 2005.

NAME R.Q.; BORGES K.T.; NOGUEIRA L.S.C; SAMPAIO J.H.D; TAUIL P.L; SAMPAIO R.N.R. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 80(3): 249-54, 2005.

NGUEWA P.A.; FUERTES M.A.; VALLADARES B.; ALONSO C.; PÉREZ J.M. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? **Trends in Parasitology**, 20(8):375-80, 2004.

NOGUEIRA M.F.; SOTTO M.N.; CUCÉ L.C. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 50(5): 283-6, 2008.

OLIVEIRA-NETO M.P.; MATTOS M.; SOUZA C.S.; FERNANDES O.; PIRMEZ C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, 37(11):846-9, 1998.

OLIVEIRA J.G.; NOVAIS F.O.; DE OLIVEIRA C.I.; DA CRUZ JUNIOR A.C.; CAMPOS L.F.; DA ROCHA A.V.; BOAVENTURA V.; NORONHA A.; COSTA J.M.; BARRAL A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, 94(1): 55-9, 2005.

PETERS N.; SACKS D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunological Reviews**, 213:159-79, 2006.

PINHEIRO R.O.; PINTO E.F.; BENEDITO A.B.; LOPES U.G.; ROSSI-BERGMANN B. The T-cell anergy induced by Leishmania amazonensis antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76:519-27, 2004.

RIDLEY D.S.; MARSDEN P.D.; CUBA C.C.; BARRETO A.C. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 74:508-514, 1980.

RITTER U.; OSTERLOH A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, 196 (1):51-9, 2007.

RUIZ J.H.; BECKER I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, 29(12):671-8, 2007.

SAMPAIO R.N.; DE PAULA C.D. American cutaneous leishmaniasis in the Federal District . **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32: 523-8, 1999.

SAMPAIO R.N.; SALARO C.P.; RESENDE P.; DE PAULA C.D. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(6): 651-4, 2002.

SANTOS, G. M.; ROSELINO, A. M. F.; SAMPAIO, R. N. R. Leishmania (Viannia) braziliensis is the main specie that causes cutaneous leishmaniasis in the Federal District Brazil. In: 4th World Congress on Leishmaniasis 2009, 2009, Lucknow. Abstract Book of the 4th World Congress on Leishmaniasis, 2009. v. 01. p.104-104.

SARASTE A.; PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, 45(3):528-37, 2000.

SCHAUMBURG F.; HIPPE D.; VUTOVA P.; LÜDER C.G. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. **Parasitology**, 132 Suppl:S69-85, 2006.

SCHUBACH A.; CUZZI-MAYA T.; OLIVEIRA A.V.; SARTORI A.; DE OLIVEIRA-NETO M.P.; MATTOS M.S.; ARAÚJO M.L.; SOUZA W.J.; HADDAD F.; PEREZ M. A.; PACHECO R.S.; MOMEN H.; COUTINHO S.G.; DE ALMEIDA MARZOCHI M.C.; MARZOCHI K.B, DA COSTA S.C. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96:987-96, 2001.

SILVEIRA F.T.; LAINSON R.; CORBETT C.E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(3):239-51, 2004.

STRÄTER J.; MARIANI S.M.; WALCZAK H.; RÜCKER F.G.; LEITHÄUSER F.; KRAMMER P.H.; MÖLLER P. CD95 ligand (CD95L) in normal human lymphoid tissues: a subset of plasma cells are prominent producers of CD95L. **American Journal Pathology**, 154(1):193-201, 1999.

STRÄTER J.; WALCZAK H.; HASEL C.; MELZNER I.; LEITHÄUSER F.; MÖLLER P. CD95 ligand (CD95L) immunohistochemistry: a critical study on 12 antibodies. **Cell Death Differentiation**, 8(3):273-8, 2001.

SUGIYAMA H.; GYULAI R.; TOICHI E.; GARACZI E.; SHIMADA S.; STEVENS S.R.; MCCORMICK T.S.; COOPER K.D. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. **The Journal of Immunology**, 174:164-73, 2005.

TAATJES D.J.; SOBEL B.E.; BUDD R.C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochemistry and Cell Biology**, 129(1):33-43, 2008.

TAKAHASHI H.; MANABE A.; ISHIDA-YAMAMOTO A.; HASHIMOTO Y.; IIZUKA H. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis. **Journal of Dermatological Science**, 28(3):187-97, 2002

TANAKA M.; ITAI T.; ADACHI M.; NAGATA S. Downregulation of Fas ligand by shedding. **Nature Medicine**, 4:31-36, 1998.

TANG Q.; BLUESTONE J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nature Immunology**, 9(3):239-44, 2008.

VAN PARIJS L.; BIUCKIANS A.; ABBAS A.K. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, 160(5):2065-71, 1998.

VERHAGEN J.; AKDIS M.; TRAILD-HOFFMANN C.; SCHMID-GRENDELMEIER P.; HIJNEN D.; KNOL E.F.; BEHRENDT H.; BLASER K.; AKDIS C.A. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 117: 176-83, 2006.

VICTOIR K.; DE DONCKER S.; CABRERA L.; ALVAREZ E.; AREVALO J.; LLANOS-CUENTAS A.; LE RAY D.; DUJARDIN J.C. Direct identification of Leishmania species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 97:80-7, 2003.

XAVIER M.B.; SILVEIRA F.T.; DEMACHKI S.; FERREIRA M.M.; DO NASCIMENTO J.L. American tegumentary leishmaniasis: a quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between L. (L.) amazonensis and Viannia subgenus. **Acta Tropica**, 95(1):67-73, 2005.

YOLCU E.S.; ASH S.; KAMINITZ A.; SAGIV Y.; ASKENASY N.; YARKONI S.; Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. **Immunology and Cell Biology**, 86(8):650-8, 2008.

Etapas da técnica de imuno-histoquímica:

a. Hidratação das lâminas – após cortes dos blocos de parafina, as secções foram desparafinizadas em 2 (dois) banhos de equivalente vegetal biodegradável do xilol (ECO-K – Clarus Technology) em estufa a 37°C durante 15 minutos e à temperatura ambiente também durante 15 minutos, para em seguida serem hidratadas em 4 (quatro) banhos de álcool (álcool absoluto, álcool a 95%, 90% e 80%) e submetidas diretamente ao pré-tratamento das lâminas

b. Bloqueio da Peroxidase Endógena – as secções foram submetidas a 3 banhos de 10 minutos cada um em solução de água oxigenada a 3% (equivalente à água oxigenada de 10 volumes), sendo as soluções trocadas a cada banho e obtidas à maneira da água oxigenada (peróxido de hidrogênio a 3% mais ou menos 51ml e água destilada 460ml);

c. Pré-tratamento das lâminas – as lâminas foram distribuídas em suportes plásticos e colocadas no vaporizador (Steamer), marca T-Fal e imersas em solução de tampão citrato pH 6 ou tampão EDTA pH 8 (de acordo com a exigência requerida pelo tipo de anticorpo primário utilizado) a 97°C, durante 30 minutos, todos pré-tratados com solução tampão citrato pH 6, exceto CD-4 em que foi utilizado o tampão EDTA pH 8, para, em seguida, retirado o vaporizador, porém dentro da solução utilizada, as secções serem esfriadas por um período de aproximadamente 15 minutos;

d. Preparo de tampão:

4.1. Tampão de Citrato 10mM pH 6 (ácido cítrico monohidratado – 2,1g e água destilada – 1.000ml).

4.2. Tampão de EDTA 10mM pH 8 – (Etioleno diaminotetraacetato de sódio (EDTA) – 1,86g, água destilada – 5.000ml e Na OH 2N – 2 a 2,5 ml ajustado pH com Na OH ou HCl 1N).

4.3. Tampão TRIS 0,05 M pH 7,6 (Solução TBS) (Trizma Base - Sigma Cod. T-1503 - 6.1g e água destilada – 1.000 ml);

e. Reagentes primários – as lâminas distribuídas sobre espumas de borracha, umedecidas com água, foram acondicionadas em cubas plásticas com tampas, foram lavadas com TBS, secadas com lenço de papel e, retirado o excesso de Tampão TBS, os Reagentes Primários, previamente diluídos, foram gotejados para em seguida as lâminas serem deixadas na geladeira por toda a noite.

f. Reagentes secundários (Kit Dako K – 0690 – LSAB+) – cada lâmina foi lavada com TBS e o excesso de tampão TBS foi cuidadosamente retirado com lenço de papel, para, em seguida, ser gotejado o reagente secundário (indicado no Kit LSAB+), que recobria toda a secção, sendo incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente;

g. Reagente Streptavidina Peroxidase (Kit Dako K-0690) – cada lâmina foi lavada com TBS cujo excesso foi retirado com lenço de papel para, em seguida, gotejado o reagente Streptavidina Peroxidase (indicado no Kit ISAB+), que recobria toda a secção ficar durante 30 minutos à temperatura ambiente.

h. Preparo de solução de DAB líquido (K-3466) – 3'3' Diaminobenzidina (DAB) – 1 gota de tampão que acompanha o kit DAB líquido homogeneizado – 1ml;

i. Solução DAB – cada lâmina foi lavada com TBS, cujo excesso foi retirado delas com lenço de papel, cuidadosamente e, depois de gotejada a solução DAB, o suficiente para cobrir toda a secção, foi ela incubada por 10 minutos.

j. Coloração (Hematoxilina) – as lâminas foram lavadas com água corrente, depois colocadas na cuba para coloração com Hematoxilina de Harris durante 20 segundos, em seguida lavados com água amoniacal e, novamente, com água corrente;

k. Montagem das lâminas – para montagem, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética (Entelan), sendo que em todas as etapas as lâminas jamais foram secadas;

Tabela A1 - Anticorpos e seus respectivos clones, diluições, códigos e fabricantes utilizados nas reações imuno-histoquímicas

<i>anticorpos</i>	<i>clones</i>	<i>diluição</i>	<i>código</i>	<i>fabricante</i>
CD-45RO	UCHL1	1:100	M-0742	Dako
CD-20CY	L26	1:200	M - 0755	Dako
CD-8	C8/144B	1:100	M-7103	Dako
CD4 Ab-8	4B12	1:80	MS-1528-R7	Thermo scientific
CD68	PG-MI	1:100	M-0876	Dako
CD1a	10	1:100	M-3571	Dako
CD15	C3D-1	1:100	M-0733	Dako
BCL2 oncoprotein	124	1:100	M-0887	Dako
Bak		1:500	A-3538	Dako
Bcl-x	A35-10	1:100	M-4512	Dako
FasL		1:400	RB-9029-RT	Thermo scientific
Caspase	Asp175	1:1.000	9661	Cell Signaling
Foxp3	PCH101	1:400		eBioscience



Figura A1- Demonstração do uso do Unbvision na identificação manual de células positivas e contagem automática (seta).

