

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia e Medicina Legal

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA
LINFADENOPATIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL**

Francisca Janaína Soares Rocha

TESE
616.9364
R573a

Fortaleza
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Ac. 28649

C410470
R 907545
02/12/98

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia e Medicina Legal

Análise Histopatológica e Imunohistoquímica da Linfadenopatia em Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Ceará, Brasil

Francisca Janaína Soares Rocha

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos

Co-Orientadora:

Margarida Maria Lima Pompeu

D
616.9364
R 573a
1998
ex. 2

Fortaleza
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DA LINFADENOPATIA EM
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO
CEARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre

Data da Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos
(Orientador)

Prof. Dra Aldina M. Prado Barral

Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho

Dedicado

À minha co-orientadora, mestra e amiga *Margarida Maria de Lima Pompeu* pelo entusiasmo, exemplar orientação e indiscutível paixão em tudo o que faz.

Ao meu orientador, *Dr Antônio Wilson Vasconcelos* pela acolhida, dedicação valiosa e participação efetiva na transmissão de conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

A minha família (Marta, Lina, Lidiany, Lucas e Ribamar), que me deu apoio, incentivo e condições para que eu ingressasse e crescesse dentro da universidade, tornando possível a realização deste sonho.

A José Alencar de Sousa Filho, por todo este amor que jamais ficará oculto dentro de mim porque você é luz e como tal me iluminará onde quer que eu esteja.

Ao Dr Anastácio Queiroz de Sousa, por ter fornecido o material de estudo despertando-nos o interesse em conhecer mais a fundo a LTA no Estado do Ceará.

Ao Dr Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, por ter permitido generosamente meu acesso ao Laboratório de Patologia e Biologia Celular da FIOCRUZ-BA e ter fornecido todo o material necessário para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

A Dra Tânia Maria Corrêia da Silva do Laboratório de Patologia e Biologia Celular da FIOCRUZ-BA, por ter me aceito como orientanda e ter dedicado carinhosamente parte de seu tempo em minha capacitação técnica, pelas valiosas informações transmitidas e sua amizade.

Ao Dr Eilson Goes de Oliveira, pela excelente colaboração na análise estatística e pelas valiosas sugestões que possibilitaram o aprimoramento deste trabalho.

Ao Dr Dary Alves Oliveira, pelo convite e disposição em tornar possível a ilustração deste trabalho, através de lindas fotos tiradas no laboratório Procito.

A professora Dra Izabel de Alencar Barros Vasconcelos ("minha madrinha"), pelas palavras carinhosas de incentivo, fornecimento de trabalhos científicos e colaboração acadêmica inigualável na disciplina de Parasitologia, sem a qual eu jamais conseguiria chegar até aqui.

Ao professor Haroldo Sérgio da Silva Bezerra, meu colega de trabalho, pela compreensão e colaboração fornecida à disciplina de Parasitologia nos meus momentos de ausência.

A amiga Paula de Paz Palácio, pela participação direta e efetiva em todas as etapas vivenciadas no mestrado, através do qual tive a oportunidade e felicidade de criar novos laços de amizade.

Ao amigo Thomás Carlos de Lima Pompeu, pela disposição e valiosa colaboração no trabalho de revisão gramatical.

A sra Norma de Carvalho Linhares, diretora da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, pelo excelente trabalho de revisão bibliográfica.

Aos funcionários da secretaria do DPML-UFC (Socorro Aragão, Rilson, Marlene, Socorrinha, Marli), pelo carinho, estímulo e inúmeras colaborações que me permitiram vencer mais esta etapa de minha vida acadêmica.

Aos funcionários do NMT-UFC (Jânia, Gabriela, Joseval, Francileide, Adriana, Tatiana, Socorro, Lucineide, Herivaldo), pelo convívio harmonioso, colaboração e amizade.

A todos os funcionários da FIOCRUZ-BA, pela receptividade, presteza e colaboração efetiva na execução deste trabalho, em especial a funcionária Cristina Vasconcelos Santos do Laboratório de Histologia pelos belos cortes e coloração do material de estudo.

