



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**LAÉCIO PAULO SOUSA DOS SANTOS**

**PERFIL DE CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA**

**FORTALEZA**

**2018**

**LAÉCIO PAULO SOUSA DOS SANTOS**

**PERFIL DE CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientador: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S1p SANTOS, LAÉCIO PAULO SOUSA DOS.  
PERFIL DE CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE IN SITU NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
DISSEMINADA / LAÉCIO PAULO SOUSA DOS SANTOS. – 2018.  
51 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. MARGARIDA MARIA DE LIMA POMPEU.

1. Leishmaniose cutânea disseminada. 2. Leishmaniose cutânea localizada. 3. Resposta imune. 4. Citocinas. 5. Imunohistoquímica. I. Título.

CDD 571.9

---

**FORTALEZA**

**2018**

**LAÉCIO PAULO SOUSA DOS SANTOS**

**PERFIL DE CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE *IN SITU* NA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA DISSEMINADA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Maria Jania Teixeira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Mércia Sindeaux Frutuoso  
Centro Universitário Christus

A Deus.

Aos meus pais, Pedro Carvalho e Joana Darc.

Para todos os amigos que vivenciaram as  
provações dessa etapa em minha vida e  
que sempre depositaram confiança em  
mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ouvir minhas preces, me dar forças e sempre renovar a minha fé para continuar trilhando meu caminho, por sempre colocar pessoas boas e na hora certa em minha vida;

À Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu, minha orientadora, por todo acolhimento e confiança, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade. Uma grande guerreira. Que Deus continue a abençoá-la e protegê-la;

À minha eterna coorientadora, Prof. Dra. Mércia Frutuoso Sindeaux, por todos os ensinamentos e orientações. Pessoa admirável e super alto astral;

À uma pessoa que tem uma grande importância nessa conquista, professora Dra. Maria Jania Teixeira, que é humilde, acolhedora e compreensiva;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia, pelos momentos louváveis de ensinamento e convivência;

A todos do Laboratório Multiusuário de Patologia (LAMP), em especial ao Pedro Sindeaux, por todo o apoio e companheirismo.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia do DPML;

Aos colegas do mestrado, pelo convívio e troca de experiências. Agradeço em especial ao que se tornou um irmão, companheiro de moradia, Gleyson Moura.

Aos meus pais e irmãs pela compreensão e apoio durante esse momento de busca e realização;

Aos familiares, em especial à minha avó, Francisca Isabel, pela compreensão da ausência em muitos momentos do dia a dia.

Aos meus amigos, Nilsinho e Ailton, por sempre me consolarem em momentos difíceis e de desânimo. Pela confiança e companheirismo de sempre.

Ao meu filhote, Bill, não poderia deixar de mencioná-lo, pois é o meu companheiro fiel e o que mais confia e me ama, e que sempre me proporciona momentos maravilhosos ao seu lado, meu cão.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade desta Pós-graduação;

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“... não temas, pois a tua oração foi ouvida...”

(Lucas 1:13)

## RESUMO

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) é uma forma rara e emergente de infecção causada por leishmania. Ela inicia com uma lesão que ulcera e ocorre disseminação hematogênica e linfática do parasito. É caracterizada pela presença de 10 ou mais lesões cutâneas pleomórficas (papular, nodular, acneiforme, crostosa e ulcerada), acometendo dois ou mais segmentos anatômicos do corpo e com comprometimento de mucosa. No Novo Mundo é causada, comumente, pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* sendo documentado casos com *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania guianensis*, *Leishmania panamensis* and *Leishmania peruviana* e, no Velho Mundo, têm sido descritas *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. Sua patogênese ainda não está esclarecida, dados da literatura sugerem que seja devido à uma imunossupressão. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de citocinas proinflamatórias e anti-inflamatórias na lesão cutânea de indivíduos com LCD. Um estudo caso-controle foi conduzido, constituído por 8 pacientes com LCD e 12 com LCL. Foram realizadas biópsias das lesões ulceradas e essas amostras foram submetidas à imunohistoquímica, para determinar a expressão de INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . A quantificação de células expressando citocinas na derme foi determinada pela contagem das células marcadas e das não marcadas, em 10 campos de 400X, utilizando o programa Image J e calculada a frequência relativa. Na lesão, não houve diferença significativa na produção de IFN- $\gamma$  pelas células do infiltrado inflamatório entre os dois grupos, com mediana de 2,0% (LCL) e 4,6% (LCD). Já em relação à citocina antiinflamatória, verificou-se que nas lesões dos pacientes com LCD havia maior produção de IL-10 do que nas dos de LCL, mediana igual a 1,6% e 0,4% respectivamente ( $p=0,04$ ). Conclusão: A produção de IL-10 nas lesões cutâneas de pacientes com LCD foi maior que nas de pacientes com LCL ( $p=0,04$ ), indicando que a imunossupressão pode ser mediada por IL-10.

**Palavras chaves:** Leishmaniose cutânea disseminada. Leishmaniose cutânea localizada. Resposta imune. Citocinas. Imunohistoquímica.

## ABSTRACT

Disseminated cutaneous leishmaniasis (LS) is a rare and emerging form of leishmania infection. It begins with a lesion that ulcerates and occurs hematogenous and lymphatic dissemination of the parasite. It is characterized by the presence of 10 or more pleomorphic skin lesions (papular, nodular, acneiform, crusty and ulcerated), affecting two or more anatomical segments of the body and with mucosal involvement. In the New World it is commonly caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, with cases with *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania guianensis*, *Leishmania panamensis* and *Leishmania peruviana*, and in the Old World *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. Its pathogenesis has not yet been clarified, data from the literature suggest that it is due to an immunosuppression. The aim of this study was to evaluate the expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in the cutaneous lesion of individuals with LCD. A case-control study was conducted, consisting of 8 patients with LCD and 12 patients with LCL. Biopsies of the ulcerated lesions were performed and these samples were submitted to immunohistochemistry to determine the expression of INF- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$ . Quantification of cytokine expressing cells in the dermis was determined by counting the labeled and unlabelled cells in 10 400X fields using the Image J program and calculating the relative frequency. In the lesion, there was no significant difference in INF- $\gamma$  production by the inflammatory infiltrate cells between the two groups, with a median of 2.0% (LCL) and 4.6% (LCD). As for the anti-inflammatory cytokine, it was verified that in the lesions of the patients with LCD, there was a higher production of IL-10 than in those of LCL, a median of 1.6% and 0.4%, respectively ( $p = 0.04$ ). Conclusion: The production of IL-10 in cutaneous lesions of patients with LCD was higher than in patients with LCL ( $p = 0.04$ ), indicating that immunosuppression could be mediated by IL-10.

**Key words:** Disseminated cutaneous leishmaniasis. Localized cutaneous leishmaniasis. Immune response. Cytokines. Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <b>Figura 1:</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos principais estágios evolutivos de <i>Leishmania</i> .....	17
Figura 2 - Ciclo de vida digenético do protozoário <i>Leishmania</i> spp .....	18
Figura 3 - Ocorrência da leishmaniose cutânea no mundo, 2015 .....	20
Figura 4 - Leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2015 .....	20
Figura 5 - Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana .....	23
Figura 6 - Resposta imune na LTA .....	26
Figura 7 - Aparelho <i>PT Link</i> .....	32
Figura 8 - Microscópio AXIO Scope A1 Zeiss® .....	33
Figura 9 - Ilustração do campo de contagem do programa Image J (NIH) .....	34
Figura 10 - Fluxograma de métodos .....	35
Figura 11 - Expressão de IFN- $\gamma$ corados por IHQ, em cortes histológicos de lesões de pacientes com LCL: A - (baixa expressão); B - (alta expressão) e com LCD: C - (baixa expressão); D - (alta expressão) .....	36
Figura 12 - Expressão de TGF- $\beta$ corados por IHQ, em cortes histológicos de lesões de pacientes com LCL (A) e com LCD (B) .....	37

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Determinação da frequência relativa da imunexpressão de IFN- $\gamma$ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LCL (n= 12) e LCD (n=8) .....	37
Gráfico 2 - Determinação da frequência relativa da imunexpressão de TGF- $\beta$ no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LCL (n= 12) e LCD (n=8) .....	38
Gráfico 3 - Determinação da frequência relativa da imunexpressão de IL-10 no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LCL (n= 12) e LCD (n=7) .....	38
Gráfico 4 - Correlação linear entre a expressão de IFN- $\gamma$ e IL-10 na lesão de pacientes com LCD (n=8) e LCL (n=12) .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclica
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CD	<i>Clusters of Differentiation</i> – Grupamentos de Diferenciação
CD4 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito T CD4
CD8 <sup>+</sup>	Marcador de Linfócito T CD8
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CI	Critérios de Inclusão
CE	Critérios de Exclusão
CTLA	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen</i> - Antígeno Associado ao Linfócito T Citotóxico
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i> - Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IL	Interleucina
IHQ	Imuno-Histoquímica
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LD	Leishmaniose Difusa
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SisLeish	Sistema Regional de Informações de Leishmanioses
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 2
Th17	Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 17

Treg Células T regulatórias  
TGF- $\beta$  Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$   
TNF- $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$   
WHO *World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu\text{g}$	Micrograma
mL	Mililitro
Mm	Milímetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 Leishmanioses e Agente etiológico .....	16
1.2 Ciclo biológico e Transmissão.....	17
1.3 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar .....	19
1.4 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar.....	21
1.5 Resposta imune na leishmaniose tegumentar americana .....	24
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivo específico .....	30
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Tipo de estudo.....	31
4.2 Aspectos éticos .....	31
4.3 Local de estudo .....	31
4.4 Seleção das amostras .....	31
4.4.1 Critérios de inclusão.....	31
4.4.2 Critérios de exclusão .....	31
4.5 Imunohistoquímica para as citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ e IL-10.....	32
4.5.1 Recuperação antigênica.....	32
4.5.2 Marcação por Imuno-histoquímica .....	33
4.6 Análise Morfométrica .....	34
4.6.1 Análise Estatística dos dados .....	34
4.7 Desenho experimental do estudo .....	35
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses e Agente etiológico

Leishmaniose é uma doença tropical e neotropical, e que tem sido considerada uma doença negligenciada, devido aos recursos limitados investidos em seu diagnóstico, tratamento e controle. Pode acometer a pele e linfonodos regionais, apresentando úlceras localizadas na pele, conhecida como leishmaniose cutânea (LC), ou como uma doença sistêmica que pode ser fatal, a leishmaniose visceral (LV), dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (ALVES *et al.*, 2013).