Tabela A2 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCL

biópsia	sexo	idade	de procedência	lesão-nº	lesão-tamanho	lesão-local	t	IDRM	IFI	esfregaço	cultura	inoculação	HIV	sp
1	M	53	x	1	0,5cm	mi	3a	+	+	x	-	x	-	b
2	M	26	GO	1	0,8cm	mi	3m	+	x	x	x	x	-	x
3	M	63	DF	1	4cm	tronco	x	+	x	x	-	x	-	x
4	F	22	DF	1	8cm	ms	5m	-	x	x	+	x	-	x
5	M	25	DF	1	5cm	mi	3m	+	x	-	-	x	-	x
6	F	9	GO	1	2cm	cabeça	4m	+	x	+	+	x	-	x
7	M	46	TO	1	6 cm	ms	3m	+	x	x	x	x	-	x
8	M	7	BA	3	>3cm	cabeça	3a	+	x	x	x	x	-	am
9	M	31	BA	1	3 cm	ms	5m	+	x	+	x	x	-	b
10	M	29	x	1	x	mi	x	+	x	x	x	x	-	x
11	M	38	BA	várias	>6cm	mi	4m	+	+	-	+	x	-	b
12	M	29	DF	1	8cm	x	7m	+	+	-	-	x	-	x
13	M	66	x	1	1,5cm	tronco	x	+	x	+	-	x	-	x
14	M	19	DF	1	10cm	mi	2a	+	x	-	-	x	-	b
15	M	18	x	3	>2cm	mi e ms	4m	+	x	-	x	x	-	b
16	M	3	BA	1	6cm	ms	1a	+	-	x	-	x	-	x
17	M	43	GO	2	4cm	ms	7m	+	+	x	x	x	-	b
18	M	55	DF	1	3cm	mi	2a	+	-	-	+	x	-	b
19	M	50	TO	2	>3cm	ms	4m	+	x	-	x	-	-	x
20	M	61	x	1	x	x	2m	+	+	+	+	+	-	x
21	M	38	x	x	7cm	x	3m	+	+	+	+	+	-	x
22	M	40	TO	3	>	cabeça	5m	+	-	x	+	+	-	x
23	M	51	DF	1	7cm	tronco	x	+	x	x	x	x	-	x
24	M	38	DF	2	x	mi	3m	+	-	+	+	x	-	b
25	F	43	GO	várias	>10cm	mi	25d	-	-	-	-	x	-	x
26	M	34	GO	2	>3cm	ms	20d	+	+	+	+	x	-	x
27	M	62	BA	x	x	x	5a	+	+	+	+	x	-	x
28	F	46	BA	1	10cm	mi	2a	x	+	+	+	x	-	x
29	M	60	DF	1	4 cm	ms	2m	-	+	x	x	x	-	x
30	F	8	DF	2	2cm	ms e tronco	x	x	+	+	+	x	-	b
31	M	10	MT	1	x	cabeça	5m	-	+	-	+	+	-	x
32	M	56	DF	2	3,5 e 4cm	ms	4m	+	+	+	+	x	-	x
33	M	28	DF	1	x	mi	2m	x	+	x	x	x	-	b
34	M	51	DF	1	x	tronco	2m	-	+	x	+	+	-	b
35	M	45	DF	4	>4cm	cabeça e tronco	2m	+	+	x	+	x	-	x
36	M	65	x	1	15x10cm	mi	6m	+	+	+	x	x	-	x
37	M	37	DF	2	5cm	mi	1m	+	+	+	+	-	-	b
38	F	71	DF	1	6 cm	mi	8m	+	+	-	-	x	-	x
39	M	54	GO	1	5x7cm	ms	x	-	+	-	-	x	-	x
40	F	25	x	x	4cm	x	4m	+	x	+	+	x	-	x
41	M	16	DF	1	1,5cm	mi	6m	+	-	x	x	+	-	x
42	F	19	DF	1	3cm	mi	x	-	+	x	x	x	-	x
43	M	38	BA	x	>6cm	mi	4m	+	+	-	+	x	-	x
44	M	36	DF	2	x	tronco e ms	4m	+	x	+	+	x	-	x
45	M	22	DF	1	2cm	ms	2m	x	+	+	+	x	-	b
46	M	28	DF	2	6,5 e 2,0cm	mi	6m	+	+	x	x	x	-	x
47	M	19	DF	x	0,7cm	mi	1m	+	+	+	x	+	-	am
48	M	34	DF	1	x	cabeça	3m	+	-	x	x	x	-	x
49	M	x	x	x	x	mi	x	+	x	x	x	x	-	x
50	F	59	BA	1	5cm	x	6a	+	-	-	x	x	-	x
51	F	37	GO	3	3cm	mi	2m	+	+	x	x	x	-	x
52	M	52	x	2	3 e 10cm	ms	x	x	+	x	x	x	-	am
53	M	41	DF	1	1,5cm	mi	2m	+	+	x	+	x	-	x
54	M	35	MG	1	5cm	ms	3a	+	+	x	+	x	-	x
55	M	41	DF	1	1,5cm	mi	2m	+	+	x	+	x	-	b
56	M	53	DF	x	x	x	4m	+	-	x	x	x	-	x
57	M	62	DF	x	x	mi	x	+	+	-	-	-	-	x
58	M	55	GO	1	1,5cm	cabeça	5m	+	+	+	-	x	-	x
59	M	39	DF	1	1,5cm	cabeça	x	+	+	-	-	-	-	x
60	F	57	x	x	3,5	x	20d	+	+	x	x	x	-	x
61	M	64	DF	1	2,5	ms	20d	+	+	x	x	x	-	x
62	M	42	GO	1	x	ms	x	+	x	-	x	x	-	x
63	M	x	x	x	x	cabeça	x	+	x	x	x	x	-	x
64	M	17	GO	2	> 3,5cm	cabeça e mi	3m	+	x	-	-	x	-	x
65	M	23	DF	2	>2,5cm	mi	3m	+	-	-	-	x	-	b
66	M	58	x	x	x	x	x	+	+	x	x	x	-	x
67	F	39	DF	1	2cm	mi	3m	+	-	-	-	x	-	x
68	M	39	GO	3	x	mi e ms	5m	+	x	x	x	x	-	b

Legenda:

F=feminino, M=masculino, DF=Distrito Federal, GO=Goiás, TO=Tocantins, BA=Bahia, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso
mi=membro inferior, ms=membro superior, t=tempo de evolução, a=ano, m=meses, d=dias,

IDRM=intradermorreação de Montenegro, IFI=imunofluorescência indireta, (-)= ausente, (+)=presente, x=não disponível

b=L.(V.) *braziliensis*, am=L.(L.) *amazonensis*

sp=espécie

Tabela A3 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LD

biópsia	sexo	idade	procedência	lesão-nº	lesão-tamanho	lesão-local	t	IDRM	IFI	esfregaco	cultura	inoculação	HIV+	sp
1	M	37	MG	várias	x	x	8m	+	-	x	x	x	-	x
2	M	34	x	várias	x	x	x	x	+	x	x	x	+	b
3	M	44	DF	8	>3cm	tronco e mi	1m	x	x	+	+	x	-	x

Legenda:

M=masculino, MG=Minas Gerais, DF=Distrito Federal

mi=membro inferior, t= tempo de evolução, m=meses

IDRM=intradermorreação de Montenegro, IFI=imunofluorescência indireta, (-)= ausente, (+)=presente, x= não disponível

b=L.(V.) *braziliensis*

sp=espécie

Tabela A4 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCM

biópsia	sexo	idade	procedência	lesão-local	tipo	t	IDRM	IFI	esfregaco	cultura	inoculação	HIV+	sp
1	M	65	DF	nasal	tardia	12a	+	x	x	x	x	-	x
2	F	46	DF	nasal, palato	x	4a	+	+	x	-	x	-	x
3	M	67	DF	nasal, palato, faringe	tardia	3a	+	+	x	x	x	-	x
4	F	26	MG	nasal	x	4a	+	+	x	+	x	-	x
5	M	67	GO	nasal	tardia	1a	+	+	x	-	x	-	x
6	M	26	DF	nasal	x	x	+	+	x	x	x	-	x
7	M	62	DF	nasal, faringe, laringe	x	3a	+	+	x	x	x	-	x
8	M	38	DF	nasal	x	3a	+	+	x	x	x	-	x
9	M	30	GO	nasal	x	3a	x	+	+	-	-	-	x
10	M	48	GO	x	x	x	+	-	x	x	x	-	x
11	M	73	MT	nasal, lábio, palato	x	x	+	+	-	-	x	-	x
12	M	46	TO	nasal	tardia	3m	+	x	x	x	x	-	x
13	M	45	DF	orofaringe, palato	concomitante	2a	+	+	+	-	x	+	a
14	M	59	BA	nasal	x	x	+	+	x	x	x	-	x
15	F	39	DF	nasal	x	2a	+	-	x	x	x	-	x
16	M	75	TO	nasal	x	1a	+	x	x	x	x	-	x

Legenda:

F=feminino, M=masculino, DF=Distrito Federal, GO=Goiás, TO=Tocantins, BA=Bahia, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso

t=tempo de evolução, a=ano, m=meses, d=dias

IDRM=intradermorreação de Montenegro, IFI=imunofluorescência indireta, (-)= ausente, (+)=presente, x= não disponível

am=L.(L.) *amazonensis*

sp=espécie

Tabela A5 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LCD

biópsia	sexo	idade	procedência	lesão-nº	lesão-tamanho	lesão-local	t	IDRM	IFI	esfregaco	cultura	inoculação	HIV+	sp
1	M	78	MA	várias	x	mi, ms e cabeça	8a	-	+	+	x	x	-	x
2	F	22	MA	várias	x	mi	x	-	+	+	x	x	-	x
3	M	32	MA	várias	x	mi	8m	-	+	+	x	x	-	x
4	F	22	MA	várias	x	mi, ms e cabeça	8a	-	+	+	x	x	-	x
5	M	41	MA	várias	x	mi, ms e cabeça	2a	-	+	+	x	x	-	x
6	F	18	MA	várias	x	mi e ms	11a	-	+	+	x	x	-	x
7	F	31	MA	várias	x	mi, ms e cabeça	2a	-	-	+	x	x	-	x

Legenda:

F=feminino, M=masculino, MA=Maranhão

mi=membro inferior, ms=membro superior, t=tempo de evolução, a=ano, m=meses, d=dias

IDRM=intradermorreação de Montenegro, IFI=imunofluorescência indireta, (-)= ausente, (+)=presente, x= não disponível

sp=espécie

Tabela A6 - Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LRC

biópsia	sexo	idade	procedência	lesão-nº	lesão-tamanho	lesão-local	t	IDRM	IFI	esfregaco	cultura	inoculação	HIV	sp
1	M	40	x	2	3cm	mi	3m	+	+	x	x	x	-	x

Legenda:

M=masculino

mi=membro inferior, t=tempo de evolução, a=ano, m=meses, d=dias

IDRM=intradermorreação de Montenegro, IFI=imunofluorescência indireta, (-)= ausente, (+)=presente, x= não disponível

sp=espécie

Tabela A7 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCL

	<u>biópsia</u>	<u>hiperplasia epidérmica</u>	<u>ulceração</u>	<u>exocitose</u>	<u>necrose</u>	<u>fibrose</u>	<u>macrófagos</u>	<u>granuloma</u>	<u>célula gigante</u>	<u>amastigota</u>
1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
5	+	-	+	-	-	-	-	+	+	
6	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
7	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
8	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
9	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
10	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	+	-	+	-	-	-	-	+	-	
13	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
14	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
15	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
16	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
17	+	+	+	-	-	+	-	-	+	
18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	
19	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
20	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
21	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	+	-	-	-	+	+	-	
23	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
24	+	-	+	+	-	-	+	-	-	
25	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
26	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
27	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
28	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
29	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
30	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
31	+	+	+	+	-	-	+	-	-	
32	+	-	+	-	-	+	-	-	+	
33	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
34	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
35	+	+	+	+	-	+	-	-	+	
36	-	+	+	+	-	+	-	-	+	
37	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
38	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
39	+	-	+	-	-	-	+	+	+	
40	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
41	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
42	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
43	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
44	+	+	+	-	-	+	-	-	+	
45	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
46	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
47	+	-	+	+	-	-	+	+	-	
48	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
49	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
50	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
51	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
52	+	+	+	+	-	-	+	-	+	
53	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
54	+	+	+	-	-	-	+	-	-	
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
56	+	-	+	-	-	-	+	+	+	
57	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
58	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
59	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
60	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
61	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
62	+	-	-	-	-	-	+	+	-	
63	-	-	+	-	-	-	+	+	-	
65	+	-	+	-	-	-	+	+	-	
69	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
66	+	-	+	-	-	-	+	-	-	
67	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
68	+	-	+	-	-	-	+	+	-	

Legenda:

(-)= ausente, (+)=presente

Tabela A8 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCD

biópsia	hiperplasia epidérmica	ulceração	exocitose	necrose	fibrose	macrófagos	granuloma	célula gigante	amastigota
1	+	-	+	+	-	-	+	+	-
2	-	-	+	-	-	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	-	-	-	+

Legenda:

(-)= ausente, (+)=presente

Tabela A9 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCM

biópsia	hiperplasia epidérmica	ulceração	exocitose	necrose	fibrose	macrófagos	granuloma	célula gigante	amastigota
1	-	+	X	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	+	+	-
3	+	+	+	-	-	-	-	-	+
4	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-	+	+	+
7	+	+	+	+	-	-	+	-	-
8	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	+	-	+	+	-	-	+	-	-
10	+	+	+	-	+	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	+	+	-
12	+	+	+	+	-	-	+	+	+
13	+	+	+	+	-	-	+	+	+
14	-	-	+	-	÷	-	-	-	-
15	+	+	+	+	-	-	+	+	-
16	+	+	+	+	-	-	+	+	-

Legenda:

(-)= ausente, (+)=presente

Tabela A10 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LCD

biópsia	hiperplasia epidérmica	ulceração	exocitose	necrose	fibrose	macrófagos	granuloma	célula gigante	amastigota
1	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2	X	X	X	-	+	+	-	-	+
3	-	-	-	-	-	+	-	-	+
4	-	-	-	-	-	+	-	-	+
5	+	+	+	-	-	+	-	-	+
6	-	-	-	-	+	+	-	-	+
7	-	-	-	-	÷	+	-	-	+

Legenda:

(-)= ausente, (+)=presente

Tabela A11 - Alterações histopatológicas nas lesões de pacientes com LRC

biópsia	hiperplasia epidérmica	ulceração	exocitose	necrose	fibrose	macrófagos	granuloma	célula gigante	amastigota
1	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabela A12 - Alterações histopatológicas nas lesões do controle

biópsia	hiperplasia epidérmica	ulceração	exocitose	necrose	fibrose	macrófagos	granuloma	célula gigante	amastigota
1	-	-	-	-	÷	-	-	+	-
2	+	-	-	-	+	-	-	+	-
3	-	-	-	-	+	-	-	+	-
4	-	-	-	-	+	-	-	+	-
5	+	+	-	-	+	-	-	+	-
6	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Legenda:

(-)= ausente, (+)=presente

Tabela A13 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LCL

biópsia	CD1a	CD8	CD4	CD45RO	CD20	CD15	CD68	Bcl2	Faz I	caspase	FoxP3
1	32	1584	x	x	552	x	648	520	x	4	x
2	80	1752	792	2072	96	240	x	768	64	10	20
3	80	1080	1536	2016	240	80	264	400	880	25	30
4	x	x	688	x	384	192	464	632	1216	42	16
5	x	1464	x	x	540	x	480	x	380	4	30
6	x	552	x	x	960	64	544	672	144	x	x
7	x	1296	x	1320	352	160	x	440	344	2	0
8	176	1248	x	1328	372	x	x	360	40	0	0
9	x	1056	x	x	696	x	168	x	80	0	0
10	176	1896	744	1056	228	480	x	240	144	2	0
11	x	516	x	x	60	x	132	300	x	x	x
12	160	708	576	1308	156	x	x	x	48	0	0
13	x	1272	600	1644	612	96	x	640	328	0	0
14	128	1608	x	x	72	60	x	288	64	0	0
15	112	1224	x	x	312	x	372	x	x	5	0
16	64	832	864	2400	108	x	624	960	x	0	0
17	64	576	x	x	120	x	156	280	x	0	0
18	72	1200	512	1548	840	x	408	800	402	1	22
19	240	800	x	1440	120	x	x	x	96	0	0
20	x	1200	x	1928	252	x	324	296	144	11	0
21	16	1152	x	x	240	x	864	552	176	0	0
22	96	1608	x	x	960	x	552	808	112	0	0
23	x	x	x	x	336	x	168	640	224	1	2
24	216	1200	x	x	156	x	160	864	x	x	x
25	168	1320	744	1680	24	x	x	300	x	x	x
26	x	768	x	x	612	x	x	592	36	0	0
27	160	1056	x	x	288	x	x	216	x	x	x
28	x	612	x	x	360	x	x	1092	x	3	0
29	168	984	x	x	732	x	x	x	200	2	1
30	0	1104	x	x	72	60	240	288	352	7	20
31	x	864	x	x	912	180	744	720	320	1	0
32	112	1872	x	x	276	120	528	560	372	0	2
33	x	1896	x	x	864	48	840	x	488	39	0
34	x	1056	x	x	240	60	x	360	x	x	x
35	x	1104	x	x	192	156	648	x	640	22	0
36	x	96	x	x	72	x	576	528	576	15	0
37	x	792	x	x	180	x	x	x	192	14	0
38	x	x	x	x	x	x	x	248	x	x	x
39	x	1200	x	x	204	112	760	384	x	3	x
40	152	1176	x	x	780	264	816	848	960	0	0
41	152	864	x	x	108	12	96	x	x	x	x
42	72	1008	x	x	144	264	x	672	432	3	2
43	x	744	x	x	x	36	168	648	112	0	0
44	64	720	600	1440	120	72	x	440	x	0	0
45	x	1320	x	x	768	144	648	1298	x	44	40
46	x	2568	x	x	336	0	768	x	x	x	x
47	176	936	x	x	252	108	336	336	x	0	0
48	x	456	x	x	x	x	432	x	x	x	x
49	192	1008	x	x	504	120	x	468	1212	x	0
50	x	720	x	x	648	180	264	936	x	x	x
51	x	1176	1152	1680	120	x	x	x	120	x	1
52	x	1152	x	1800	408	x	384	744	200	3	0
53	x	1152	x	x	x	x	x	344	228	0	0
54	x	768	1152	1714	816	108	x	x	x	0	0
55	x	x	1008	1464	264	x	x	144	96	0	0
56	x	588	x	x	72	x	168	384	80	0	0
57	120	1080	x	1344	920	x	336	920	x	x	x
58	x	432	x	x	144	x	216	477	352	x	x
59	180	1320	x	x	504	120	504	x	408	0	0
60	128	1608	x	x	168	216	984	672	456	24	44
61	x	1368	960	1892	180	192	x	1320	272	80	190
62	120	1200	x	1584	864	x	x	808	360	2	3
63	x	972	x	x	x	x	408	720	1032	1	0
64	x	1320	x	x	192	x	1056	1080	180	0	0
65	x	1368	984	1866	698	x	x	432	640	0	0
66	x	744	x	x	108	0	x	772	56	0	0
67	120	216	x	x	432	x	x	864	240	5	7
68	112	1296	x	x	168	x	792	504	348	7	66

Tabela A14 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LD

biópsia	CD1a	CD8	CD4	CD45RO	CD20	CD15	CD68	Bcl2	FasL	caspase	FoxP3
1	x	616	x	x	384	800	528	528	x	4	64
2	144	840	460	1180	252	156	372	504	144	4	5
3	x	1116	840	1760	384	108	768	224	120	0	0

Tabela A15 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LCM

biópsia	CD1a	CD8	CD4	CD45RO	CD20	CD15	CD68	Bcl2	FasL	caspase	FoxP3
1	x	616	x	x	384	800	528	528	x	1	8
2	80	816	496	x	408	184	1056	512	48	2	11
3	12	1136	1416	x	504	x	1272	560	672	10	0
4	8	840	1224	2040	744	144	408	960	360	0	0
5	8	904	x	2352	132	688	x	280	x	x	x
6	10	920	x	x	560	200	1008	536	112	0	0
7	x	1320	1370	2064	780	x	768	912	96	12	5
8	22	168	x	736	132	552	216	144	x	x	x
9	x	656	x	1936	216	288	168	x	x	0	0
10	x	360	x	1416	156	384	312	320	48	0	0
11	4	1368	x	x	128	48	1008	432	136	0	21
12	x	744	x	x	960	1848	416	824	88	0	0
13	6	1200	732	x	x	264	1080	792	136	2	22
14	0	340	432	656	128	96	456	337	352	0	0
15	x	1608	1096	x	560	344	x	1360	56	11	16
16	46	80	x	x	336	256	888	984	576	23	70

Tabela A16 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 nas lesões de LCD

biópsia	CD1a	CD8	CD4	CD45RO	CD20	CD15	CD68	Bcl2	FasL	caspase	FoxP3
1	96	560	540	1032	252	96	840	360	684	0	30
2	x	744	396	x	120	72	616	352	x	3	x
3	64	144	x	x	8	84	560	112	96	0	12
4	56	240	x	x	16	40	672	72	40	0	10
5	32	576	x	840	72	204	464	x	x	x	8
6	8	96	x	320	x	60	416	x	x	0	x
7	24	1044	x	1120	108	72	448	352	60	0	3

Tabela A17 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 na lesão de LRC

biópsia	CD1a	CD8	CD4	CD45RO	CD20	CD15	CD68	Bcl2	FasL	caspase	FoxP3
1	64	1092	864	1680	36	48	300	324	120	14	2

Tabela A18 - N^o de células/mm² positivas para os marcadores celulares, apoptóticos e para Foxp3 no controle

biópsia	CD1a	CD8	CD4	CD45RO	CD20	CD15	CD68	Bcl2	FasL	caspase	FoxP3
1	40	56	98	160	64	0	x	120	64	0	0
2	72	64	80	192	x	0	x	136	24	0	0
3	144	200	160	280	40	120	48	144	40	2	0
4	120	88	178	192	32	0	x	112	104	0	0
5	48	160	64	248	32	144	104	48	64	0	0
6	176	160	120	272	56	56	112	120	40	0	0



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 049/2006

Título: Patologia da Leishmaniose Tegumentar

Pesquisador responsável: Fabiana Pirani Carneiro

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 11/08/2006

Proposição do(a) relator(a)

(x) Aprovação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 06/11/2006

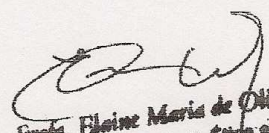
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 31/01/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 31/01/2007, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 01 de fevereiro de 2007.


Profa. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB

Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis.

Foxp3 expression in leishmaniasis.

Fabiana Pirani Carneiro, MD¹

Albino Verçosa de Magalhães, MD¹

Maria de Jesus Abreu Almeida Couto, MD²

Anamélia Lorenzetti Bocca, MD³

Maria Imaculada Muniz Junqueira, MD³

Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, MD⁴

¹Department of Pathology, University of Brasília, Brasília, Brazil.

²University of Maranhão, Brazil

³Department of Immunology, University of Brasília, Brasília, Brazil.

⁴Department of Dermatology, University of Brasília, Brasília, Brazil

Keywords: regulatory T cell, Foxp3, leishmaniasis

Fabiana Pirani Carneiro, M.D.

Centro de Anatomia Patológica

Hospital Universitário de Brasília, UNB

Via L2 Norte, SGAN 604/605, Módulo C

Brasília DF, Brasil

CEP: 70840-050

Tel: 55 61-3448 5499

e-mail: fabianapirani@hotmail.com

Disclosures: none

Abstract

As the diversity in clinical presentation of ATL (american tegumentary leishmaniasis) is determined mainly by the immune response of host, our aim was to evaluate the *in situ* expression of Foxp3 (marker of regulatory T cell) in lesions of the different clinical forms of ATL. Foxp3⁺ cells were observed in 39.5% (32/81) of the samples and the number of positive cells was low in all the clinical forms. Even presenting a significantly lower number of CD4⁺ T cells, DCL (diffuse cutaneous leishmaniasis) showed a higher expression of Foxp3 when compared with LCL (localized cutaneous leishmaniasis) and MCL (mucocutaneous leishmaniasis). In LCL and MCL, the number of Foxp3⁺ cells correlated positively with the number of apoptotic cells (active caspase 3⁺ cells). A positive correlation was also observed between the expression of active caspase 3 and FasL in these clinical forms. Our data suggest that increased number of Treg cells may be associated to the hyporesponsiveness observed in DCL and also indicate that the apoptosis may be a possible mechanism of action of Foxp3⁺ regulatory T cell in LCL and MCL. However, further studies are required to better understand the mechanism of action of regulatory T cell.