Aos meus amigos do mestrado que assim como eu aprenderam muito, transmitiram seus conhecimentos, sofreram algumas vezes, se divertiram em muitas outras, tornando aquele período de nossas vidas único e inesquecível.

*“Felicidade não é utopia; Ela existe não como um prêmio mas como uma conquista,
não é um lugar onde chegamos mas uma maneira de viajar”*

Rock Schneider

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Considerações gerais	12
1.1.1 Taxonomia	12
1.1.2 Ciclo biológico	15
1.2 Manifestações clínicas	16
1.3 Histopatologia	19
1.3.1 Leishmaniose cutânea	19
1.3.2 Leishmaniose cutâneo-mucosa	20
1.3.3 Leishmaniose cutânea difusa	21
1.3.4 Linfadenopatia leishmaniótica: leishmaniose bubônica	21
1.3.5 Classificações histológicas da LTA	22
1.4 Papel do linfonodo	23
1.5 Resposta imune na leishmaniose	26
1.6 Patogênese da LTA	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Geral	34
2.2 Específicos	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Critérios para seleção de pacientes	35
3.2 Estudo histopatológico	35
3.3 Estudo imunohistoquímico	35
3.4 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Dados clínicos	39
4.2 Análise histológica	40
4.3 Análise imunohistoquímica	49
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	51
6 CONCLUSÕES	57
7 ANEXOS	58
8 SUMMARY	60
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e laboratoriais de 26 pacientes com linfadenopatia leishmaniótica-----	39
Tabela 2. Tipos de morte celular na linfadenopatia leishmaniótica-----	42
Tabela 3. Evolução dos tipos de morte celular na linfadenopatia leishmaniótica-----	43
Tabela 4. Frequência de histiocitose sinusal na linfadenopatia leishmaniótica-----	44
Tabela 5. Frequência das células inflamatórias nos dois períodos de tempo analisados na linfadenopatia leishmaniótica-----	44
Tabela 6. Evolução da linfadenite na leishmaniose cutânea-----	45
Tabela 7. Linfadenopatia leishmaniótica: ocorrência e tipos de hiperplasia reacional-----	46
Tabela 8. Evolução dos tipos de estado reacional na linfadenopatia leishmaniótica-----	46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 <i>Leishmania</i> spp do Novo Mundo com respectivas formas clínicas e distribuição geográfica-----	14
Quadro 2 Espécies de <i>Leishmania</i> patogênicas para o homem-----	15
Figura 1 Frequência de granuloma na linfadenopatia leishmaniótica -----	40
Figura 2A Linfadenite leishmaniótica rica em granulomas-----	47
Figura 2B Destaque para o granuloma organizado na linfadenite leishmaniótica -----	47
Figura 3 Frequência de diferentes tipos de granulomas na linfadenite leishmaniótica -----	41
Figura 4 Frequência de necrose na linfadenopatia leishmaniótica Frequência de apoptose na linfadenopatia leishmaniótica -----	42
Figura 5A Extensa área de necrose caseosa no centro de granulomas confluentes-----	47
Figura 5B Marcação de TNF α na interface do granuloma com área de necrose	47
Figura 6 Frequência e intensidade da apoptose na linfadenopatia leishmaniótica-----	43
Figura 7A Intensa apoptose em área de histiocitose-----	47
Figura 7B Destaque para os corpos apoptóticos fagocitados por células mononucleares em área de histiocitose-----	47
Figura 8A Intensa histiocitose alargando e obliterando o seio subcapsular, com faixa de necrose -----	48
Figura 8B Exsudação histiocitária com células isoladas e granuloma não organizado-----	48
Figura 9 Frequência de fibrose na linfadenopatia leishmaniótica-----	45
Figura 10A Área de fibrose acometendo a cortical subjacente à cápsula Proliferação de capilares com discreta deposição de colágeno -----	48
Figura 10B Proliferação de capilares com discreta deposição de colágeno -----	48
Figura 11 Frequência das sub-populações celulares na linfadenopatia leishmaniótica-----	49
Figura 12I Marcação de membrana dos linfócitos T CD4+ ativados-----	48
Figura 13I Expressão de TNF α , TGF β e Ag. <i>Leishmania</i> na linfadenopatia leishmaniótica-----	50
Figura 14 Marcação de produtos de degradação de <i>Leishmania</i> no interior de células epitelióides-----	48