Nas Américas, a LC é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). É uma doença infecciosa, não contagiosa, de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que vem acometendo o homem e sendo relatada desde a antiguidade. A LC é a forma mais comum de leishmaniose, provocando lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, acometendo pele e mucosas (ALVES *et al.*, 2013; WHO, 2017; PAHO, 2017; BRILHANTE *et al.*, 2017).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários intracelulares, que possuem mais de 30 espécies, das quais 11 têm grande importância médica e veterinária (CECÍLIO *et al.*, 2014). Nas Américas, são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* que são dermatrópicas e podem causar doença em humanos e 8 espécies descritas, que causam doenças em animais. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, desde a assintomática até a forma com comprometimento extenso e dano de mucosa, dependendo do agente etiológico e da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (GONTIJO & CARVALHO, 2003; ANDRADE-NARVAEZ *et al.*, 2016.; BRILHANTE *et al.*, 2017).

No Brasil, foram identificadas 7 espécies de *Leishmania* que causam as manifestações tegumentares, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. As principais espécies causadoras são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonenses*. A maioria dos casos de LTA são causados por *L. (V.) braziliensis* (ALVES *et al.*, 2013; MARQUES, *et al.*, 2017).

Os possíveis reservatórios naturais são algumas espécies de roedores, canídeos silvestres, marsupiais e edentados. Os animais domésticos, como o cão e o gato, são

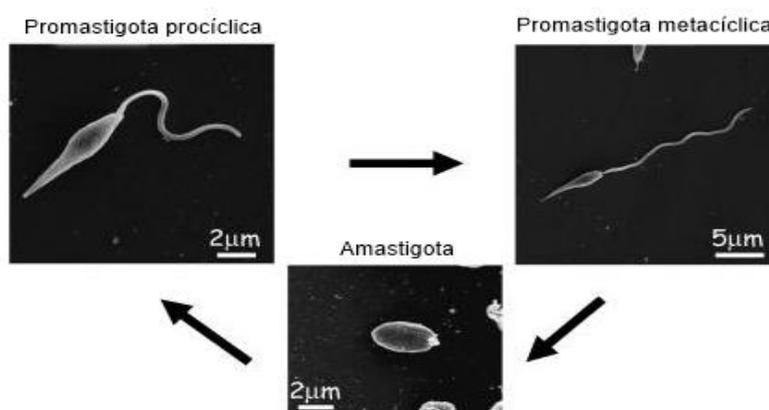
considerados reservatórios de transmissão peridomiciliar (LIMA, 1995; SIMÕES MATTOS *et al*, 2001; PADILLA *et al*, 2002.; SIMÕES MATTOS *et al* 2004; MANCIANTI *et al*, 2004.; SIMÕES MATTOS *et al*, 2005; DANTAS-TORRES *et al*., 2010; CALZADA *et al*, 2014; SASANI *et al*, 2016). No Brasil, espécies de vetores envolvidos na transmissão da LTA são, principalmente, *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intemedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei* (GONTIJO & CARVALHO).

## 1.2 Ciclo biológico e Transmissão

O gênero *Leishmania* compreende protozoários que se caracterizam por um ciclo de vida digenético ou heteroxênico, por necessitar alternadamente de hospedeiros vertebrados e de insetos vetores (hospedeiro invertebrado), estes últimos são os responsáveis pela transmissão do parasito de um mamífero a outro (GONTIJO & CARVALHO, 2003; CECÍLIO *et al.*, 2014).

A transmissão para vertebrados ocorre pela picada de fêmeas de dípteros infectadas, da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* – no Velho Mundo e *Lutzomyia* – no Novo Mundo. Nos flebotomíneos, *Leishmania* vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo (ABDELLATIF; EL-MABROUK e EWIS, 2013; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

**Figura 1:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos principais estágios evolutivos de *Leishmania*.

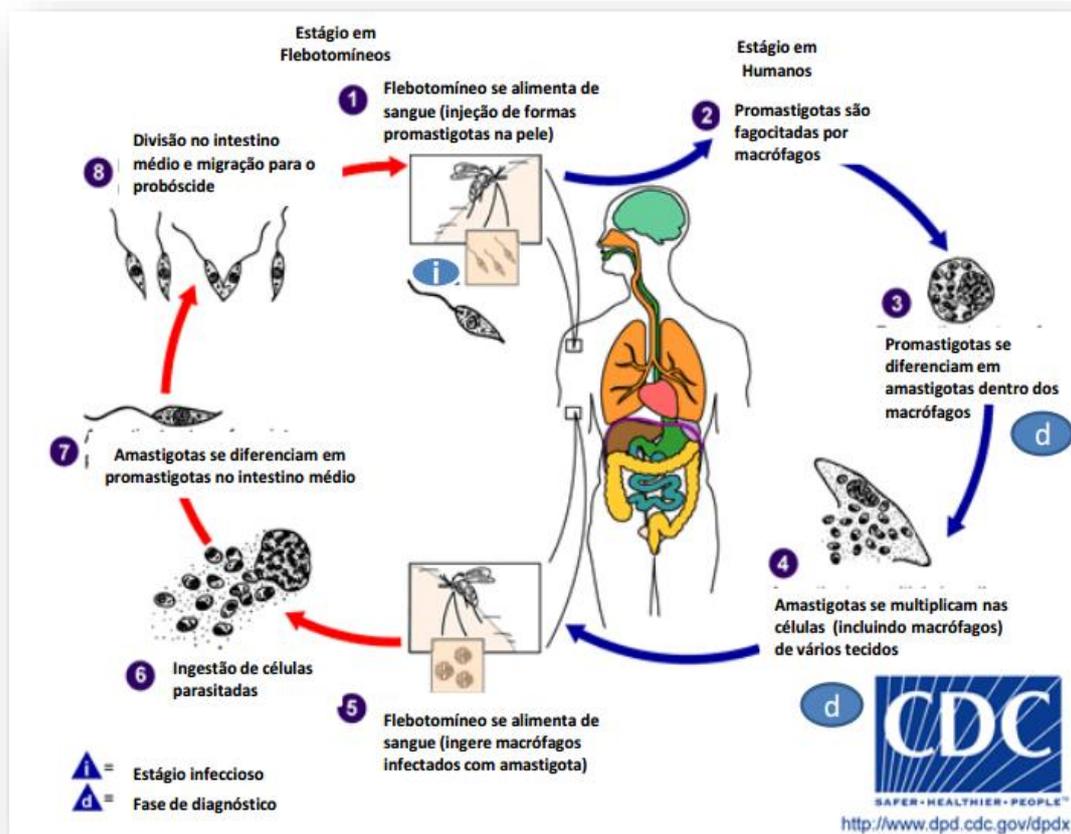


Fonte: Adaptada de Besteiro *et al*, 2007.

O parasito apresenta duas formas evolutivas distintas: promastigotas, que são extracelulares, flageladas e são encontradas no trato digestivo dos vetores

flebotomíneos; e as amastigotas, que são obrigatoriamente intracelulares, sem flagelo externo e encontradas predominantemente em células da linhagem fagocítica mononuclear dos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (GONTIJO & CARVALHO, 2003; PACE, 2014).

**Figura 2:** Ciclo de vida digenético do protozoário *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014.

Ao se alimentar em mamíferos infectados, as fêmeas de flebotomíneos ingerem macrófagos parasitados com amastigotas. No trato digestivo, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas que se ligam à parede do intestino, sofrendo várias mudanças morfológicas e bioquímicas, que irão resultar na forma infecciosa do parasito, a promastigota metacíclica. Nessa fase, ocorre a perda da capacidade de fixação ao intestino médio, resultado na migração para a probóscide do flebotomíneo. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando, durante o repasto sanguíneo do inseto, as formas infectantes do parasito são liberadas na derme do

hospedeiro mamífero. Logo em seguida, os parasitos são captados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), onde irão se diferenciar em amastigotas, dentro de vacúolos parasitóforos dos macrófagos. Com o evoluir da divisão das amastigotas, o macrófago se rompe e ocorre a liberação das formas amastigotas para o meio extracelular, que serão novamente fagocitadas por outras células do hospedeiro vertebrado, continuando assim o ciclo do parasito. O ciclo é concluído quando o flebotomíneo torna a se alimentar em hospedeiros vertebrados infectados, adquirindo as formas amastigotas (Figura 2) (ALMEIDA *et al.*, 2003; KAYE & SCOTT, 2011; CECÍLIO *et al.*, 2014).

### 1.3 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar

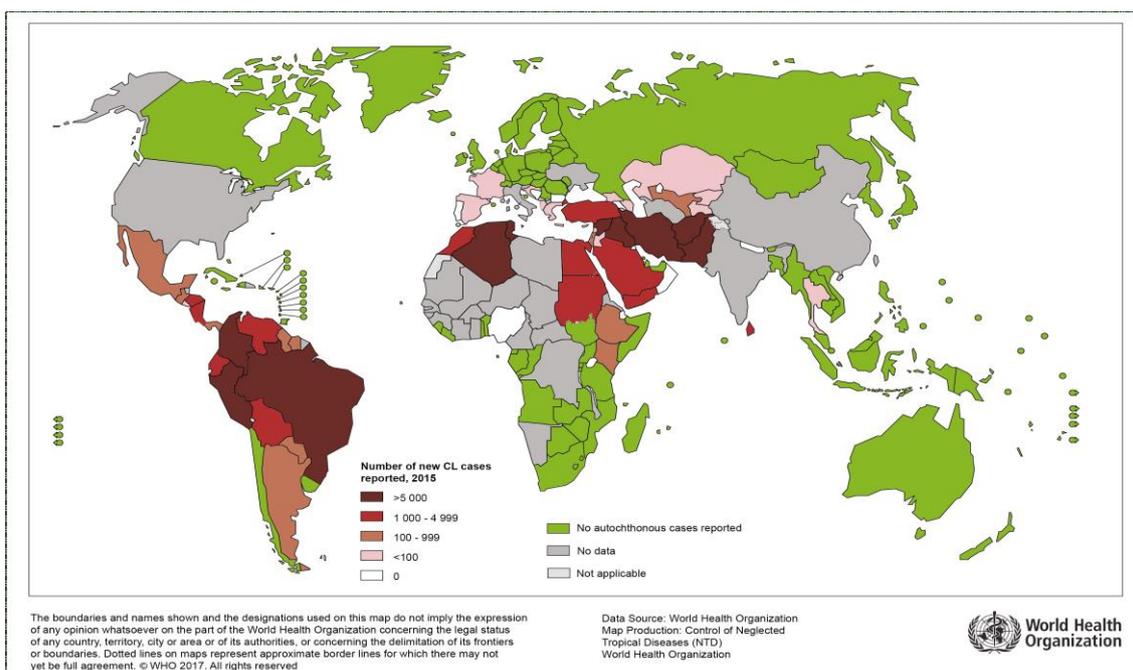
A leishmaniose tegumentar é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, importante problema de saúde pública em 98 países, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. A doença tem ampla distribuição no velho mundo e no continente americano, neste, com registros do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (WHO, 2013; GOTO, *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2015).