Introduction

American tegumentary leishmaniasis (ATL), widely spread in most countries of Latin America, is characterized by a spectrum of clinical manifestations varying from self-healing localized cutaneous leishmaniasis (LCL) to more severe forms such as disseminated leishmaniasis (DL), leishmaniasis recidiva cutis (LRC), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). These different clinical forms depend mainly on the species of the infecting *Leishmania* and host cell-mediated immune response^{1,2}. In Brazil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiologic agent of localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) while *Leishmania (Leishmania) amazonensis* predominates in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL)³. *Leishmania sp* is an obligate intracellular parasite, being the immune response of host mediated mainly by two functional subpopulations of CD4⁺ T cells, distinguished by their pattern of cytokine production: T helper cell type 1 (Th1) immune response produces proinflammatory cytokines and T helper cell type 2 (Th2) immune response secretes downregulating cytokines. Regulated production of these cytokines enables parasite killing without producing skin tissue damage. MCL is characterized by hyperresponsiveness and tissue destruction. Different from MCL, DCL has been associated with a Th2 immune response and immune hyporesponsiveness^{4,5}.

The regulatory T (Treg) cells play an important role in regulation of immune responses. Several subsets of regulatory T cells have been identified such as Tr1, TH3 and CD4⁺CD25⁺⁶. The latter, besides the high expression of CD25, also express CTLA-4, GITR and Foxp3. To date, Foxp3 is considered as the best marker for CD4⁺CD25⁺ Treg cell⁷. The mechanism of action of Treg cell is still unclear, but suppressive mechanisms can be divided into three categories: cell-cell contact, local secretion of inhibitory cytokines and local competition for growth factors^{8,9}. Recently, it has been shown that Treg cell can control a

large number of infections by modulating the intensity of the effector immune response¹⁰. Treg cells are capable of recognizing antigens in infectious diseases and downregulate both Th1 and Th2 immune response^{11,12}.

Most studies about the role of Treg cells in leishmaniasis have been performed with cells derived from peripheral blood and in animal models, little is known about Treg cells in site of human infection^{13,14}. In lesions caused by *L major*, *L (V.) brasiliensis* and *L (L.) amazonensis*, there is evidence that Foxp3⁺ cells accumulate and suppress the proliferation and cytokine production of effectors T cells^{15,16,17}. However, the relationship between Treg cells and different clinical presentations of ATL is not clear. Considering the importance of Treg cells in control of the effector immune response and in order to better understand the role of these cells in determine the different clinical forms of cutaneous leishmaniasis, our aim was to verify the presence Foxp3⁺ cells in lesions of the different clinical forms of leishmaniasis.

Material and methods

Biopsy samples. We analyzed 95 biopsy samples from 95 patients with ATL (76 men and 19 women; age range, 3-78 years). The inclusion criteria were based on clinical and laboratory findings: immunologic tests (positive Montenegro skin test and positive anti-*Leishmania* antibodies in serum) and parasitological tests (*Leishmania* species on histopathological examination, culture or smears). The punch biopsy samples (about 4mm) were obtained from the border of active lesions, prior to institution of the therapy, and they were divided according to the different clinical presentations of ATL: LCL (n=68), MCL (n=16), DCL (n=7), DL (n=3), LRC (n=1). The mean \pm s.d. of age (in years), according to the clinical form, was as follows: 37.85 (\pm 16.87) in LCL, 50.75 (\pm 16.43) in MCL, 34.85 (\pm 20.56) in DCL and 38.33 (\pm 5.13) in DL. In LRC, the patient was 40 years old. The mean \pm

s.d. of lesion duration (in months), according to clinical form, was as follows: LCL (9.43 ± 14.81), MCL (40.25 ± 35.64), DCL (63.33 ± 51) and DL (4.5 ± 4.95). In LRC, lesion duration was of 3 months. Two of the 95 biopsy samples were from HIV-positive patients (classified as having AIDS) presenting DL and concomitant MCL (MCL with mucous and cutaneous involvement simultaneously). These biopsy samples were analyzed separately from samples of HIV-negative patients.

The patients with LCL and MCL were from areas where *L. (V.) braziliensis* is prevalent while patients with DCL acquired the disease in endemic areas of *L. (L.) amazonensis*¹⁸. This work was approved by the Ethical Committee for Human Research from University of Brasilia.

As normal skin samples present minimal inflammatory infiltrate, 6 samples of skin biopsies with foreign body granulomas (suture wire) were used as controls.

Immunohistochemistry. We used the streptavidin-biotin-peroxidase method. Silanized slides containing formaline-fixed and paraffin-embedded sections of biopsies samples were submitted to immunohistochemistry for detection of markers of cell subtypes ($CD45RO^+$ T lymphocytes, $CD4^+$ T lymphocytes, $CD8^+$ T lymphocytes, $CD20^+$ B lymphocytes, $CD68^+$ macrophages, $CD15^+$ neutrophils, $CD1a^+$ Langerhans cells), markers of apoptosis (active caspase 3 and FasL) and $Foxp3^+$ cells. The primary antibodies used in immunohistochemical reactions were: CD45RO (1:100; DAKO Corporation, CA, USA), CD4 (1:80; Thermo scientific, CA, USA), CD8 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), CD20 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), CD68 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), CD15 (1:100; DAKO Corporation, CA, USA), CD1a (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), active caspase 3 (1:80; Cell Signaling, MA, USA), FasL (1:80; Thermo scientific, CA, USA) and $Foxp3$ (1:400; eBioscience, CA, USA). Immunohistochemistry was carried out as follows: antigen

recovery, blockade of endogenous tissue peroxidase, incubation with a primary antibody, incubation with a secondary antibody and incubation with the streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB+ DAKO, A/S Denmark K-690). All reactions were developed using a diaminobenzidine chromogen solution (Dab substrate chromogen system-K3466) and counterstaining was performed with Harris hematoxylin. Tonsil sections were used as controls. Cells marked in brown were considered positive.

Quantitative analysis of cell population

The number of CD45RO⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD68⁺ macrophages, CD15⁺ neutrophils, FasL⁺ cells was determined counting cells in captured images using an optical microscope coupled to a color video camera. For each marker, two randomly chosen fields at a 400x magnification (40x lens and 10x ocular-Zeiss optical microscope) were analysed. The area of each captured image was of 0,0432mm². The counting of the positive cells was done manually on the computer monitor using an image analysis software (Unbvision¹⁹) Fig 1. CD1a⁺ Langerhans, active caspase 3⁺ and Foxp3⁺ cells were counted in 16 randomly chosen fields at a 400x magnification (40x lens and 10x ocular-Olympus optical microscope) using a grid of 1mm² adapted to the ocular. The number of cells was expressed in cells/mm². CD1a⁺ cells were counted only in epithelium.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean \pm standard deviation. Comparisons between groups were made with non-parametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) and

parametric (ANOVA) tests. Statistical significance was assigned to $p < 0.05$. Correlations between variables were analyzed using Spearman rank coefficient.

Results

Immunohistochemistry

Cell markers

The number (mean \pm s.d.) of positive cells/mm² in each clinical form is shown in Table 1. T CD45RO⁺ lymphocytes were the predominant cell in all clinical forms. The number of CD45RO⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T and CD20⁺ B lymphocytes cells was significantly lower in DCL than in LCL ($p < 0.05$). Between MCL and LCL, significant differences were observed in CD1a and CD15 expression. CD1a⁺ cells were more frequent in LCL and CD15⁺ cells in MCL. DL and LRC were not compared with the other clinical forms because of the limited number of cases. In foreign-body granuloma, the number of CD45RO⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T and CD20⁺ B lymphocytes was significantly lower when compared with LCL. In HIV-positive patients, the number of CD4⁺ cells was 732 and 460 cells/mm² in samples of MCL and DL, respectively.

Foxp3

Foxp3⁺ cells were observed in 39.5% (32/81) of the samples. The number of lesions with positive cells, according to the clinical form, was as follows: LCL (19/59), MCL (6/14) DCL (5/5), DL (1/2) and LRC (1/1). As shown in Table 1, the number (mean \pm s.d.) of positive cells was low in all the clinical forms (Fig 2a). In DCL, the number (mean \pm s.d.) of Foxp3⁺ cells was significantly higher when compared with LCL ($p = 0.03$) (Fig 3). DL showed

the higher number of Foxp3⁺ cells, but was not compared with the other clinical forms because of the limited number of cases. A variation in number of positive cell was obtained between the samples in the same clinical form: LCL (0-190 cells/mm²), MCL (0-70 cells/mm²), DCL (3-30 cells/mm²), DL (0-64 cells/mm²). There was no correlation between the number of Foxp3⁺ cells and both duration of the lesions and age of patients. No significant difference was observed in expression of Foxp3 between samples of patients with positive and negative parasitologic test (*Leishmania* species on histopathological examination, culture or smears). No Foxp3⁺ cell was observed in foreign-body granuloma. In HIV-positive patients, the number of Foxp3⁺ cells was of 22 cells/mm² and 12 cells/mm² in MCL and DL, respectively.

Apoptotic markers

A positive correlation was observed between the expression of Foxp3 and active caspase 3 in LCL and MCL ($r=0.61$; $p<0.0001$) (Fig 4). Apoptotic cells (active caspase 3⁺) were observed in 49.33% (37/75) of the samples. The number of lesions with positive cells, according to the clinical form, was as follows: LCL (28/53), MCL (6/13) DCL (1/6), DL (1/2) and LRC (1/1). As shown in Table 1, the number (mean \pm s.d.) of positive cells was low in all the clinical forms (Fig 2b). The higher expression of active caspase 3 (7.20 ± 14.82 cells/mm²) was observed in LCL. FasL was expressed in all samples of all clinical forms mainly in mononuclear cells of inflammatory infiltrate. The higher number (mean \pm s.d.) of positive cells was observed in LCL (337.14 ± 300.40 cells/mm²). A positive correlation was observed between the expression of active caspase 3 and FasL in LCL and LCM ($r=0.43$; $p=0.001$; $n=54$) (Fig 5). In foreign-body granuloma, apoptotic cells were observed in only one of the six samples and the expression of FasL was significantly lower than in LCL. In HIV-

positive patients, the number of positive cells for active caspase-3 and FasL was, respectively, 2 and 136 cells/mm² in MCL and 4 and 144 cells/mm² in DL.

Discussion

The diversity in clinical presentation of ATL is determined mainly by the immune response of host. So, our aim was to evaluate the *in situ* expression of Foxp3 in lesions of the different clinical forms of ATL. To better characterize this expression, we also performed an identification of cell types found in inflammatory infiltrate. DCL was the clinical form more different from the others with regard to the expression of cell markers. In present and in previous studies, a significant lower number of CD45RO⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T and CD20⁺ B lymphocytes cells was observed in DCL when compared with LCL^{20, 2}.

We demonstrated Foxp3⁺ cells in lesions of all clinical forms but the number of samples with positive cells and the mean of positive cells were low in all them. Similar results were obtained in recent researches that analyzed the Foxp3 expression in peripheral blood and in skin lesions infected with *L braziliensis* and *L amazonensis*^{15,16}. In contrast to clinical forms, in foreign-body granuloma, no Foxp3⁺ cell was observed. The absence of Foxp3⁺ cells may be explained by the decreased number of T cells that constitute the inflammatory infiltrate in foreign-body granuloma. In normal skin, the presence of Treg cells was demonstrated in some studies but not in others, probably also because of the low number of infiltrating T cell in the tissue^{21,22}. In blood of healthy subjects, Treg cells represent only 5-10% of peripheral CD4⁺ T cell.

One aspect that must be emphasized is that Foxp3 expression was not found in all lesions and the number of positive cells was variable in lesions from the same clinical form. As in our study, this variation in number of Foxp3⁺ cells was observed in recent study involving lesions infected with *L braziliensis*¹⁶. In other skin inflammatory conditions and in

normal human skin also a large variation in the frequency of Foxp3⁺ T cells was obtained²³. To try explaining these differences, we correlated the expression of Foxp3 with age of patient and duration of the lesion, but no association was observed.

Even presenting a significantly lower number of CD4⁺ T cell, DCL showed a higher number (mean \pm s.d.) of Foxp3⁺ cell when compared with LCL and MCL. In other infectious diseases, an increased number of Foxp3⁺ has been associated with suppression of immune response^{10,12}. Considering this, our results may suggest that the higher number of Treg cells in DCL may also be associated to the hyporesponsiveness observed in this clinical form. However, is not clear if this increased Foxp3 expression is cause or consequence of the excessive Th2 response.