LISTA DE SIGLAS

APC: Célula apresentadora de antígeno
BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente
CHP: Complexo de histocompatibilidade principal
CMSP: Células mononucleares do sangue periférico
DAB: Diaminobenzidina
DPML: Departamento de Patologia e Medicina Legal
FNS: Fundação Nacional de Saúde
MIF: Fator de inibição da migração de macrófago
FIOCRUZ-BA: Fundação Oswaldo Cruz-Bahia
gp: Glicoproteína
HLA-DR: Antígeno leucocitário comum
HTR: Hipersensibilidade do tipo retardada
ICAM: Molécula de aderência intercelular
IFN γ : Interferon-*gamma*
IL: Interleucina
IDRM: Teste de Intradermoreação de Montenegro
LB: Leishmaniose bubônica
LPBC: Laboratório de Patologia e Biologia Celular
LC: Leishmaniose cutânea
LCD: Leishmaniose cutânea difusa
LIMC: Laboratório de Imunologia Celular
LCM: Leishmaniose cutâneo-mucosa
LPG: Lipofosfoglicano
LT: Linfotoxina
LTA: Leishmaniose tegumentar americana
LTh: Linfócito T auxiliar
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro
NO: Óxido nítrico
NOs: Sintetase do óxido nítrico
OMS: Organização Mundial de Saúde
RUV: Raio ultravioleta
SFM: Sistema fagocítico mononuclear
SUS: Sistema Único de Saúde
Tb: Tuberculose
TGF β : Fator de transformação do crescimento-*beta*
TNF α : Fator de necrose tumoral-*alpha*

RESUMO

A Linfadenopatia tem sido considerada uma importante manifestação clínica observada em pacientes com LC causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Foi realizada análise histopatológica de 26 linfonodos e imunohistoquímica de 11 pacientes com diagnóstico confirmado de LC, com o propósito de estudar as características da linfadenopatia e seu papel na patogênese da LC.

As subpopulações celulares, a carga antigênica e as citocinas dos linfonodos foram identificadas através da técnica de imunoperoxidase indireta, utilizando o sistema biotina-avidina. As alterações morfológicas foram analisadas através do exame histopatológico utilizando hematoxilina-eosina e as colorações de Wade e Grocott para o diagnóstico diferencial com tuberculose e micose.

Uma linfadenite crônica intensa constituiu o quadro de base da linfadenopatia leishmaniótica ($p=0,001$), observada em 96% dos casos. A linfadenite foi predominantemente granulomatosa (92%) associada de histiocitose sinusal (96%) e hiperplasia paracortical (96%). Houve ainda a participação da apoptose e necrose em 88% e 53% dos casos de linfadenite, respectivamente.

Os linfócitos T CD4+ associaram-se positivamente com a frequência de linfócitos T memória ($p=0,002$) e macrófagos ($p=0,001$) e células expressando TNF α foram mais frequentes nos linfonodos com mais tempo de evolução.

A leishmaniose cutânea com linfadenite regional concomitante mostrou analogia com a fisiopatologia do complexo primário da tuberculose, funcionando a reação ganglionar como um importante mecanismo de controle na LC, já que pacientes que desenvolvem linfadenopatia têm demonstrado um tipo de resposta imune mais efetiva, ocorrendo auto-resolução espontânea da linfadenite em 80% dos casos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Leishmaniose refere-se a um grupo de doenças provocadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* da ordem *Kinetoplastida*. Eles vivem no interior dos macrófagos como amastigotas em seres humanos e outros mamíferos: roedores, edentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, e como promastigotas flagelados no lúmen intestinal do hospedeiro intermediário: invertebrados da ordem DIPTERA, gênero *Lutzomya* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Lainson & Shaw, 1987), e em meios de cultura.

Com base na extrapolação dos dados epidemiológicos disponíveis (“WHO Division of Control of Tropical Disease (1998), estima-se que 350 milhões de pessoas no mundo correm o risco de contrair leishmaniose, aproximadamente 12 milhões estão infectadas e surgem por ano cerca de 2 milhões novos casos (1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral) [WHO, (on line) 1998].