Em 2015, 200 países relataram a ocorrência de leishmaniose cutânea, sendo que em 87 desses países ela foi considerada endêmica e 4 com ocorrência ocasional. As áreas endêmicas estão distribuídas entre 6 regiões: África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Europa, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (Figura 3). A Região do Mediterrâneo Oriental relatou a maior proporção de países endêmicos para LC, representado 82% dos casos de LC, seguida da Região das Américas, com 58%. Cerca de 95% dos casos de LC no mundo ocorrem principalmente em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e República Árabe da Síria (WHO, 2017).

Nas Américas, a LTA acomete 20 países, sendo endêmica em 18 deles. No período de 2001 a 2015, foram relatados 843.931 casos novos de LTA, com média anual de 56.262 casos, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos (Figura 4) (PAHO/WHO, 2017).

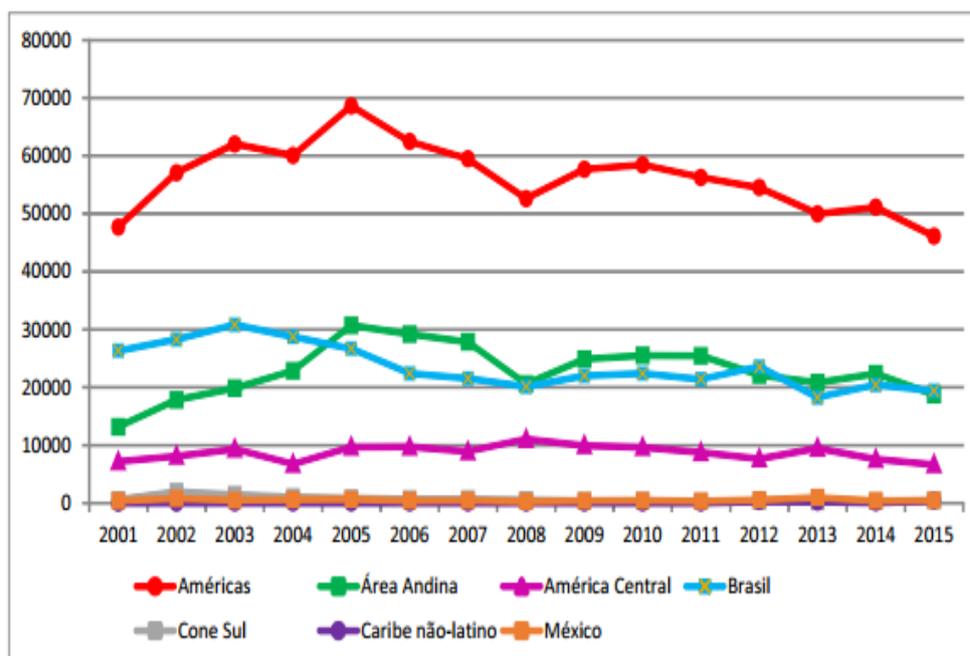
Em 2015, nas Américas foram relatados 46.082 casos de LC e LM nos países endêmicos, com exceção da Guiana Francesa que reporta diretamente os casos à França. Do total de casos das Américas, 70% foram reportados pelo Brasil, Colômbia e Peru. A taxa de incidência das Américas foi de 18,35 casos por 100.000 habitantes, e as maiores incidências foram registradas em Suriname (218,48/100.000 hab.) e na Nicarágua (76,64/100.000 hab.) (PAHO/WHO, 2017).

**Figura 3:** Ocorrência da leishmaniose cutânea no mundo, 2015.



Fonte: WHO, 2017.

**Figura 4.** Leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2015.



Fonte: PAHO/WHO, 2017.

O Brasil, em 2015, totalizou 19.395 casos, equivalentes a um percentual de 42,4% de um total casos de LC registrados na Américas (PAHO/WHO, 2017). Nas

últimas duas décadas, a incidência no Brasil vem mostrando expansão geográfica, com relatos de casos autóctones em todos os Estados a partir de 2003 (BRASIL, 2016).

Nos últimos 5 anos, no Brasil, foram registrados em média 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes. A região que tem o maior coeficiente de incidência é a região Norte, com 54,4 casos/100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste, com 22,9 casos/10.000 habitantes, e Nordeste, que apresenta uma incidência de 14,2 casos/100.000 habitantes. No entanto, a região Nordeste é a segunda que possui o maior número de casos, mesmo com todas as dificuldades de registro. É provável que o real número de casos seja muito maior do que o registrado pelos serviços de saúde (SVS/MS, 2016).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, dentre os estados da região Nordeste, o Ceará está entre os três estados de maior detecção da doença. No período de 2005 a 2015, foram registrados 9.965 casos de LTA, correspondendo a uma média de 905 casos anuais (SVS, 2016; MS, 2014). As microrregiões de maior incidência da doença no Ceará, em ordem decrescente, são Tianguá, Baturité, Itapipoca, Sobral, Crato e Juazeiro do Norte (CEARÁ, 2012).

A Macrorregião Administrativa de Baturité, que é constituída de 13 municípios e uma população estipulada de 239.000 habitantes, em 2015, registrou 151 casos de LTA, de um total de 529 casos no Estado, sendo área responsável por 28,54 % dos casos no Ceará. Os municípios com maior número de casos foram: Pacoti (95), Guaramiranga (18), Baturité (12) e Mulungu (11) (DATASUS, 2015, IBGE, 2014).

#### **1.4 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar**

A infecção causada por *Leishmania* pode levar a distintas manifestações clínicas, que dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose tegumentar é comumente classificada como: assintomática ou subclínica, cutânea localizada (LCL), cutânea-mucosa (LCM) ou mucosa (LM), cutânea disseminada (LCD) e cutânea difusa (LD) (MARZOCHI *et al.*, 1994; REITHINGER *et al.*, 2007; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; ANDRADE-NARVAEZ *et al.*, 2016; TIRELLI; VERNAL; ROSELINO, 2017). A leishmaniose subclínica geralmente é autoresolutiva e é a forma mais comum de leishmaniose tegumentar. Contudo, se ocorre uma resposta imune ineficaz, isso permite que ocorra a replicação de parasitos e o surgimento das manifestações clínicas com doença (CECÍLIO *et al.*, 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A lesão inicia com uma pápula eritematosa, no local da picada do inseto, na LCL. Depois evolui para a formação de nódulo que eventualmente úlcera, após um período de 2 semanas a 6 meses. A lesão típica apresenta úlcera com fundo granuloso e bordos elevados e pode apresentar crosta fibrinohemorrágica ou purulenta, caso tenha coinfeção bacteriana. Geralmente é indolor, no entanto, pode tornar-se dolorosa, quando ocorre uma coinfeção bacteriana ou quando se situa sobre uma articulação. Pode ter acometimento dos vasos linfáticos e linfonodos regionais – linfangite e linfadenite. A lesão pode permanecer por meses ou anos e quando cura deixa cicatriz atrófica e hipopigmentada (Figura 5A). Amastigotas podem persistir na cicatriz da lesão ou em linfonodos, apesar do tratamento, o que possibilita uma reativação durante um período de imunossupressão (SOUSA et al., 1995; PEARSON; SOUSA, 1996; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; CHANTE, 2016).

Muitas vezes considerada LCL "metastática", a LM desenvolve-se como uma forma incomum da doença cutânea, depois de 1 a 2 anos, ou mais, após a cicatrização clínica das lesões primárias (Figura 5B). As manifestações precoces incluem sangramento e congestão nasal persistentes, e sintomas da faringe, como a rouquidão. A visualização revela edema e eritema que pode ulcerar e apresentar exsudato mucopurulento. Em última análise, LM leva à destruição mutilante de mucosas nasal, oral e faríngea. A literatura relata que pode desenvolver-se em cerca de 1% a 10% dos casos de LTA por *L. braziliensis*. O gênero masculino, tratamento incompleto, lesões cutâneas grandes e múltiplas, são alguns dos fatores de risco associados ao surgimento de LM (PEARSON & SOUSA, 1996; LESSA et al., 2012; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; CHANTE et al., 2016).

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) é uma forma rara e emergente de infecção causada, comumente, por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonenses*, que ocorre devido à disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito. Caracterizada por expressar múltiplas lesões pleomórficas, que variam de dez a centenas, sendo que inicialmente apresenta uma úlcera semelhante à LCL, progredindo com o aparecimento de várias pápulas polimórficas, que podem ter aspecto ulcerado, acneiforme, nodular, verrucoso e em placa, e que comprometem mais de um seguimento corpóreo, com predileção por áreas expostas, como membros, face e tronco (Figura 5C). A LCD é também caracterizada por apresentar uma alta taxa de envolvimento da mucosa e por

possuir características clínicas e imunológicas únicas (MACHADO *et al.*, 2011; JIRMANUS *et al.*, 2012; MEMBRIVEET *et al.*, 2017; ANVERSA *et al.*, 2018).

No Brasil, a LCD tem sido encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste (COSTA *et al.*, 1986; GALVÃO *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2016; MEMBRIVEET *et al.*, 2017), com isolamento das espécies *L. braziliensis* ou *L. amazonenses* de pacientes com LCD (TURETZ *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2006), *L. guyanensis/panamensis* na Colômbia e no Equador (VÉLEZ *et al.*, 2015; HASHIGUCHI *et al.*, 2016) e Guiana Francesa (COUPPIÉ *et al.*, 2004) e *Leishmania major* e *L. tropica* na Arábia Saudita e Iran (AL-QURASHI *et al.*, 2000; HAJJARAN *et al.*, 2013).