In samples of our HIV-positive patients, the number of CD4⁺ and the number of apoptotic cells were lower than the mean observed in samples of MCL and DL of HIV-negative patients but Foxp3⁺ cells were present in these samples. In MCL, the number of Foxp3⁺ was until higher than in HIV-negative patients. The results about the role of Treg cells in HIV-positive patients are contradictory, but there is evidence that these cells can suppress effector cell response against the virus²⁴. Clinical manifestations of ATL in HIV-infected patients are diverse and depend on immunological status. Multiple cutaneous lesions and mucosal involvement are very common in these patients^{25,26,27}. Our patients, in agreement with previous results, presented clinical forms more severe (MCL and DL).

Previous publications demonstrated that, in lesions caused by *L.(V.) brasiliensis* and *L.(L.) amazonensis*, Treg cells secrete IL-10 and suppress proliferation and cytokine production of effector T cells. Other mechanism of action of regulatory T cells that has been described is apoptosis of effector T cell^{9,28}. In present study, a positive correlation between active caspase 3 and Foxp3 expression was observed in LCL and MCL, suggesting that the apoptosis may be a possible mechanism of action of Foxp3⁺ regulatory T cell in these clinical

forms. Besides this, the higher expression of FasL and the positive correlation between the expression of caspase and FasL obtained in LCL and MCL suggest that extrinsic pathway may be at least one of the involved mechanisms in apoptosis of ATL.

In conclusion, the differences observed in Foxp3 expression between different clinical forms and even inside the same one suggest that Treg cells may to influence the evolution of the lesions. Further studies are, however, required to understand the mechanism of action of these cells since knowledge about Treg cell function may be applied in development of novel therapies.

REFERENCES

- 1Convit J, Ulrich M, Fernández CT, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; **87**: 444-8.
- 2Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; **99**: 239-51.
- 3Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**: 230-50.
- 4Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 1998; **28**:121-34.
- 5Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1985; **135**: 4144-8.
- 6Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; **171**: 6323-7.
- 7Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 **299**:1057-61.
- 8Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; **9**: 239-44.

- 9Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; **7**: 370-5.
- 10Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; **6**: 353-60.
- 11Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; **420**: 502-7.
- 12Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:875-88.
- 13Xu D, Liu H, Komai-Koma M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J Immunol* 2003; **170**:394-9.
- 14Suffia JJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Méd* 2006; **203**: 777-88.
- 15Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2005; **174**:7147-53.
- 16Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 2006; **193**:1313-22.
- 17Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; **213**: 159-79.
- 18de Paula CD, Sampaio JH, Cardoso DR, Sampaio RN. [A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis] *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; **36**:365-71.
- 19Horita LG. UnBVision: uma solução para a análise e tratamento de imagens digitais. Ciências da Computação, Instituto de Ciências Exatas da Universidade de Brasília, 2001.
- 20Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol* 2002; **11**:34-41.
- 21Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; **174**:164-73.

Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**: 176-83.

23de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wal AC, Teunissen MB. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 2007; **55**: 891-8.

24Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, Bacchetta R, Levings MK. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 2008; **223**:391-421.

25Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 2009; **160**:311-8.

26Mattos M, Caiza A, Fernandes O, et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; **10**: 218-25.

27Sampaio RN, Salaro CP, Resende P, de Paula CD. [American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases] *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; **35**:651-4.

28Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* 2008; **86**:650-8.

Table 1 – Number of positive cells/mm² for cell markers in control, LCL (localized cutaneous leishmaniasis) MCL(mucocutaneous leishmaniasis), DCL(diffuse cutaneous leishmaniasis), DL(disseminated leishmaniasis) and LRC(recidiva cutis leishmaniasis).

markers	control mean ± s.d.	DCL mean ± s.d.	LCL mean ± s.d.	MCL mean ± s.d.	DL mean ± s.d.	LRC number
CD1a	100 ± 55,13	46,66 ± 31,76	122,12 ± 57,52	21,11 ± 25,92	176 ± 0	64
CD8	121,33 ± 59,74	486,28 ± 346,67	1081,31 ± 426,86	871,73 ± 414,16	746 ± 523,25	1092
CD4	116,66 ± 44,98	263,33 ± 126,65	765,96 ± 305,56	849,25 ± 482,52	483,5 ± 504,17	864
CD45RO	224 ± 49,31	828 ± 358,27	1660,72 ± 344,13	1600 ± 678,08	1172 ± 831,55	1680
CD20	44,8 ± 14,53	96 ± 89,19	373,17 ± 279,43	408,53 ± 270,80	240 ± 203,65	36
CD15	53,33 ± 65,12	89,71 ± 53,40	131,46 ± 98,83	448,61 ± 477,60	108 ± 0	48
CD68	88 ± 34,87	573,71 ± 150,14	476 ± 258,98	654,15 ± 362,76	534 ± 330,93	300
FasL	56 ± 28,17	220 ± 310,2	337,14 ± 300,40	223,33 ± 215,86	108 ± 16,97	120
Caspase	0,33 ± 0,81	0,5 ± 1,22	7,20 ± 14,82	4,35 ± 7,25	2 ± 2,82	14
Foxp3	0	12,6 ± 10,28	9,67 ± 27,91	9,35 ± 18,77	32 ± 45,25	2

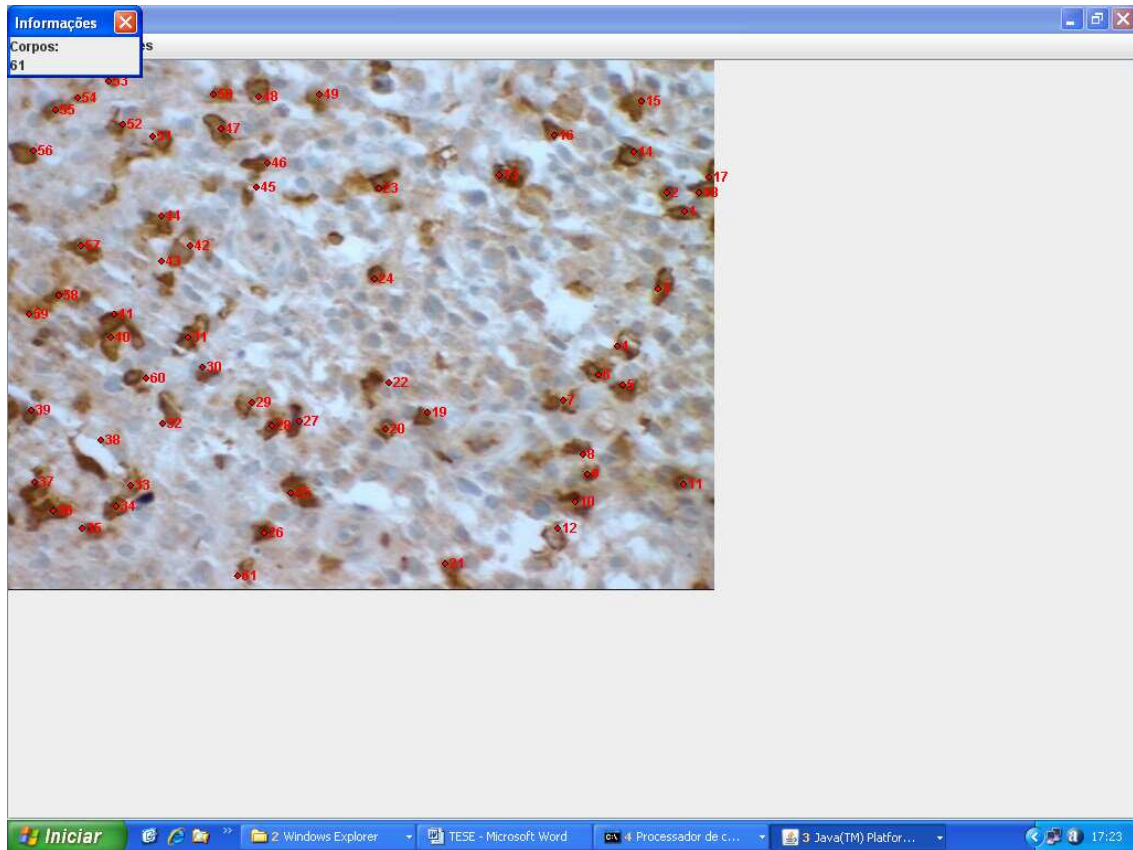


Fig 1 Demonstration of manual counting of the positive cells on the computer monitor using image analysis software (Unbvision)

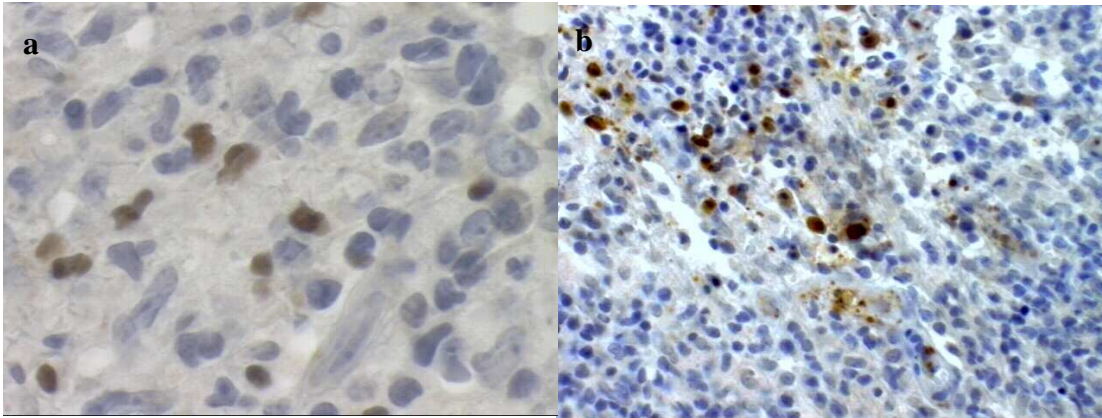


Fig2. Expression of Foxp3 (a) and active caspase 3 (b) by immunohistochemistry. Positive cells are indicated by brown staining. Original magnification, x1000 for figure (a) and x 400 for (b).

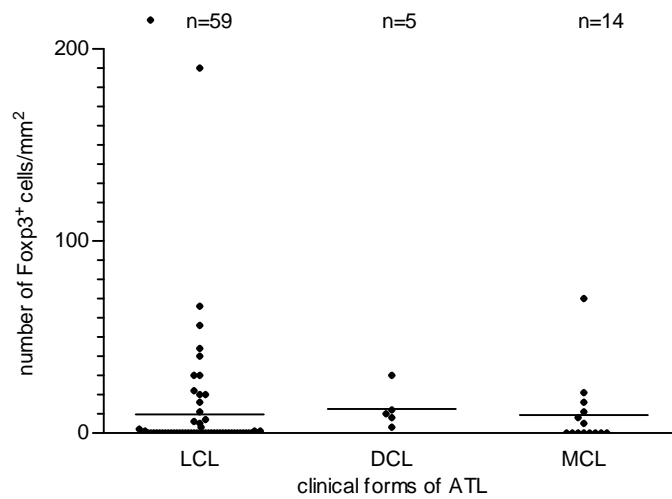


Fig 3 Number of Foxp3⁺ cells in LCL, DCL and MCL. In DCL, the mean \pm s.d of Foxp3⁺ cells (indicated by horizontal bar) was significantly higher when compared with LCL ($p < 0.05$).