Em áreas endêmicas de leishmaniose, como o Ceará, a incidência de leishmaniose tegumentar americana (LTA) é elevada (40 casos novos/100.000 habitantes) quando comparada com a do calazar (1,8/100.000 habitantes) no ano de 1997. Ademais, a LTA é responsável por uma alta taxa de morbidade em nosso estado, como pode se observar no grande número de casos notificados no ano de 1997, correspondendo a um total de 2.787 casos novos de LTA com base numa população de 7.193.095 habitantes (Brasil, FNS; 1997).

A LTA é um problema crescente de saúde pública, pelo aumento crescente do número de notificações nos últimos 10 anos e sua distribuição geográfica em expansão. Se atentarmos para o fato da subnotificação, devemos avaliar os dados oficiais com cautela pois estes refletem apenas parcialmente a magnitude do problema.

1.1.1 Taxonomia

A posição sistemática do gênero *Leishmania* segundo Lainson & Shaw (1987) é a seguinte:

Reino PROTISTA Haeckel, 1986

Sub Reino PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo SARCOMASTIGOPHORA Honigberg and Balamuth, 1963

Subfilo MASTIGOPHORA Deising, 1866

Classe ZOOMASTIGOPHORA Calkins, 1909

Ordem KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, *emend* Vickerman, 1976

Subordem TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, *emend* Grobben, 1905

Gênero *Leishmania* Ross, 1903

De acordo com o desenvolvimento de *Leishmania* no interior dos flebotomíneos (insetos vetores), Lainson & Shaw (1987) propuseram uma nova subdivisão para o gênero *Leishmania*. As espécies que se desenvolvem no intestino posterior do inseto pertencem ao subgênero *Viannia*, enquanto que as espécies com desenvolvimento no intestino médio e anterior pertencem ao subgênero *Leishmania*.

Vários esquemas de classificação têm sido propostos. Dentre estes destaca-se uma nomenclatura simplificada que foi utilizada em recentes publicações apresentadas no Segundo Simpósio Internacional de Taxonomia e Filogenia da *Leishmania* em Montpellier, França, 1988, com base no reconhecimento de comportamento do parasito no hospedeiro vertebrado e em métodos moleculares e bioquímicos: [serodema (anticorpos monoclonais) e zimodema (perfil isoenzimático)] aplicados às cepas individuais de *Leishmania* originárias de distintas áreas geográficas (Grimaldi et al, 1989):

Leishmania braziliensis Viannia, 1911 *emend* Matta, 1916 (= *Leishmania braziliensis braziliensis*, L. (*Leishmania*) *braziliensis*, L. (*Viannia*) *braziliensis*).

Leishmania guyanensis Floch, 1954 (= *L. b. guyanensis*, L. (*V.*) *guyanensis*).

Leishmania panamensis Lainson e Shaw, 1972 (= *L. b. panamensis*, L. (*L.*) *panamensis*, L. (*V.*) *panamensis*).

Leishmania lainsoni Silveira and others, 1987 (= *L. (V.) lainsoni*).

Leishmania mexicana Biagi, 1953 *emend* Garnham, 1962 (= *L. m. amazonensis*, L. (*L.*) *amazonensis*).

Leishmania amazonensis Lainson and Shaw, 1972 (= *L. m. amazonensis*, L. (*L.*) *amazonensis*).

Leishmania venezuelensis Bonfante-Garrido, 1980 (= *L. m. venezuelensis*, L. (*L.*) *venezuelensis*).

Leishmania chagasi Cunha and Chagas, 1937 (= *L. donovani chagasi*, L. (*L.*) *chagasi*).

As várias espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (Brasil) podem ser classificadas taxonomicamente segundo os critérios de Lainson & Shaw (1987) (padrão de crescimento de promastigotas no intestino do flebótomo), acrescidas de espécies descritas posteriormente por outros autores (Lainson et al, 1994) (Quadro 1).