**Figura 5:** Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. **A** - Forma Cutânea Localizada. **B** - Forma Mucosa. **C** - Forma Cutânea Disseminada. **D** - Forma Difusa.



Fonte: Arquivo pessoal do Dr. Anastácio de Queiroz Sousa (A, B, C) e Dra. Aldina Barral (D).

Outra forma atípica de LTA é conhecida como leishmaniose cutânea difusa (LD), causada por *L. (L.) amazonensis*. Foi relatada primeiramente em 1946 por Silva, no Brasil, e Convite *et al.* (1993), na Venezuela (Figura 5D). A LD é caracterizada pela

presença de múltiplas lesões nodulares não ulceradas, fraca resposta de células T a antígenos de *Leishmania* e um grande número de amastigotas em macrófagos na lesão. LD é rara, com 1 ou 2 casos diagnosticados por ano e o número de lesões também pode atingir centenas (BARRAL *et al.*, 1995; SILVEIRA *et al.*, 2009).

### **1.5 Resposta imune na leishmaniose tegumentar americana**

Após a inoculação de *Leishmania*, o estabelecimento da resposta imune, na fase inicial, é de suma importância para determinar o curso da doença. Depois que o parasito é fagocitado, as células imunes inatas reagem produzindo citocinas e quimiocinas, que modelam o desenvolvimento da imunidade específica, montando assim uma resposta protetora ou prejudicial ao hospedeiro. Contudo, apesar de ser indispensável para o controle da infecção e estabelecimento de uma resposta de memória duradoura, conferindo proteção contra uma reinfecção, as células imunes específicas também podem participar da patogênese da leishmaniose, causando destruição tecidual ou induzindo recidiva da doença (SCOTT; NOVAIS, 2016; ROSSI; FASEL, 2018).

Por ser um parasito intracelular, o controle da infecção depende da resposta imune mediada por células. Após a inoculação do parasito na pele e subsequente captura por células apresentadoras de antígeno, elas migram para os linfonodos regionais, onde ocorrerá a apresentação do antígeno processado para os linfócitos T e B, com síntese de citocinas pro e antiinflamatórias e anticorpos. Dependendo do tipo de antígeno, das moléculas coestimulatórias envolvidas e das citocinas que estão no microambiente da apresentação do antígeno, ocorrerá a diferenciação de linfócitos Th0 em subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Treg e Th17, além da expansão de linfócitos T citotóxicos e de linfócitos B (Figura 6).

Dependendo da intensidade de expansão destas subpopulações, poderá resultar uma resposta com perfil de resistência, resposta imune do tipo 1 (Th1), com níveis elevados de citocinas próinflamatórias, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e TNF- $\alpha$ ; ou com perfil de susceptibilidade à infecção, resposta imune do tipo 2 (Th2), com predomínio de citocinas antiinflamatórias, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (LEOPOLDO *et al.*, 2006; SHARMA & SINGH, 2009; RODRIGUES, 2012; BRELAZ *et al.* 2012; ANVERSA *et al.*, 2018; ROSSI & FASEL, 2018).

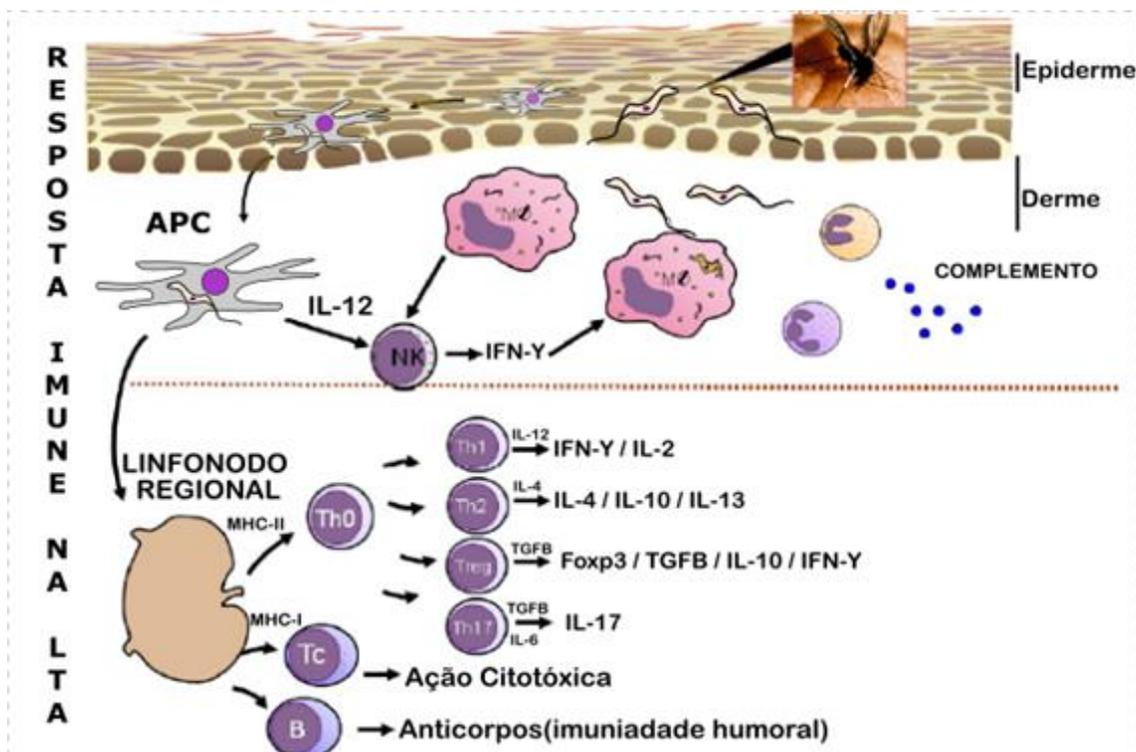
O desfecho clínico da LTA é oriundo da diferenciação das diversas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias), que guiam a patologia para tipos distintos de resposta imunológica e manifestações clínicas (FOWELL, 2009). A resposta imune do tipo 1, que é montada após a infecção, é constantemente acompanhada pela resposta de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>), que produzem IL-10 e TGF- $\beta$ , bloqueando a ativação excessiva de células Th1 e, por conseguinte, prevenindo danos aos tecidos (CAMPANELLI *et al.*, 2006; LEOPOLDO *et al.*, 2006; ANVERSA *et al.*, 2018).

As células T regulatórias (Tregs) reduzem a ativação, proliferação e produção de citocinas das células T efectoras, assim como, também, a apresentação de antígenos pelas células dendríticas. Este perfil imunorregulatório pode estar associado com uma menor eficácia da resposta imunológica contra os antígenos de *Leishmania* na LCD. As células Tregs correspondem a uma subpopulação de linfócitos T, que têm uma expressão aumentada das moléculas CD25<sup>+</sup> e do fator nuclear FOXP3 (SOJKA, 2008; JONULEIT, 2001; THORNTON, 1998). Campanelli *et al* (2006) e Rodrigues *et al.* (2013) detectaram células com fenótipo Treg em lesões de pacientes com LTA causada por *L. braziliensis*. A presença dessas células nas lesões foi responsável pelo controle da resposta inflamatória exacerbada em indivíduos com LCL.

A função imune supressora das células Tregs é mediada por um conjunto de diferentes mecanismos, como a inibição através do contato célula-célula, onde a supressão da célula-alvo ocorre devido a liberação de fatores de supressão, incluindo o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), citocinas supressivas como TGF- $\beta$ , citólise direta (Fas e granzima B) ou sinalização negativa através da molécula CTLA-4; a expressão e liberação de fatores de supressão solúveis, tais como citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 ou secreção de fatores supressivos pelas APC como adenosina; e da competição por fatores de crescimento, citocinas que sinalizam através de receptores da cadeia  $\gamma$  comum (IL-2, IL-4 e IL-7), que levaria a célula alvo a apoptose por privação destas citocinas. Outra importante característica das células T regulatórias inclui a sua dependência da interleucina 2, e a ausência de expressão de citocinas efectoras que estão associadas com outras linhagens de células Th, tais como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, e regulação diferenciada do seu metabolismo intracelular (SOJKA *et al.*, 2008; WILLIAMS:RUDENSKY, 2007).

Estudos recentes têm mostrado a importância das células Th17 na resposta imune contra a leishmaniose. Essas células, na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, diferenciam-se a partir dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens e irão produzir citocinas que atuam no processo inflamatório, como IL-21, IL-17 e IL-22. Ainda assim, uma vez que os estudos são duvidosos quanto à sua contribuição na resistência ou suscetibilidade à infecção, o papel específico desse tipo de células na leishmaniose ainda precisa ser elucidado (NASCIMENTO *et al.*, 2015; TERRAZAS, *et al.*, 2015; ANVERSA *et al.*, 2018).

**Figura 6:** Resposta imune na LTA.



Fonte: Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2012.

Na LTA existe uma produção simultânea das respostas Th1 e Th2, indivíduos com LCL formam uma resposta imune celular e humoral contra *Leishmania* (CONVIT *et al.* 1993; DE MOURA *et al.* 2005). Produção de IL-4 foi observada nas primeiras semanas da doença e a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8<sup>+</sup> está ligada a resolução mais rápida das lesões (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Desse modo, na fase ativa da LCL existe uma predominância de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, com produção tanto de citocinas de perfil Th1, quanto do tipo Th2 (COUTINHO *et al.*, 1998).

Na LM os pacientes apresentam forte resposta imune celular, concomitante a uma progressiva lesão tecidual. Nas lesões, há um intenso infiltrado inflamatório

abundante em linfócitos e plasmócitos, com poucos macrófagos, contendo escassos parasitos (CASTÉS:TAPIA, 1996; CONVIT *et al.*, 1993). Bacelar *et al.* (2002) compararam a resposta imunológica em pacientes com LCL e LM, e mostraram que a LM é caracterizada por uma produção aumentada de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e secreção diminuída de IL-10 em resposta aos antígenos de *Leishmania*. Além disso, as alterações são acompanhadas por uma diminuição na capacidade de IL-10 e TGF- $\beta$  modular esta resposta imunológica Th1 excessiva.