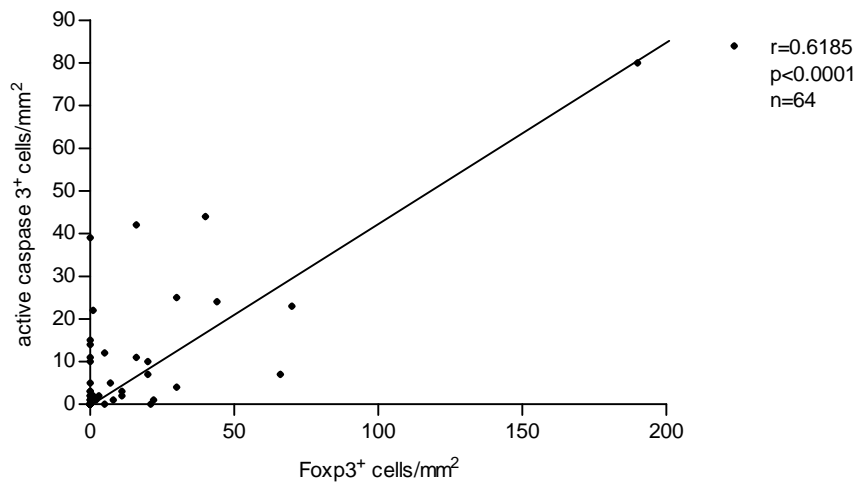


Fig 4 Correlation between the expression of active caspase 3 and Foxp3 in LCL and MCL. There was a significant positive correlation ($r=0.6185$, $p=0.0001$, $n=64$).

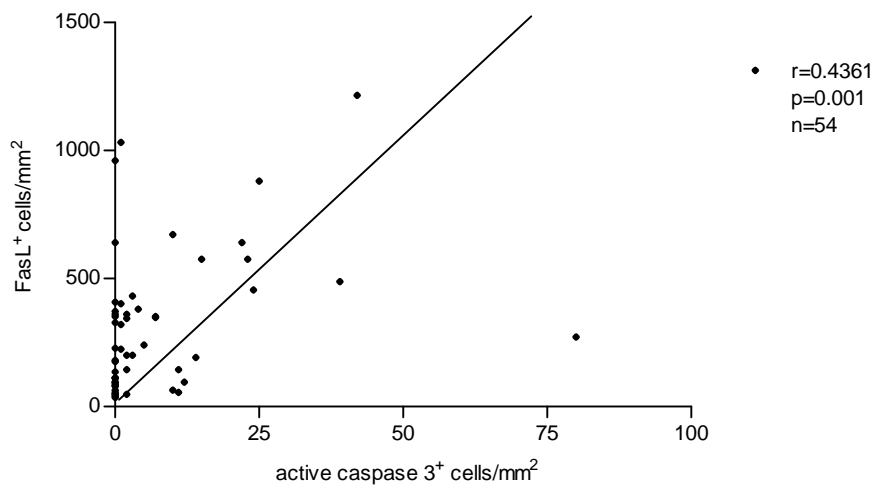


Fig 5 Correlation between the expression of FasL and active caspase 3 in LCL and MCL. There was a significant positive correlation ($r=0.4361$, $p=0.001$, $n=54$).

CARNEIRO AND OTHERS

APOPTOTIC MARKERS IN AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

IMPORTANCE OF THE EXPRESSION OF APOPTOTIC MARKERS IN DIFFERENT
CLINICAL FORMS OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

FABIANA P. CARNEIRO, ALBINO V. DE MAGALHÃES, MÁRIO A. P. MORAES,
ISABEL I. R. LEAL, VERÔNICA M. G. FURTADO, CARMEN D. R. DE PAULA, MARIA
DE JESUS A. A. COUTO, GILCILENE M. DOS SANTOS.

Department of Pathology and Dermatology, University of Brasília, Brasília, Brazil;

University of Maranhão, Brazil.

Abstract

Considering the importance of apoptosis in modulation of the immune response, we evaluated the immunohistochemical expression of apoptotic markers (active caspase 3, Bcl-2, Bak, Bcl-X and FasL) in lesions of the different clinical forms of american tegumentary leishmaniasis (ATL): localized cutaneous leishmaniasis (LCL), leishmaniasis recidiva cutis (LRC), disseminated leishmaniasis (DL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). Apoptotic (active caspase 3⁺) and FasL⁺ cells were more frequent in LCL and a significant positive correlation between the expression of active caspase 3 and FasL was observed in this clinical form. As LCL is the clinical presentation characterized by self-healing evolution, our data suggest that the Fas/FasL pathway may be important in clinical evolution of the lesions in ATL. The expression of Bcl-X in amastigote forms of *L.(V.) brasiliensis* and *L.(L.) amazonensis* suggests a possible existence of “counterparts” or “homologues” of the Bcl-X observed in mammalian cells, but this finding must be investigated by other methods.

INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL), widely spread in most countries of Latin America, is a parasitic protozoa disease caused by several species of the genus *Leishmania*. Depending on the species of the infecting *Leishmania* and host cell-mediated immune response, a spectrum of clinical manifestations may develop, varying from self-healing localized cutaneous leishmaniasis (LCL) to more severe forms such as leishmaniasis recidiva cutis (LRC), disseminated leishmaniasis (DL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL).^{1,2} In Brazil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiologic agent of localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) while *Leishmania (Leishmania) amazonensis* predominates in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL).³ *Leishmania sp* is an obligate intracellular parasite and the immune response of host is mediated mainly by CD4⁺ T cells.^{4,5}

Apoptosis is basically mediated by intrinsic and extrinsic pathways that result in activation of the caspase cascade.⁶ The intrinsic apoptotic pathway is regulated by the balance of pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) family. The extrinsic apoptotic pathway is triggered by signals emanating from cell surface death receptors that are activated by ligands such as FasL (CD95 ligand). Apoptosis mediated by Fas/FasL pathway is critically involved in the elimination of mature lymphocytes, limiting the immune response.⁷

Apoptosis plays an important role in the immunopathogenesis of several parasitic diseases.^{8,9,10} Not only the cells of immune system but also the parasites are subjects to programmed cell death (PCD).¹¹ In animal model, Fas/FasL system appears to be essential to resistance to infection caused by *L major*.^{12,13} It has been shown that infected macrophages upregulate the surface expression of Fas in response to IFN γ and they may thereby become

susceptible to apoptosis upon interaction with T cell expressing FasL. However, few data are available regarding the relevance of apoptosis in clinical course of lesions of ATL. The involved mechanisms and the importance of apoptosis in *Leishmania* species are also still unclear.¹⁴ Considering the importance of apoptosis in the modulation of the immune response, our aim was to determine the expression of apoptosis-related proteins in lesions of the different clinical forms of ATL and to correlate this expression with histopathological findings and cell population in lesions.

MATERIALS AND METHODS

Biopsy samples. We analyzed 95 biopsy samples from 95 patients with ATL (76 men and 19 women; age range, 3-78 years). The inclusion criteria were based on clinical and laboratory findings: immunologic tests (positive Montenegro skin test and positive anti-*Leishmania* antibodies in serum) and parasitological tests (*Leishmania* species on histopathological examination, culture or smears). The punch biopsy samples (about 4mm) were obtained from the border of active lesions, prior to institution of the therapy, and they were divided according to the different clinical presentations of ATL: LCL (n=68), MCL (n=16), DCL (n=7), DL (n=3), LRC (n=1). The mean \pm s.d. of age (in years), according to the clinical form, was as follows: 37.85 (\pm 16.87) in LCL, 50.75 (\pm 16.43) in MCL, 34.85 (\pm 20.56) in DCL and 38.33 (\pm 5.13) in DL. In LRC, the patient was 40 years old. The mean \pm s.d. of lesion duration (in months), according to clinical form, was as follows: LCL (9.27 \pm 14.71), MCL (40.25 \pm 35.64) DCL (63.33 \pm 51) and DL (4.5 \pm 4.95). In LRC, lesion duration was of 3 months. Two of the 95 biopsy samples were from HIV-positive patients (classified as having AIDS) presenting DL and concomitant MCL (MCL with mucous and cutaneous involvement simultaneously). These biopsy samples were analyzed separately from samples of HIV-negative patients.

The patients with LCL and MCL were from areas where *L. (V.) braziliensis* is prevalent while patients with DCL acquired the disease in endemic areas of *L. (L.) amazonensis*.¹⁵ The species of *Leishmania* had already been identified previously in biopsy sample of 21 patients by polymerase chain reaction. *L. (V.) braziliensis* was isolated in sixteen patients presenting LCL and in one presenting LD (HIV-positive patient). *L. (L.) amazonensis* was identified in 3 patients presenting LCL and in one presenting LCM (HIV-positive patient).

As normal skin samples present minimal inflammatory infiltrate, six samples of skin biopsies with foreign body granulomas (suture wire) were used as controls.

This work was approved by the Ethical Committee for Human Research from University of Brasilia.

Histopathology. The biopsy samples were formalin fixed, embedded in paraffin and tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE).

Qualitative analysis of histopathological findings. The presence of alterations in epithelium (hyperplasia and ulceration) and in dermis/lamina propria (necrosis, fibrosis, granuloma, multinucleated giant cell, vacuolated macrophages and amastigote forms of *Leishmania*) was analyzed.

Immunohistochemistry. We used the streptavidin-biotin-peroxidase method. Silanized slides containing formaline-fixed and paraffin-embedded sections of biopsy samples were submitted to immunohistochemistry for detection of markers of cell subtypes (CD45RO⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD68⁺ macrophages, CD15⁺ neutrophils, CD1a⁺ Langerhans cells) and markers of apoptosis (active caspase 3, Bcl-2, Bak, Bcl-X and FasL). The primary antibodies used in immunohistochemical reactions were: CD45RO (1:100; DAKO Corporation, CA, USA),

CD4 (1:80; Thermo scientific, CA, USA), CD8 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA) , CD20 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), CD68 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), CD15 (1:100; DAKO Corporation, CA, USA), CD1a (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), active caspase 3 (1:80; Cell Signaling, MA, USA), Bcl-2 (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), Bak (1:80; DAKO Corporation, CA, USA), Bcl-X (1:80; DAKO Corporation, CA, USA) and FasL (1:80; Thermo scientific, CA, USA). Immunohistochemistry was carried out as follows: antigen recovery, blockade of endogenous tissue peroxide, incubation with a primary antibody, incubation with a secondary antibody and incubation with the streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB+ DAKO, A/S Denmark K-690). All reactions were developed using a diaminobenzidine chromogen solution (Dab substrate chromogen system-K3466) and counterstaining was performed with Harris hematoxylin. Tonsil sections were used as controls. Cells marked in brown were considered positive.

Quantitative analysis of cell population. The number of CD45RO⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes, CD68⁺ macrophages, CD15⁺ neutrophils, FasL⁺ cells and Bcl-2⁺ cells was determined counting cells in captured images using an optical microscope coupled to a color video camera. For each marker, two randomly chosen fields at a 400x magnification (40x lens and 10x ocular-Zeiss optical microscope) were analyzed. The area of each captured image was of 0,0432mm². The counting of the positive cells was done manually on the computer monitor using an image analysis software (Unbvision). CD1a⁺ and active caspase-3⁺ cells were counted in 16 randomly chosen fields at a 400x magnification (40x lens and 10x ocular-Olympus optical microscope) using a grid of 1mm² adapted to the ocular. The number of positive cells was expressed in cells/mm². CD1a⁺ cells were counted only in epithelium. Bcl-X⁺ and Bak⁺ cells were not counted.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean \pm standard deviation. Comparisons between groups were made with non-parametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) and parametric (ANOVA) tests. Statistical significance was assigned to $p < 0.05$. Correlations between variables were analyzed using Spearman rank coefficient.

RESULTS

Histopathology

In all samples of the clinical forms, an inflammatory infiltrate (discrete to intense) consisting predominantly of mononuclear cells was observed. The frequency of the other histopathological findings is shown in Table 1. Vacuolated macrophages and amastigote forms of *Leishmania* were present in all samples of DCL. In LCL, MCL and DL, parasites were less frequent than in DCL and the other findings (hyperplasia, ulceration, granuloma, multinucleated giant cell, fibrosis and necrosis) were found in variable frequencies. In LCL caused by *L. (L.) amazonensis* amastigotes were found in only one of the three samples (1/3) (Table 2). Mononuclear infiltrate was scarce and associated in 100% of samples with fibrosis and multinucleated giant cells in control. In HIV-positive patient with MCL, mononuclear infiltrate, hyperplasia, ulceration, granuloma, multinucleated giant cell, necrosis and amastigotes were observed; the sample of DL presented only mononuclear infiltrate and amastigotes.