Quadro 1: *Leishmania* spp do Novo Mundo com respectivas formas clínicas e distribuição geográfica

Leishmanioses	Espécies	Forma clínica*	Distribuição geográfica
viscerotrópicas	<i>L.(L.) chagasi</i>	L.V	América Latina
dermotrópicas	<i>L.(L.) mexicana</i>	L.C/L.C.D	México, América Central, Texas
	<i>L.(V.) shawi</i>	L.C	Pará
	<i>L.(V.) naiffi</i>	L.C	Pará
	<i>L.(V.) lainsoni</i>	L.C	Pará
	<i>L.(L.) amazonensis</i>	L.C/L.C.D	Amazônia, Bahia e outros estados do Brasil
	<i>L.(L.) pifanoi</i>	L.C/L.C.D	Venezuela
	<i>L.(L.) garnhami</i>	L.C	Venezuela
	<i>L.(L.) venezuelensis</i>	L.C	Venezuela
	<i>L.(V.) braziliensis</i>	L.C/L.M.C/LB	Várias áreas da América Latina
	<i>L.(V.) peruviana</i>	L.C	Andes Peruano, Argentina
	<i>L.(V.) panamensis</i>	L.C/LCM	Panamá, Costa Rica, Colômbia, Honduras

Fonte: Lainson et al, 1994

*LV- leishmaniose visceral; LC- leishmaniose cutânea; LCD- leishmaniose cutânea difusa; LCM- leishmaniose cutâneo-mucosa; LB- leishmaniose bubônica

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (1990) as diferentes espécies de *Leishmania* responsáveis pela infecção humana no Novo Mundo podem ser classificadas em 3 (três) tipos distintos de complexo fenotípico (Quadro 2)

Quadro 2: Espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem- classificação proposta pela OMS, 1990

Leishmanioses	Subgêneros e "Complexos"
Dermotrópicas (Novo Mundo)	Subgênero <i>Viannia</i>
	Complexo " <i>Leishmania braziliensis</i> "
	<i>Leishmania braziliensis</i>
	<i>Leishmania panamensis</i>
	<i>Leishmania guyanensis</i>
	<i>Leishmania peruviana</i>
	Subgênero <i>Leishmania</i>
	Complexo " <i>Leishmania mexicana</i> "
	<i>Leishmania mexicana</i>
	<i>Leishmania amazonensis</i>
Viscerotrópicas (Novo e Velho Mundo)	<i>Leishmania pifanoi</i>
	Complexo " <i>Leishmania donovani</i> "
	<i>Leishmania donovani</i>
	<i>Leishmania infantum</i>
	<i>Leishmania chagasi</i>

1.1.2 Ciclo biológico

A *Leishmania* tem um ciclo biológico dimórfico e semelhante em qualquer das espécies de flebótomo. A infecção, por sua vez, ocorre quando a fêmea pica o homem (hospedeiro acidental) e um certo número de mamíferos infectados por *Leishmania* (reservatórios), tais como os roedores silvestres, marsupiais, edentados, carnívoros e primatas, e juntamente com o sangue ingere macrófagos parasitados pelas formas amastigotas, que são liberadas no tubo digestivo do inseto vetor. Após divisão binária, as amastigotas se transformam rapidamente em promastigotas que ainda se multiplicam no sangue ingerido. Após digestão do sangue, entre o terceiro e o quarto dias, as promastigotas livres podem seguir dois caminhos: as do complexo "*braziliensis*" (subgênero *Viannia*) colonizam o piloro e o íleo (tipo peripilária) e se transformam em paramastigotas que, pelo flagelo, aderem ao epitélio intestinal por meio de desmossomos. Em seguida, os parasitos migram em direção à faringe do inseto e se transformam em pequenas promastigotas, altamente móveis e infectantes. As do complexo "*mexicana*" (subgênero *Leishmania*) multiplicam-se no estômago (tipo suprapilária) e se transformam em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe, em seguida diferenciam-se novamente em promastigotas infectantes, completando o ciclo entre 3 e 5 dias (Lainson & Shaw, 1987).