A observação de uma menor produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com LCD, associada à IDRM negativa em comparação com indivíduos com LCL, levantaram a hipótese de que a disseminação do parasito na LCD está fortemente associada a uma diminuição na resposta imune do tipo 1 (TURETZ *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2012; HASHIGUCHI *et al.*, 2016).

Pacientes com LCD desenvolvem doença da mucosa, que se apresenta simultaneamente com as manifestações cutâneas disseminadas. Machado *et al.* (2011) demonstraram que 44% dos pacientes com LCD apresentavam comprometimento da mucosa, e ao analisarem a produção de citocinas pelas PBMCs não encontraram diferença na produção de IFN- $\gamma$  entre pacientes com LCD com lesões de mucosa e pacientes que possuíam apenas a LCD, entretanto, a produção de TNF- $\alpha$  de pacientes com LCD com lesões de mucosas foi maior do que naqueles sem doença de mucosa (BACELLAR *et al.*, 2002; TURETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2011).

Apesar de que na LCD ocorrem respostas imunes Th1 e Th2, existe na verdade um predomínio da resposta Th2 sobre a Th1, no entanto, alguns estudos demonstraram que a produção de citocinas de perfil Th2 é similar aos níveis observados na LCL. Os níveis de IL-5 e IL-10 produzidos por PBMCs de pacientes com LCD e LCL são semelhantes, apesar de que os antígenos de *L. braziliensis* isolados de pacientes com LCD estimularem uma maior produção de IL-5 do que os antígenos isolados de pacientes com LCL. A baixa carga parasitária observada na LCD é devido a presença de células T específicas para o antígeno de *Leishmania* no local da lesão, esse fator também está relacionado ao perfil de citocinas *in situ* ser similar ao de LCL (TURETZ *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2011).

Na forma difusa ocorre uma falha na produção de uma resposta imune celular, isso ocorre através de uma falta da expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e a baixa expressão para IL-2, sendo assim, o indivíduo doente é incapaz de controlar a multiplicação parasitária e a progressão da doença. Além do que, são exibidos altos títulos de anticorpos específicos contra o parasito, assim como uma resposta quase particularmente do tipo Th2, apresentando elevados níveis de IL-4 (SHARMA *et al.*, 2009).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) é uma forma rara e emergente de infecção por leishmania, que inicia com uma lesão que ulcera e ocorre disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito. É caracterizada pela presença de 10 ou mais lesões cutâneas pleomórficas (papular, nodular, acneiforme, crostosa e ulcerada), acometendo dois ou mais segmentos anatômicos do corpo e com comprometimento de mucosa.

No Brasil, sua ocorrência está em expansão. No ano de 1986, sua frequência correspondia a 0,2% dos casos de infecção causadas por *L. braziliensis*, entretanto, no ano de 2000 esse número aumentou dez vezes atingindo 2%.

Sua patogênese é multifatorial e um dos fatores importantes parece ser uma imunossupressão, que ainda não está bem elucidada. Na literatura, os métodos utilizados para quantificação da expressão das citocinas tem sido diversificado, alguns avaliam a frequência de células com citocinas/área e isto pode ser um fator confundidor, porque a intensidade do infiltrado inflamatório varia muito nas amostras. Neste sentido, torna-se relevante avaliar a expressão das citocinas INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  envolvidas na lesão da pele dos pacientes com LCD, utilizando a quantificação de células que expressam a citocina, em relação ao total de células contabilizadas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Comparar a resposta imune na lesão de pacientes com LCD e LCL, levando em conta citocinas pro e antiinflamatórias.

#### **3.2 Objetivo específico**

- ✓ Determinar a frequência relativa de células que expressam IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  em pacientes com LCD e com LCL;

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Foi conduzido um estudo caso-controle. O grupo caso foi composto por indivíduos com LCD e o grupo controle com LCL, todos provenientes da região do maciço de Baturité-Ceará, Brasil.

### **4.2 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido através da Plataforma Brasil para registro da pesquisa e apreciação ética. Foi aprovado sob o número 1.552.232 e CAAE 53919816.2.0000.5054.

### **4.3 Local de estudo**

O estudo foi realizado no Ambulatório de Leishmaniose de Baturité, que funcionou com atendimento semanal, no Centro de Especialidade de Atenção à Saúde, Baturité-CE, no período de novembro de 2013 a outubro de 2016.

Os pacientes com leishmaniose as biopsias de pele foram processadas no Laboratório Multiusuário de Patologia (LAMP) do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### **4.4 Seleção das amostras**

Neste estudo, foram incluídos todos os indivíduos portadores de LCD (casos), atendidos no período de novembro de 2013 a outubro de 2016. Para cada caso foram selecionados pacientes com LCL.

#### **4.4.1 Critérios de inclusão**

- Ter diagnóstico de Leishmaniose Cutânea, confirmado por dois dos três métodos aplicados: Intradermorreação de Montenegro (positiva), Imunohistoquímica (com presença de *Leishmania*) ou diagnóstico clínico-epidemiológico;
- Não ter realizado tratamento prévio;
- Ter idade igual ou superior a 18 anos;
- Ter biopsia com material representativo.

#### **4.4.2 Critérios de exclusão**

- Ser portador de Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida;

- Estar fazendo tratamento com drogas imunossupressoras ou quimioterápicos;
- Ter história de doença hepática, cardíaca ou renal;
- Mulheres grávidas ou em fase de aleitamento;

#### 4.5 Imunohistoquímica para as citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ e IL-10

Os blocos de parafina, contendo os fragmentos de pele, foram cortados em micrótomo, na espessura de 4  $\mu$ m e montados em lâminas silanizadas. Depois foram colocadas em suporte vertical para lâminas e incubadas na estufa, com temperatura estabilizada a 60°C, durante uma hora, para promover maior aderência dos tecidos à lâmina.

##### 4.5.1 Recuperação antigênica

A técnica foi executada de acordo com as orientações do fabricante *Dako*<sup>®</sup>. Para a citocina IL-10 (*Dako*<sup>®</sup>) foi utilizado o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution, High Ph*, código de referência K8000 (*Dako*<sup>®</sup>), diluído a 1:50. Para TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  (*Dako*<sup>®</sup>) utilizou-se o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution, Low Ph*, código de referência K8002 - *Dako*<sup>®</sup>, diluição 1:50. As lâminas foram colocadas com tampão no tanque de módulo pré-tratamento do equipamento *Dako*<sup>®</sup> *PT Link* (Figura 7). Foram incubadas a 65°C durante trinta minutos, depois a 97°C por trinta minutos. A seguir, o sistema foi novamente resfriado até 65°C.

**Figura 7:** Aparelho *PT Link* - A foto **A** ilustra o aparelho *Dako*<sup>®</sup> *PT Link*, interligado ao computador, onde é realizada a recuperação antigênica com temperatura monitorizada e controlada automaticamente. A foto **B** mostra o aparelho aberto, onde é possível visualizar os 2 tanques de módulo pré-tratamento independentes, com capacidade de 24 lâminas por tanque.

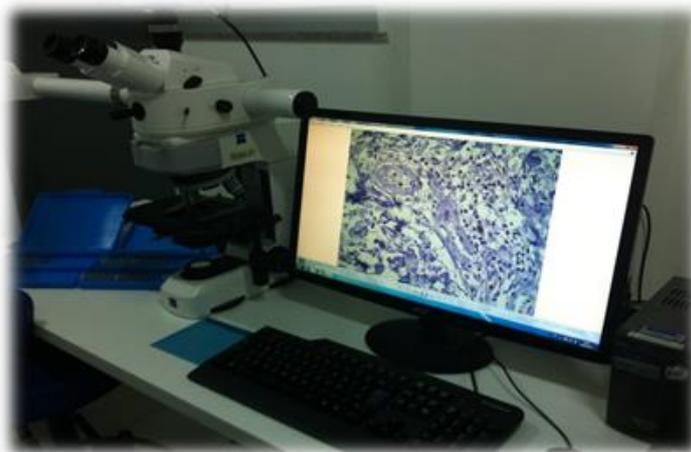


Fonte: Arquivo pessoal de Kélvia Miranda Sá.

#### 4.5.2 Marcação por Imuno-histoquímica

As lâminas foram retiradas dos tanques e colocadas em um borrel contendo tampão de lavagem. Em seguida, foi realizada 3 lavagens de 3 minutos cada. Para a lavagem utilizou-se o tampão do kit (*Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*<sup>®</sup>), na diluição de 1:20. Os cortes histológicos foram demarcados, com caneta hidrofóbica (*Dako*<sup>®</sup> *Pen* – referência S2002). Em seguida, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena, utilizando *EnVision<sup>TM</sup> Flex Peroxidase-Blocking* *Dako*<sup>®</sup>, por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão e adicionado os anticorpos primários nas concentrações: IL-10 (0,5 µg/ml), TGF-β, (0,250 µg/ml), IFN-γ (0,250 µg/ml). As lâminas foram incubadas por um pernoite a 4°C, em câmara úmida. Depois, foram realizadas três lavagens, com o tampão de lavagem. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o polímero livre de biotina *EnVision<sup>TM</sup> Flex/HRP* *Dako*<sup>®</sup> por 30 minutos à temperatura ambiente; foram realizadas três lavagens, e logo após, foi feita a incubação do cromógeno *Dako*<sup>®</sup> DAB, por 5 minutos e posterior lavagem das lâminas em água corrente. Por fim, foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Meyer e montagens das lâminas, através da fixação das lamínulas, utilizando Bálsamo do Canadá.

**Figura 8:** Microscópio AXIO Scope A1 Zeiss<sup>®</sup>.



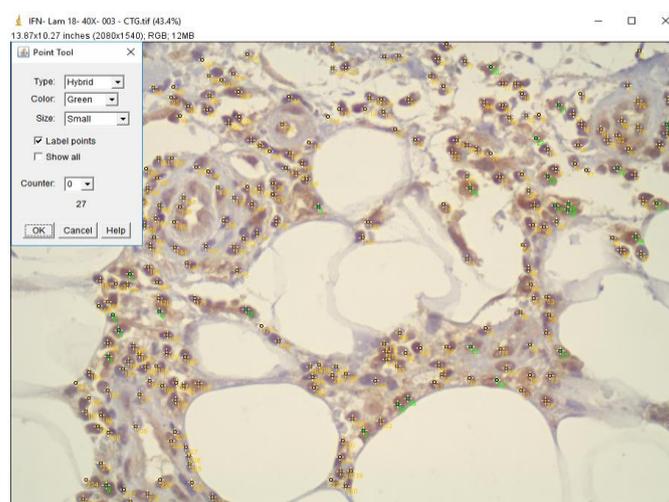
Fonte: Dados do autor.