Immunohistochemistry

The number (mean \pm s.d.) of positive cells/mm² for cell markers, in each clinical form, is shown in Table 3. T CD45RO⁺ lymphocytes were the predominant cells in all clinical forms. The number of CD45RO⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T and CD20⁺ B lymphocytes cells was

significantly lower in DCL than in LCL ($p < 0.05$). Because of the limited number of cases, the LCL caused by *L. (L.) amazonensis* was not compared (statistically) with LCL caused by *L. (V.) braziliensis* and with the others clinical forms, but regards to the number of lymphocytes, the LCL caused by *L. (L.) amazonensis* approximated more of the LCL than of LCD, clinical form also caused by *L. (L.) amazonensis*. Between MCL and LCL, significant differences were observed in CD1a and CD15 expression. CD1a⁺ cells were more frequent in LCL and CD15⁺ cells in MCL. DL and LRC were not compared with the other clinical forms because of the limited number of cases. In control, the number of CD45RO⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T and CD20⁺ B lymphocytes was significantly lower when compared with LCL. In HIV-positive patients, the number of CD4⁺ cells was 732 and 460 cells/mm² in samples of MCL and DL, respectively.

Apoptotic cells (active caspase 3⁺) were observed in 49.33% (37/75) of the samples. The number of lesions with positive cells, according to the clinical form, was as follows: LCL (28/53), MCL (6/13) DCL (1/6), DL (1/2) and LRC (1/1). As shown in Table 3, the number (mean \pm s.d.) of positive cells was low in all the clinical forms. The higher expression of active caspase 3 (7.20 ± 14.82 cells/mm²) was observed in LCL (Figure 1f). There was no correlation between the expression of caspase and duration of the lesion. Active Caspase 3⁺ cells were found mainly adjacent necrosis areas. The number of apoptotic cells in samples with necrosis (12.57 ± 18.22 cells/mm²) was significantly higher when compared with the number in samples without necrosis (2.78 ± 7.56 cells/mm²) ($p < 0.0002$). In epithelium, apoptotic cells were occasionally found. A positive correlation was observed between the expression of active caspase 3 and FasL ($r = 0.49$; $p = 0.0009$; $n = 43$) in LCL (Figure 2).

FasL was expressed in all samples of all clinical forms mainly in mononuclear cells of inflammatory infiltrate. Plasma cells expressed strongly FasL in a paranuclear staining

(Figure 1c, 1d). The higher number of positive cells was observed in LCL (337.14 ± 300.40 cells/mm²).

Bcl-2 stained the mononuclear cell of inflammatory infiltrate of all samples. Vacuolated macrophages and epithelioid granuloma were negative (Figure 1a, 1b). In epithelium, scarce positive cells were found. The higher number of positive cells was observed in LCL and MCL (595.83 ± 276.58 e 632.06 ± 330.41 cells/mm², respectively). A positive correlation was observed between the expression of Bcl-2 and lymphocytes (CD45RO⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD20⁺).

Bcl-X expression was observed in epithelium, in mononuclear cells of the inflammatory infiltrate and in amastigotes (Figure 1e). Bak presented a strong and diffuse positivity in epithelium and in all cells of inflammatory infiltrate of the dermis/lamina propria and, because of this, the number of positive cells was not quantified.

In control, apoptotic cells were observed in only one of the six samples and the expression of Bcl-2 and FasL was significantly lower than in LCL.

In HIV-positive patients, the number of positive cells for active caspase-3, FasL and Bcl-2 was, respectively, 2, 136 and 792 cells/mm² in MCL and 4, 144 and 504 cells/mm² in DL.

DISCUSSION

Apoptosis has been considered essential in regulation of immune response in several parasitic diseases.^{8,9,10} In ATL, parasites induce a variety of clinical presentations in hosts modulated by their immune system.^{1,2} In order to better understand the role of apoptosis in determine the clinical forms of ATL, we analyzed the expression of apoptotic markers in lesions. To better characterize this expression, we also performed a histopathological analyzes and an identification of cell types found in inflammatory infiltrate of the lesions. Our histopathological findings and cell types found were in accordance with those of previous

researches.^{16,17,18,2} DCL was the clinical form more different from the others, presenting macrophages vacuolated with abundant amastigotes in all lesions and significant lower number of T cell when compared with LCL.

In present study, apoptotic cells were not found in all samples and the number (mean \pm s.d.) of positive cells was low in all clinical presentations. This difficulty to identify apoptotic cells occurs because, different from necrosis, apoptosis is characterized by rapid elimination of individual cells, which are often phagocytosed by macrophages without inflammation.¹⁹ Previous study, analyzing apoptosis in tuberculosis, also obtained a low number of apoptotic cells in lesions.²⁰

The presence of necrosis in lesions of LCL may be one of reasons for the higher number of apoptotic cells in this clinical form, since apoptosis was significantly more frequent in samples with necrosis when compared with samples without necrosis. The association between necrosis and apoptosis has already been demonstrated in tuberculosis.²¹ The higher number of apoptotic cells observed in LCL also may be explained by the higher expression of FasL and by the significant positive correlation between the expression of caspase and FasL obtained in this clinical form. The higher number of apoptotic and FasL⁺ cells in LCL, clinical form characterized by spontaneous resolution, is in accordance with previous studies that demonstrated that the resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires the pathway Fas/FasL.¹³ These results also suggest that apoptosis may be important to determine the clinical form of the disease.

FasL was expressed in mononuclear cells of inflammatory infiltrate, mainly in plasma cells. Previous study demonstrated, by immunohistochemistry, that plasma cells are the main producers of FasL in the normal peripheral immune system.²² Similarly to this previous study, we found a strong and predominantly paranuclear staining in plasma cells, a pattern most likely representing the Golgi compartment that suggests that plasma cells may release soluble

FasL. Recent study demonstrated that soluble FasL may be less efficient in inducing apoptosis than membrane-bound FasL and, in circumstances still ill-defined, even block apoptosis mediated by membrane-bound FasL.²³ Thus, plasma cell as prominent producers of FasL, may be a yet underestimated regulator of immune responses.

As an immune evasion mechanism, other infection agents such as mycobacterium and human immunodeficiency virus (HIV) have been shown to increase the expression of FasL on infected macrophages that can induce apoptosis in the Fas-expressing lymphocytes.^{24,20} In our study, however, macrophages containing high numbers of amastigote forms of *Leishmania* did not over-express FasL. These vacuolated macrophages and also the epithelioid granuloma expressed Bak but not Bcl-2 and Bcl-X. This unbalance of pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family also was observed in tuberculosis and may render the macrophages and granulomas sensitive to apoptosis. However, the expression of the other members of Bcl-2 members will be necessary to determine if intrinsic pathway favor or not apoptosis.

Clinical manifestations of ATL in HIV-infected patients are diverse and depend on immunological status. Multiple cutaneous lesions and mucosal involvement are very common in these patients.^{25,26,27} Our patients, in agreement with previous results, presented clinical forms more severe of ATL (MCL and DL). In these patients, the number of CD4⁺ and apoptotic cells was lower than the mean observed in samples of MCL and DL of HIV-negative patients.

Apoptosis leading to keratinocyte death and ulceration has been described in other cutaneous diseases such as toxic epidermal necrolysis and Steven-Johnson syndrome.^{28,29} In ATL, as observed in our study, ulcerated lesions are observed mainly in LCL and MCL. As apoptosis and FasL expression were more frequent in these clinical forms when compared with DCL, there is a possibility that apoptosis may contribute to ulcer formation in lesions.

Recent study proposed that FasL-expressing effector T cells and macrophages may act to induce apoptosis and ulcer formation in Fas-expressing keratinocytes during *L. major* infection.³⁰ In this previous study, the number of TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) positive cells in biopsies from active lesions was higher as compared to healing or control sections. In our study, in HE sections and in stained sections with active caspase 3, scarce apoptotic cells were observed in epithelium adjacent ulceration. Thus, we could not conclude about the role of the apoptosis in ulcer formation. One aspect that must be emphasized is that TUNEL has become a widespread modality for the identification of apoptosis in tissue sections, but it should always be evaluated in association with morphologic criteria and expression of apoptotic markers to avoid false positive staining.³¹

The notion that a mechanism of PCD, similar to apoptosis, might exist in unicellular organisms has been a matter of controversial discussion but this idea is now widely accepted. In several protozoan species, this death process is characterized by changes in cell morphology, DNA degradation, phosphatidylserine exposure, changes in mitochondrial membrane potential, activation of proteases and, finally, plasma membrane permeabilization³². However, the mechanisms that regulate this process and the proteins involved are still largely unknown. Genes that might code for proteins similar to those mainly involved in regulating apoptosis in higher eukaryotes, e.g. members of the Bcl-2 family and caspases, have not revealed. However, recently distant caspase homologues, termed metacaspases, were identified by sequence analyses³³. Besides this, it was demonstrated that transfection of *L. infantum* promastigotes with the gene sequence coding for Bcl-X protects the parasites from heat-induced cell death. In our study, the expression of Bcl-X in amastigote forms of *L.(V.) brasiliensis* and *L.(L.) amazonensis* suggests a possible existence of “counterparts” or

“homologues” of the Bcl-X observed in mammalian cells, but this finding must be investigated by other methods to dispose the hypothesis of cross reaction.

In summary, the differences observed in expression of apoptotic markers in lesions of the clinical presentations make evident the involvement and importance of apoptosis in evolution of the lesions in ATL. As targeting apoptotic cell death pathways may provide wide ranging opportunities for the discovery and development of novel drugs, further investigation will be necessary to answer many questions that yet persist.

Authors' address: Fabiana P. Carneiro, Albino V. De Magalhães, Mário A. P. Moraes, Isabel I. R. Leal, Verônica M. G. Furtado, Carmen D. R. De Paula, Maria De Jesus A. A. Couto, Gilcilene Maria dos Santos. Centro de Anatomia Patológica. Hospital Universitário de Brasília, UNB. Via L2 Norte, SGAN 604/605, Módulo C. Brasília DF, Brasil. CEP: 70840-050

REFERENCES

1Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ, 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444--8.

2Silveira FT, Lainson R, Corbett CE, 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239--51.

3Grimaldi G Jr, Tesh RB, 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230--50.

4Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H,1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 135: 4144-8.

5Bogdan C, Rollinghoff M, 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121--34.

6Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK, 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 11: 506--25.

7Van Parijs L, Biuckians A, Abbas AK, 1998. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol* 160: 2065--71.

8Dockrell DH, 2003. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 9: 766--79.

9Luder CG, Gross U, Lopes MF, 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17: 480--6.

10Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Lüder CG, 2006. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology* 132 Suppl: S69--85.

11Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC, 2002. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 9:65--81.

12Chakour R, Guler R, Bugnon M, Allenbach C, Garcia I, Mauël J, Louis J, Tacchini-Cottier F, 2003. Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. *Infect Immun* 71:5287--95.

13Conceição-Silva F, Hahne M, Schröter M, Louis J, Tschopp J, 1998. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 28: 237--45.

14Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Pérez JM, 2004. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? *Trends Parasitol* 20: 375--80.

15de Paula CD, Sampaio JH, Cardoso DR, Sampaio RN, 2003. [A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis] *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 365--71.

16Bittencour T AL, Barral A,1991. Evaluation of histopathological classifications of American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86:51--56.

17de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD, 1986. [Histopathology of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Histopathological classification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28: 421--30.

18Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ, 2002. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol* 11: 34--41.

19Krysko DV, Vanden Berghe T, Parthoens E, D'Herde K, Vandenabeele P, 2008. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol* 442:307--41.

20Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH, Nilsen R, 2001. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand J Immunol* 54: 630--9.

21Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A, Schweyer S, Herms J, Schwarz P, Radzun HJ, 2000. Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J Pathol* 191: 417--25.

22Sträter J, Mariani SM, Walczak H, Rücker FG, Leithäuser F, Krammer PH, Möller P, 1999. CD95 ligand (CD95L) in normal human lymphoid tissues: a subset of plasma cells is prominent producers of CD95L. *Am J Pathol* 154:193--201.

23Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S, 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4: 31--6.