Na tentativa de ingerir o sangue do vertebrado a fim de completar o ciclo gametogênico, o inseto introduz no local da picada as formas promastigotas infectantes, que dentro de 4-8 horas

são fagocitadas pelos macrófagos.

A interação *Leishmania*-macrófago pode ser assim resumida: a ligação da promastigota à superfície do macrófago, *in vitro*, é mediada por glicoproteínas e lipofosfoglicano (gp63 e LPG) existentes na superfície de todas as espécies infectantes de *Leishmania*, que interagem com receptores CR3 e p150-95 que são integrinas da superfície do macrófago. Na presença de soro não-imune, as promastigotas metacíclicas ativam o complemento pela via clássica e acumulam C3b na sua superfície (opsonização), que se liga ao receptor de C3b dos macrófagos, via CR1 e CR3 (Russel & Talamas-Rohana, 1989).

Após fagocitose, as promastigotas se transformam em amastigotas, que resistem à ação dos lisossomos e se multiplicam por divisão binária. Embora sejam desconhecidos os mecanismos que permitem a sobrevivência da *Leishmania* no interior do macrófago, levanta-se a hipótese de que, ou a *Leishmania* é refratária intrinsecamente, ou que produtos do parasito sejam capazes de degradar e/ou inativar as enzimas lisossomais. De qualquer modo esta capacidade de sobreviver ao ataque enzimático e ao estresse oxidativo por radicais livres oxigenados ("burst" oxidativo) é um atributo do parasito vivo, já que parasitos não viáveis quando fagocitados são prontamente lisados e digeridos (Barral-Netto et al, 1986).

Ocorrendo a multiplicação intracelular do parasito, pouco tempo depois, o macrófago repleto de amastigotas, desloca o seu núcleo para a periferia e então uma vez esgotada sua resistência, a membrana se rompe, liberando os parasitos no interstício, os quais iniciam a reação inflamatória e são novamente fagocitados por outros macrófagos exsudativos que são atraídos para o local, por quimiotaxia (Bray & Alexander, 1987).

As amastigotas são capazes de manter e amplificar a infecção, presumivelmente, pela liberação e reentrada em outros macrófagos, os quais funcionam como células hospedeiras ("safe target"). Após o estabelecimento da imunização mediada por células T (CD4+), os macrófagos, seja como células apresentadoras de antígenos, seja como célula efetora, são responsáveis pela morte do parasito nos estágios de remissão da infecção (Gross et al, 1992).

1.2 Manifestações clínicas

Clinicamente, as leishmanioses são divididas em síndromes visceral, cutânea e cutâneo-mucosa. Uma única *Leishmania* sp pode produzir diferentes formas clínicas, assim como uma determinada forma clínica pode ser causada por mais de uma espécie (Pupo, 1946).

A LTA envolve uma grande variedade de manifestações clínicas, representadas por

lesões únicas ou múltiplas, secas ou úmidas, ulceradas ou não, localizadas ou disseminadas (Pupo, 1946).

As lesões cutâneas se iniciam no sítio de entrada do parasito, formando uma pequena pápula que evolue a nódulo com posterior ulceração central. As lesões podem tomar o aspecto de pápulas, nódulos, úlceras, tubérculos ou placas infiltrativas. Lesões verrugosas e vegetantes são observadas com menor frequência (Marsden, 1986).

O aspecto mais encontrado é de úlcera com bordos elevados, regulares e bem demarcados. A *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Nordeste do Brasil e é a responsável pela maioria das formas graves de LTA. As lesões se desenvolvem rapidamente e podem mostrar uma tendência à cura espontânea, sem tratamento específico (Marsden, 1986).

Raramente (em aproximadamente 1% dos casos), a LC pode assumir o quadro de doença disseminada, grave, por comprometer extensas áreas da superfície corpórea. As lesões aí podem aparecer como elementos acneiformes, pápulas e pequenas úlceras (Costa et al, 1986, Carvalho et al, 1994). Esta forma clínica deve ser diferenciada da forma cutânea difusa, na qual as lesões encontradas são do tipo nodulares e não-ulceradas (Convit et al, 1972).