#### 4.6 Análise Morfométrica

Foram capturadas imagens das microseções coradas por Imunohistoquímica em microscópio óptico AXIO Scope A1 Zeiss® acoplado à câmera digital, no aumento de 400X (Figura 8).

A expressão das citocinas foi determinada utilizando o programa Image J (NIH). Foi realizada manualmente a contagem das células marcadas para citocina e as não marcadas, em 10 capturas da derme com aumento de 400X. Depois foi calculada a frequência relativa, expressa em percentual (Figura 9).

**Figura 9:** Ilustração do campo de contagem do programa Image J (NIH).



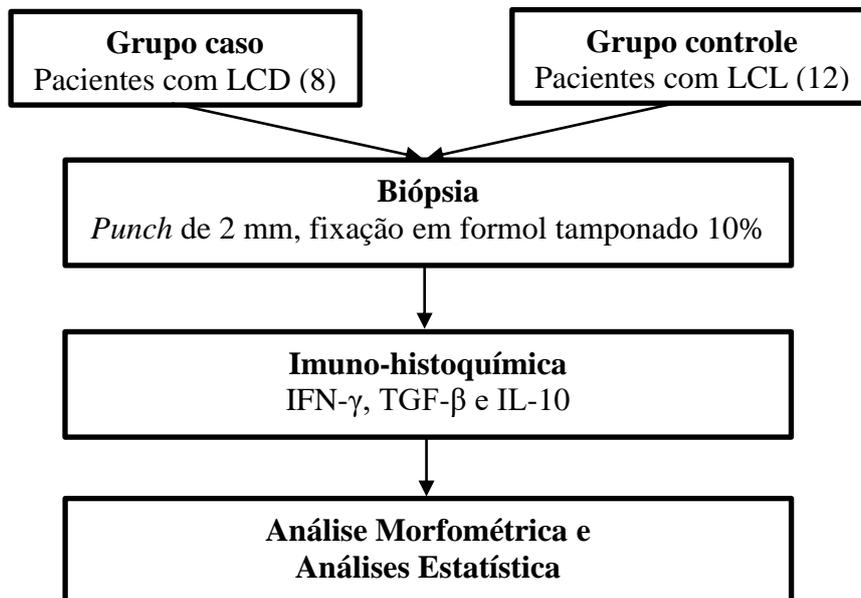
Fonte: Dados do autor.

#### 4.7 Análise Estatística dos dados

A análise exploratória dos dados foi realizada através de frequências das variáveis demográficas e clínicas relacionadas. Na análise dos dados morfométricos foi aplicado o Teste Mann-Whitney utilizando o software GraphPad Prism version 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A significância mínima foi aceita quando  $p < 0,05$ .

#### 4.8 Desenho experimental do estudo

**Figura 10:** Fluxograma de métodos.

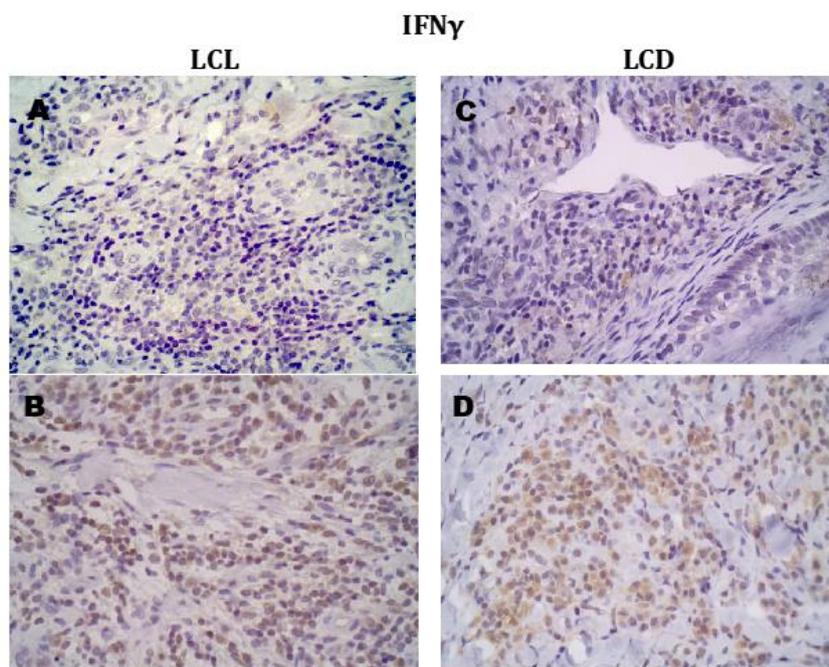


## 5. RESULTADOS

Foram incluídos 8 indivíduos de LCD (Casos) e 12 de LCL (Controles). Entre os casos foi observado 1 (12,5%) indivíduo do sexo feminino e 7 (87,5%) do sexo masculino; entre os controles todos os 12 (100%) eram do sexo masculino. Quanto ao local de residência, os participantes do estudo foram distribuídos de acordo com seu município de origem, no maciço de Baturité, sendo a grande maioria deles proveniente das cidades de Mulungu (35,42%), Baturité (18,75%), Aratuba (16,67%) e Pacoti (8,3%).

A reação de imunohistoquímica para IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  foi realizada em 20 amostras, sendo 12 de LCL e 8 de LCD, mas ao ser feita a análise foi observada a presença de “background” alto em uma das amostras para IL-10 e TGF- $\beta$ , diminuindo uma amostra para IL-10 e uma para TGF- $\beta$ . Foi considerada como evidência de positividade a marcação citoplasmática que se apresentava na coloração marrom (Figura 11).

**Figura 11:** Expressão de IFN- $\gamma$  por IHQ, em cortes histológicos de lesões de pacientes com LCL: A e B; LCD: C e D. Aumento de 400X.

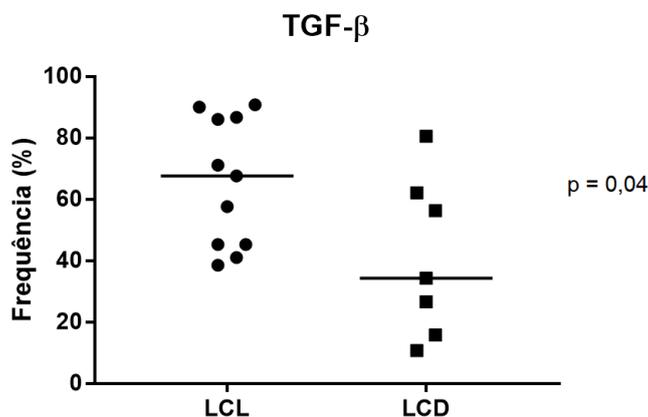


Fonte: Autor.

A expressão relativa de IFN- $\gamma$  foi semelhante nos dois grupos, LCD com mediana de 4,6% (Min – 0,1; Max – 36,5) e no LCL a mediana foi de 2,0% (Min – 0,0;

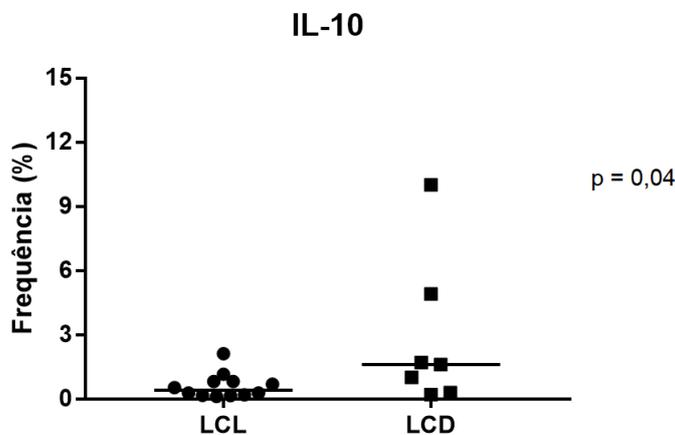


**Gráfico 2** – Determinação da frequência relativa (%) da imunoposição de TGF- $\beta$  no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LCL (n= 11) e LCD (n= 7).



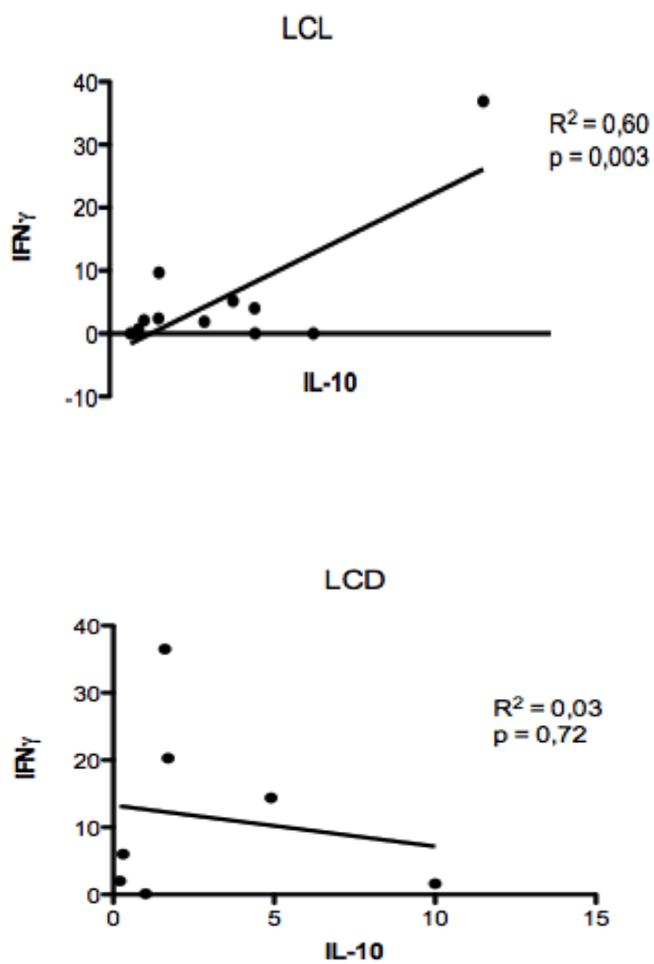
Já em relação à IL-10, nas lesões do grupo LCD (MD – 1,6%; Min –0,2; Max – 10,0) sua expressão foi significativamente maior que nas do LCL (MD – 0,4%; Min – 0,1; Max – 2,1), p= 0,04 (Gráfico 3).