24 Dockrell DH, Badley AD, Villacian JS, Heppelmann CJ, Algeciras A, Ziesmer S, Yagita H, Lynch DH, Roche PC, Leibson PJ, Paya CV, 1998. The expression of Fas Ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest* 101: 2394--405.

25Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H, 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 160:311--8.

26Sampaio RN, Salaro CP, Resende P, de Paula CD, 2002. [American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases] *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 651--4.

27Mattos M, Caiza A, Fernandes O, Gonçalves AJ, Pirmez C, Souza CS, Oliveira-Neto MP, 1998. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 10: 218--25.

28Choi HJ, Ku JK, Kim MY, Kang H, Cho SH, Kim HO, Park YM, 2006. Possible role of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in the pathogenesis of fixed drug eruption. *Br J Dermatol* 154: 419--25.

- 29Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H, 2003. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. *Am J Pathol* 162:1515--20.
- 30Eidsmo L, Nylén S, Khamesipour A, Hedblad MA, Chiodi F, Akuffo H, 2005. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous Leishmaniasis. *Am J Pathol* 166:1099--108.
- 31Baima B, Sticherling M, 2002. How specific is the TUNEL reaction? An account of a histochemical study on human skin. *Am J Dermatopathol* 24:130--4.
- 32Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL, 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ* 9(1):53--64.
- 33Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC, 2008. An essential role for the *Leishmania* major metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ* 15(1):113--22.
- 34Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, González VM, Jiménez-Ruiz A, 2006. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X (L) expression. *Apoptosis* 11: 161--71.

Table 1 – Frequency of histopathological findings in control and in different clinical forms of ATL: LCL (localized cutaneous leishmaniasis), MCL(mucocutaneous leishmaniasis), DCL (diffuse cutaneous leishmaniasis), DL (disseminated leishmaniasis) and LRC (recidiva cutis leishmaniasis).

histopathological findings	control	DCL	LCL	MCL	DL	LRC
Epithelial hyperplasia	33,33% (2/6)	16,66% (1/6)	94,11% (64/68)	80% (12/15)	100% (2/2)	0/1
ulceration	16,66% (1/6)	16,66% (1/6)	36,76% (25/68)	73,33% (11/15)	0 (0/2)	1/1
necrosis	0 (0/6)	0 (0/7)	32,35% (22/68)	53,33% (8/15)	100% (2/2)	1/1
fibrosis	100% (6/6)	42,85% (3/7)	0 (0/68)	20% (3/15)	0 (0/2)	0/1
vacuolated macrophages	0 (0/6)	100% (7/7)	7,35% (5/68)	0 (0/15)	0 (0/2)	0/1
granuloma	0 (0/6)	0 (0/7)	54,41% (37/68)	53,33% (8/15)	50% (1/2)	0/1
multinucleated giant cell	100%(6/6)	0 (0/7)	42,64% (29/68)	40% (6/15)	50% (1/2)	0/1
amastigotes	0 (0/6)	100% (7/7)	36,76% (25/68)	13,33% (2/15)	50% (1/2)	0/1

Table 2 – Frequency of histopathological findings in LCL (localized cutaneous leishmaniasis) according to the species of *Leishmania*.

histopathological findings	LCL - <i>L.(V.) braziliensis</i>	LCL- <i>L.(L.) amazonensis</i>
Epithelial hyperplasia	15/16 (93,75%)	3/3 (100%)
ulceration	4/16 (25%)	1/3 (33,34%)
necrosis	6/16 (37,5%)	2/3 (66,67%)
fibrosis	0/16 (0%)	0/3 (0%)
vacuolated macrophages	1/16 (6,25%)	0/3 (0%)
granuloma	9/16 (56,25%)	3/3 (100%)
multinucleated giant cell	5/16 (31,25%)	2/3 (66,67%)
amastigotes	5/16 (31,25%)	1/3 (33,34%)

Table 3 – Number of positive cells/mm² for cell and apoptotic markers in control, LCL (localized cutaneous leishmaniasis), MCL(mucocutaneous leishmaniasis), DCL(diffuse cutaneous leishmaniasis), DL(disseminated leishmaniasis) and LRC (recidiva cutis leishmaniasis).

markers	control mean ± s.d.	DCL mean ± s.d.	LCL mean ± s.d.	MCL mean ± s.d.	DL mean ± s.d.	LRC number
CD1a	100 ± 55.13	46.66 ± 31.76	122.12 ± 57.52	21.11 ± 25.92	176 ± 0	64
CD8	121.33 ± 59.74	486.28 ± 346.67	1081.31 ± 426.86	871.73 ± 414.16	746 ± 523.25	1092
CD4	116.66 ± 44.98	263.33 ± 126.65	765.96 ± 305.56	849.25 ± 482.52	483.5 ± 504.17	864
CD45RO	224 ± 49.31	828 ± 358.27	1660.72 ± 344.13	1600 ± 678.08	1172 ± 831.55	1680
CD20	44.8 ± 14.53	96 ± 89.19	373.17 ± 279.43	408.53 ± 270.80	240 ± 203.65	36
CD15	53.33 ± 65.12	89.71 ± 53.40	131.46 ± 98.83	448.61 ± 477.60	108 ± 0	48
CD68	88 ± 34.87	573.71 ± 150.14	476 ± 258.98	654.15 ± 362.76	534 ± 330.93	300
Bcl-2	113.33 ± 34.09	249.6 ± 144.6	595.83 ± 276.58	632.06 ± 330.41	232 ± 11.31	324
FasL	56 ± 28.17	220 ± 310.2	337.14 ± 300.40	223.33 ± 215.86	108 ± 16.97	120
Caspase	0.33 ± 0.81	0.5 ± 1.22	7.20 ± 14.82	4.35 ± 7.25	2 ± 2.82	14

Table 4 – Number of positive cells/mm² for cell and apoptotic markers in LCL (localized cutaneous leishmaniasis) according to the species of *Leishmania*.

markers	LCL - <i>L.(V.) braziliensis</i>		LCL - <i>L.(L.) amazonensis</i>	
	mean ± s.d.		mean ± s.d.	
CD1a	92 ± 66,24	n=8	176 ± 0	n=2
CD8	1186,4 ± 370,56	n=15	1112 ± 159,80	n=3
CD4	787,42 ± 315,33	n=7	576 ± 0	n=1
CD45RO	1464 ± 0	n=1	1564 ± 333,75	n=2
CD20	378,87 ± 301,05	n=16	344 ± 81,68	n=3
CD15	74,4 ± 39,25	n=5	108 ± 0	n=1
CD68	414,90 ± 271,49	n=4	360 ± 33,94	n=2
Bcl-2	506,5 ± 328,70	n=12	480 ± 228,95	n=3
FasL	266,2 ± 211,43	n=10	120 ± 113,14	n=2
Caspase	9,30 ± 14,90	n=13	1 ± 3	n=3

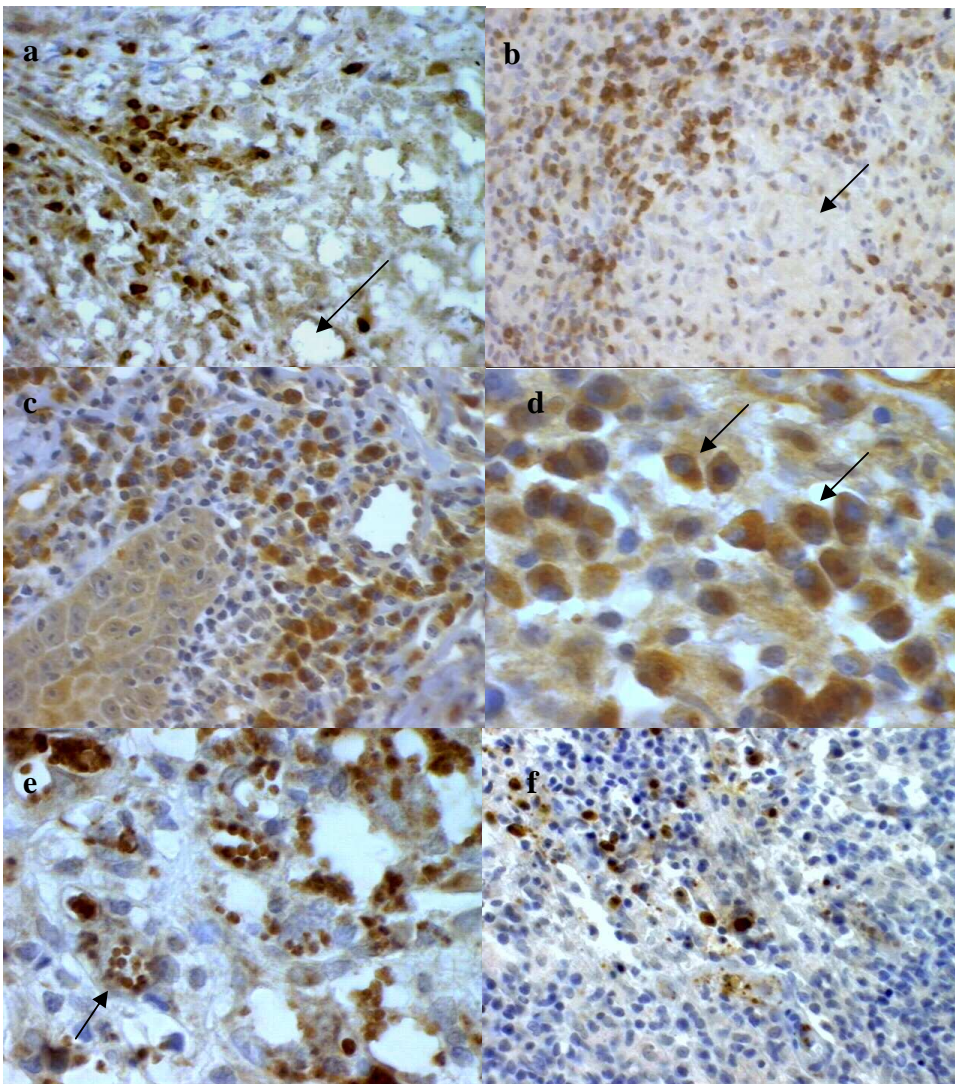


Figure 1 - Expression of apoptotic markers by immunohistochemistry. Positive cells are indicated by brown staining. (a) Mononuclear cells expressed Bcl-2, vacuolated macrophages were negative (arrow). (b) Mononuclear cells expressed Bcl-2, granuloma was negative (arrow). (c) FasL- positive plasma cells adjacent the epidermis. (d) paranuclear staining of FasL in plasma cell (arrows). (e) Bcl-x was expressed in amastigote forms of *Leishmania* (arrow). (f) Apoptotic cells (active caspase 3⁺) in LCL. Original magnification, x400 for figures a, b, c, f and x1000 for d, e.

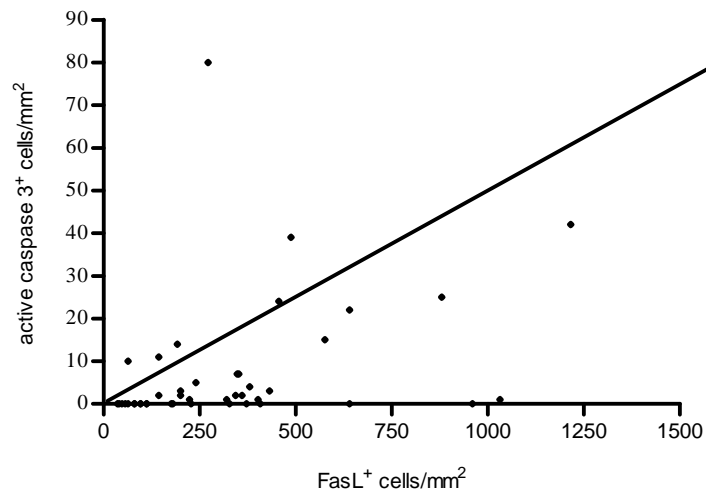


Figure 2 - Correlation between the expression of FasL and active caspase 3 in LCL. There was a significant positive correlation ($r=0.49$, $p=0.0009$, $n=43$).