**Gráfico 3** – Determinação da frequência relativa (%) da imunoposição de IL-10 no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LCL (n= 12) e LCD (n= 7).



Foi observado uma correlação linear positiva, estatisticamente significativa entre a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 ( $R^2 = 0,60$ ; p= 0,003) nas lesões dos pacientes com LCL, enquanto nas dos LCD não houve correlação significativa, verificando-se uma tendência a uma correlação negativa entre a expressão destas duas citocinas (Gráfico 4).

**Gráfico 4** – Correlação linear entre a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 na lesão de pacientes com LCD (n=8) e LCL (n=12)



## 6. DISCUSSÃO

A Leishmaniose Cutânea Disseminada é uma forma grave, rara e emergente de infecção causada, comumente, por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonenses*, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões pleomórficas, comprometendo várias partes do corpo. É uma doença emergente, que no Brasil é mais comumente relatada na região Nordeste, com predomínio no estado da Bahia (TURETZ *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006). A LCD também foi relatada no Maranhão (GALVÃO *et al.*, 1993), Ceará (SOUSA *et al.*, 2006) e Minas Gerais (OGAWA *et al.*, 2006). Na América, há relatos na Guiana Francesa (COUPPIÉ *et al.*, 2004), Equador (CALVOPINA *et al.*, 2005; HASHIGUCHI *et al.*, 2016) e Colômbia (RINCÓN *et al.*, 2009; VÉLEZ *et al.*, 2015).

O papel fundamental da patogênese da leishmaniose tegumentar é desempenhado pela resposta imune do hospedeiro. Nas formas clínicas LCL e LM, os danos teciduais estão relacionados a uma resposta imune exagerada tipo 1, já em pacientes com LD observa-se uma ausência de resposta imune mediada por células, que permite a multiplicação e disseminação de parasitos. Pacientes com LCD apresentam cerca de cem lesões ou mais e ainda assim apresentam menor produção de citocinas próinflamatórias, em comparação com as outras formas dessa infecção (TURETZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2011).

Tem sido sugerido que uma diminuição na produção periférica de citocinas próinflamatórias pode favorecer a disseminação das lesões em LCD (TURETZ *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2011). No presente estudo foi realizada uma comparação da resposta imune *in situ* entre pacientes com LCL (controle) e LCD (casos), através da realização de imunohistoquímica, para avaliar a frequência da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10, em biópsia da lesão.

Identificado originalmente como um agente com atividade antiviral, o IFN- $\gamma$  já foi caracterizado como uma glicoproteína com funções imunológicas pleiotrópicas. O IFN- $\gamma$  é secretado principalmente por células T ativadas e células *natural killer*, medeia a imunidade antiviral e antibacteriana, promove a ativação de macrófagos, melhora a apresentação de antígenos, participa da ativação do sistema imune inato, da interação linfócito-endotélio, regula Th1 / Th2 que equilibram e controlam a proliferação celular e a apoptose (TAU & ROTHMAN, 1999). Na infecção por *Leishmania* o IFN- $\gamma$ , uma das

principais citocinas Th1, desempenha um papel essencial no controle da infecção, pois permeia a morte de parasitas intracelulares por macrófagos. Estudos realizados em amostras de biópsias de lesões ativas na LCL, em seres humanos, detectaram níveis elevados de IFN- $\gamma$  ou de seu mRNA, enquanto a cicatrização espontânea de lesões tem sido associada a altos níveis de produção de IFN- $\gamma$  (CARVALHO, *et al.*, 1995; BOURREAU, *et al.*, 2001; DE SOUZA-NETO, *et al.*, 2004).

Em estudo realizado com PBMCs de pacientes com LCL e LCD demonstrou-se que pacientes com LCD apresentavam menor produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  do que os com LCL, após estimulação antigênica. Enquanto isso, a expressão de IL-5 e IL-10 nos dois grupos de indivíduos apresentaram produção similar (LEOPOLDO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2011). No presente estudo, a expressão *in situ* de IFN- $\gamma$  não mostrou significância entre os grupos, apesar de que no grupo com LCL a porcentagem foi menor (2,0%) do que a do grupo com LCD, que apresentou 4,6% de frequência.

A baixa produção de IFN- $\gamma$ , em humanos, tem sido associada à disseminação dos parasitos, como o que acontece na LD, onde IL-10 age regulando de forma negativa a produção de IFN- $\gamma$ , desempenhando, também, um papel nos diversos aspectos clínicos encontrados nas lesões, que são observadas nessas duas formas clínicas causadas por *L. braziliensis*. IFN- $\gamma$  e IL-10, portanto, são citocinas que podem exercer papéis cruciais no mecanismo de defesa contra *Leishmania* (BOMFIM *et al.*, 1996; MACHADO *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006).

A IL-10 é uma citocina com potentes propriedades antiinflamatórias, que desempenha um papel central na limitação da resposta imune do hospedeiro a patógenos, responsável por prevenir danos ao hospedeiro e manter a homeostase normal do tecido (SABAT, *et al.*, 2010; IYER; CHENG, 2012). *In vivo*, as principais fontes de IL-10 incluem células T auxiliares, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Além disso, os tipos efetores não imunes, como as células epiteliais e os queratinócitos, também são capazes de produzir IL-10 em resposta à infecção ou dano tecidual, bem como às células tumorais (JUNG, *et al.*, 2004; OUYANG, *et al.*, 2011; IYER; CHENG, 2012).

Em suma a IL-10 desempenha um papel amplamente não redundante na mediação da resposta anti-inflamatória do hospedeiro. A desregulação da expressão e da IL-10 está associada à imunopatologia aumentada em resposta à infecção, bem como ao

aumento do risco de desenvolvimento de muitas doenças autoimunes (SELLON, R. K. *et al.*, 1998; EJRNAES, 2006; IYER; CHENG, 2012). A produção excessiva ou confusa de IL-10 pode inibir a resposta pró-inflamatória ao *Plasmodium* spp.; *Leishmania* spp.; *T. cruzi*; *Mycobacterium* spp. e vírus da coriomeningite linfocítica na medida em que os patógenos escapam do controle imunológico, resultando em infecções fulminantes, não curativas crônicas ou rapidamente fatais (MURPHY, *et al.* 2001; ANDERSON, *et al.*, 2005; WU, *et al.*, 2007; COUPER, *et al.*, 2008).

Apesar da pouca expressão de IL-10, no estudo, observou-se significância ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de estudo, com maior produção no grupo com LCD (mediana 1,6) do que no grupo com LCL (mediana 0,4). Em um estudo anterior com PBMCs os níveis de produção de IL-10 de pacientes com LCL e LCD foram semelhantemente baixos em resposta a antígenos de *L. braziliensis* isolados de cada grupo, sendo que mais de 50% das culturas de PBMCs dos pacientes com LCL e LCD apresentaram níveis indetectáveis de IL-10 (LEOPOLDO *et al.*, 2006).

Na LCL, estudos anteriores demonstram que a alta produção de IL-10 está associada a uma baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), visto que IL-10 é conhecida por ter propriedades anti-inflamatórias e é necessária para controlar a exacerbada resposta inflamatória que pode seguir a uma resposta imune tecidual. Na leishmaniose visceral humana a IL-10 desempenha um papel fundamental na regulação negativa da produção de IFN- $\gamma$  (O'GARRA *et al.*, 2004; GAUTAM *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Oliveira *et al.* (2014) concluíram que na leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são as principais citocinas envolvidas no dano tecidual, observadas nesta doença, e que IL-10 pode ter um papel imunomodulador da resposta inflamatória.

O TGF- $\beta$ , um polipeptídeo pleiotrópico, regula múltiplos processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, regulação imunológica, diferenciação de células-tronco adultas, cicatrização de feridas e inflamação (O'KANE; FERGUSON, 1997; LETTERIO; ROBERTS, 1998; HINCK, 2012). TGF- $\beta$  é uma citocina que apresenta capacidade para regular a resposta imune inflamatória, através da supressão e diferenciação de células efectoras CD4<sup>+</sup>, induzindo a transformação de células T virgens em células Treg, inibindo a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, e anulando a atividade de

macrófagos, células dendríticas e células *Natural killer* (YOSHIMURA, *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

No presente estudo, a expressão de TGF- $\beta$  foi significativa ( $p=0,04$ ), sendo que a maior frequência de expressão foi observada no grupo com LCL com mediana de 67,6 e no grupo com LCD a mediana foi de 34,3. Em uma situação em que há uma diminuição na expressão de receptores de TGF- $\beta$  o efeito inibitório de TGF- $\beta$  em células Th1 é mínimo em células T ativadas, sendo essa expressão dependente de IL-10. Machado *et al.* (2011) não encontraram diferenças em relação à expressão de TGF- $\beta$  *in situ* entre os grupos LCL e LCD, mas observaram que uma expressão mais elevada, mesmo que não significativa, na LCD de pacientes com lesão ulcerada.

Estudo comprovamos papéis pró-inflamatórios do TGF- $\beta$  nas respostas inflamatórias. O TGF- $\beta$  induz células T regulatórias positivas para FOXP3, enquanto na presença de IL-6, induz células Th17 produtoras de IL-17 patogênicas. O TGF- $\beta$  inibe a proliferação de células T, assim como a produção de citocinas através de mecanismos independentes e dependentes de FOXP3 (YOSHIMURA; MUTO, 2011). Oliveira *et al.* (2014) sugerem que TGF- $\beta$  pode agir modulando a produção de IL-17 em células de pacientes com LC. Como as células desses pacientes foram previamente ativadas e reestimuladas *in vitro* por antígenos de *Leishmania*, TGF- $\beta$  pode ter uma função mais imunomodulatória do que indutora de IL-17.

## 7. CONCLUSÃO

- Nas lesões de pele de paciente com LCD e LCL, a produção de IFN- $\gamma$  ocorre de forma semelhante;
- Existe uma correlação linear positiva, estatisticamente significativa, entre a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10, nas lesões dos pacientes com LCL;
- Nas lesões dos pacientes com LCD, a secreção de IL-10 foi estatisticamente significativa maior que nas lesões do grupo LCD;
- Nas lesões de pacientes com LCD, a imunossupressão pode ser mediada por IL-10.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLATIF, M. Z. M. ; EL-MABROUK, K.; EWIS, A. A. An Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Al-Jabal Al-Gharbi, Libya. *Kore. Soci. for Parasit. and Trop. Med.* v. 51, n. 1, p. 75-84, 2013

ALMEIDA, M. C. *et al.* Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 2003, vol.98, n.7, pp.861-870.

AL-QURASHI, Abdul Rahman *et al.* Dissemination in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in different ethnic groups in Saudi Arabia. **International Journal of Dermatology**. 2000, 39, 832-836.

ALVES, C.F. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. *PLOS ONE*. 2013, 8(5): e63343. doi:10.1371/journal.pone.0063343.

ANDERSON, C. F. *et al.* Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **J. Immunol.** 2005. **174**: 2934-2941.

ANDRADE-NARVAEZ, F. J. *et al.* Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2016 Oct;111(10):599-604.

ANVERSA, Laís *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.64 no.3 São Paulo Mar. 2018.

BACELLAR, Olívia *et al.* Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infect Immun.** 70(12):6734-40. 2002.

BESTEIRO, Sébastien. *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int J Parasitol.** 2007 Aug; 37(10): 1063–1075.

BOMFIM, Glória *et al.* Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol.** 1996; 84:188–94.

BOURREAU, E. *et al.* High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **J Infect Dis.** 2001; 184:1628–30.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL, 2016. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). {Acesso em 18 de janeiro de 2016}. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.

BRELAZ, M. C. A. *et al.* Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite immunology.** v. 34, n. 4, p. 236-239, 2012.

BRILHANTE, Andreia Fernandes. *et al.* Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia. *Rev Inst Med Trop, São Paulo.* 2017; 59:e12.

CALVOPINA M, *et al.* Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid and recidiva cutis due to *Leishmania* (V.) panamansis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 73:281-4, 2005.

CAMPANELLI, A. P. *et al.* CD4+ CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *The Journal of infectious diseases.* v. 193, n. 9, p. 1313-1322, 2006.

CARVALHO, E. M. *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** 1995; 53:273–7.

CASTÉS, M.; TAPIA, F. J. Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis. *Acta Cient Venez.* 1998;49(1):42-56.

CECÍLIO, P. *et al.* Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Front. in Immun.** v. 5, n. 484.0, p. 1-16, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>.

CHANTE, Karimkhani. *et al.* Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet Infect Dis,** 2016; 16: 584–91.

CONVIT, J. *et al.* The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1993; 87(4):444-8.

COUPER, Kevin N. *et al.* IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **J Immunol.** May 1, 2008, 180 (9) 5771-5777.

COSTA, J. M. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **The Journal of tropical medicine and hygiene,** v. 89, n. 6, p. 319-323, 1986.

COUPPIE, P. *et al.* Disseminated Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania Guyanensis*: Case of a Patient with 425 Lesions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71(5), 2004, pp. 558–560.

DE MOURA, T. R. *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity.** v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

DE SOUZA-NETO, S. M. *et al.* *Leishmania braziliensis*: Partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2004; 99:289–94.

EJRNAES, M. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. **J Exp Med.** 2006; 203:2461–72.

- FOWELL, D. J. Signals for the execution of Th2 effector function. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 1-6, 2009.
- GAUTAM, Shalini *et al.* IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 2011; 204:1134–7.
- GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1):71-80, jan-fev, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- HAJJARAN, H. *et al.* Unusual presentation of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: Case reports of four Iranian patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.** 2013, 333-336.
- HASHIGUCHI, Yoshihisa *et al.* Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health.** (2016) 44:2.
- HINCK, Andrew P. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors – insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. **FEBS Letters.** 586 (2012) 1860–1870.
- IYER, Shankar S.; CHENG, Genhong. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Crit Rev Immunol.** 2012; 32(1): 23–63.
- JONULEIT H, *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated. **J Exp Med.** 2001 Jun 4;193(11):1285-94.
- JUNG, M. *et al.* Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. **Eur J Immunol.** 2004 Feb; 34(2):481–93.
- KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology** 9, 604-615 (August 2011) doi:10.1038/nrmicro2608.
- KEVRIC I; CAPPEL M. A.; KEELING J. H. New World e Old World *Leishmania* Infections: uma revisão prática. **Dermatol Clin.** 2015; 33: 579-93.
- KORN, Thomas *et al.* IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol.** 2009; 27:485–517.
- LEOPOLDO, Paulo TG. *et al.* Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on *in vitro* cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, 6:75, 2006.
- LESSA, H. A. *et al.* A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 6, p. 376-381, 2012.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annu. Rev. Immunol.** 16 (1998), pp. 137-161

LIMA, J. W. O. 1995. Domestic Transmission of Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. Tese de Doutorado Doutorado em Doctor of Science Tropical Public Health. Harvard University, Harvard, Estados Unidos.

MACHADO, Paulo R. *et al.* Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clin Infect Dis.** 2002; 34:E69-73.

MACHADO, Paulo R. *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2011 Ago; 105 (8): 438-44.

MARQUES, Fernanda A. *et al.* Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasitology International** 66 (2017) 884–888.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 27, n. supl 1, p. 91, 1994.

MEMBRIVE, Norberto A. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 2017; 59:e37.

MURPHY, M. L. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol.** 2001, 31: 2848-2856.

NASCIMENTO, M. S. *et al.* Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **J Infect Dis.** 2015;211(6):1015-26.

OGAWA, M. M. *et al.* Disseminated cutaneous Leishmaniasis, an emerging form of cutaneous leishmaniasis: report of two cases. **International Journal of Dermatology.** 45:869-71, 2006.

O'KANE, S.; FERGUSON, M. W. J. Transforming growth factor  $\beta$ s and wound healing. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology.** Volume 29, Issue 1, January 1997, Pages 63-78.

OLIVEIRA, Walker Nonato *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine.** 66(2):127-32. 2014.

OUYANG, W. *et al.* Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu Rev Immunol.** 2011 Apr 23; 29:71–109.

PACE, D. Leishmaniasis. **Jour. of Infect.**, v. 69, p. 10-18, 2014.

PAHO. Pan-American Health Organization. Leishmaniasis: epidemiological reports in the Americas. Leishmaniasis Report n.5; 2017. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34112>. Acessado em 20/05/2017.

PEARSON, Richard D.; DE QUEIROZ SOUSA, Anastacio. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, p. 1-11, 1996.

QUEIROZ, Adriano *et al.* Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Vannia) braziliensis* Strain Polymorphisms. **J Clin Microbiol.** 50 (12): 4028-4034. 2012.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** 2007 Sep;7(9):581-96.

RINCÓN MY, *et al.* A report of two cases of disseminated cutaneous leishmaniasis in Santander, Colombia. **Revista de salud pública.** (Bogotá, Colômbia) 11(1):145-50, 2009.

ROCHA, T.S.M.; BARBOSA, A.C.A, SANTANA, E.P.C.; CALHEIROS, C.M.L. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**, v.6, n.4, p.49-54, 2015.

RODRIGUES, FMD. Avaliação imunopatológica do sitio de lesão de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *Leishmania (Viannia) sp*, no Estado do Maranhão, Brasil. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ROSSI, Matteo; FASEL Nicolas. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. **International Immunology.** Volume 30, Issue 3, 10 March 2018, Pages 103–111.

SABAT, R. *et al.* Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2010 Oct; 21(5):331–44.

SCOTT, Phillip ; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology.** Volume 16, pages 581–592 (2016).

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde do Brasil, 2016. [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Coef\\_Deteco.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Coef_Deteco.pdf).

SELLON, R. K. *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun.** 1998 Nov; 66(11):5224–31.

SHARMA, U. And SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, p. 412-423, 2009.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology.** v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

SIMÕES MATTOS, L. *et al.* Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza (Ceara, Brasil). **Ciência Animal**, v. 11, p. 79-81, 2001.

SIMÕES MATTOS, L. *et al.* Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown?. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p. 79-87, 2004.

SIMÕES MATTOS, L. *et al.* The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Estados Unidos, v. 127, n.3, p. 199-208, 2005.

SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression—a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13-22, 2008.

SOUSA, Anastácio de Queiroz *et al.* Bubonic Leishmaniasis: A common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n.4, p. 380-385, 1995.

SOUSA, Anastácio de Queiroz *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. **Braz J Infect Dis**, 2006 Jun;10(3):230.

TAU, G.; ROTHMAN, P. Biologic functions of the IFN- $\gamma$  receptors. **Allergy**. 1999 December; 54(12): 1233–1251.

TERRAZAS, C. *et al.* IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **FASEB J**. 2016;30(3):1135-43.

TIRELLI, Fernanda; VERNAL, Sebastian; ROSELINO, Ana Maria. Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross-sectional study. **An Bras Dermatol**. 2017; 92(5):642-8.

THORNTON A. M., SHEVACH EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188(2):287-96.

Torres-Guerrero, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017 May, 26; 6:750.

TURETZ, M. L. *et al.* Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2002.

VÉLEZ, I. D. *et al.* Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia- Report of 27 Cases. **Case Rep Dermatol**. 2015; 7:275–286.

WHO. World Health Organization. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis (2013).Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis\\_Burden\\_distribution\\_VL\\_CL\\_2013.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1)>. Acesso em 21/11/2016.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em: 20/05/2017.

WILLIAMS, L. M.; RUDENSKY, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nature immunology**, v. 8, n. 3, p. 277-284, 2007.

WU, Y. *et al.* *Plasmodium yoelii*: distinct CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. **Exp. Parasitol**. 2007. **115**: 301-304.

YOSHIMURA, Akihiko *et al.* Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. **J Biochem.** 2010; 147:781-9

YOSHIMURA, A.; MUTO, G. TGF- $\beta$  Function in Immune Suppression. **Curr Top Microbiol Immunol.** 2011; 350:127-47.