Recentemente, uma variante dita bubônica causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido descrita no estado do Ceará. A denominação de leishmaniose bubônica foi dada em virtude da alta prevalência de linfadenopatia associada à LTA por *L.(V.) braziliensis* em nosso estado, assemelhando-se ao quadro clínico da peste bubônica (Sousa et al, 1995). Entidade semelhante tem sido descrita também no estado da Bahia (Barral et al, 1992; 1995).

Assim, linfonodos satélites hipertrofiados em associação com lesões cutâneas ulceradas induzidas por *Leishmania (V) braziliensis* configuram uma entidade clínica, designada de leishmaniose bubônica (LB), particularmente prevalente no estado do Ceará (Sousa et al, 1995).

Estudo epidemiológico realizado numa área endêmica de LTA em Baturité, Ceará, mostrou que 77% de um universo de 595 indivíduos, com diagnóstico confirmado de LC por *Leishmania (V.) braziliensis*, apresentavam linfadenopatia regional importante (acima de 2 cm). Um fato digno de atenção foi a observação de que a linfadenopatia precedia, numa média de 2 semanas, a úlcera cutânea em mais de 2/3 dos casos. Indivíduos com linfadenopatia relatavam mais frequentemente história de febre, e, ao exame clínico podiam exibir aumento de fígado e baço, sinais estes que os distinguiam do grupo de pacientes com LTA, mas sem linfadenopatia (50 pacientes). A presença de linfadenopatia transitória pode funcionar como o primeiro sinal de LC e, algumas vezes, é a única manifestação da infecção por *Leishmania braziliensis*. A visualização de amastigotas nos linfonodos hipertrofiados, antes da ocorrência de qualquer outra

evidência dermatológica da doença, indica que a difusão da *Leishmania* do sítio de inoculação para os linfonodos é precoce e precede o desenvolvimento da úlcera cutânea (Barral et al, 1995).

A leishmaniose cutâneo-mucosa (espúndia) caracteriza-se por um grande comprometimento cutâneo a nível do lábio superior e septo nasal com intenso desfiguramento, resultante do grave dano tissular local infligido pelo processo inflamatório linfohistioplasmocitário de hipersensibilidade, de natureza imunopatológica (Marsden, 1986). Esta forma grave e mutilante de leishmaniose é causada pela *L. (V.) braziliensis* e ocorre devido à disseminação sistêmica tardia de lesões primárias, estritamente cutâneas, que acometem aproximadamente 0,3% dos indivíduos infectados no estado do Ceará (Sousa et al, 1995), sendo que em Três Braços, Bahia, observa-se uma prevalência aproximada de 5% (Marsden et al, 1984). Os dois possíveis fatores de risco para leishmaniose cutâneo-mucosa são múltiplas lesões cutâneas na infecção primária e tratamento específico com glucantime inadequado ou incompleto das lesões primárias (Marsden, 1986).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD), considerada uma síndrome rara ou mesmo inexistente no Nordeste do Brasil, é uma forma anérgica da doença que é peculiar à região Amazônica e se caracteriza por lesões papulares e/ou nodulares não ulceradas, geralmente múltiplas, isoladas ou conglomeradas ou ainda em placas cutâneas, espessas e infiltradas. É de difícil diagnóstico diferencial com a forma virchowiana da hanseníase, daí a razão de muitos pacientes com LCD serem enviados a colônias de hansenianos por erro diagnóstico (Convit, 1972). As lesões estão geralmente distribuídas por todo o tegumento cutâneo, sobretudo no rosto ("face leonina") e na face externa dos membros, conferindo assim a designação de difusa. Conquanto o qualitativo de difuso seja um atributo bastante frequente, não é considerado absoluto, devido ao fato de existirem casos com lesões simples localizadas. Esta variedade de leishmaniose jamais ulcera e apresenta tendência a poupar as mucosas, atingindo-as só raramente (Silva, 1982). Amastigotas jamais são encontrados na medula óssea, fígado, baço ou outras vísceras (Convit, 1972), o que permite excluir potencial viscerotrópico da *L.(L.) amazonensis* nestes pacientes.

Ecoepidemiologicamente, em nosso país, a LCD é reconhecida como uma zoonose de pequenos roedores, causada pela *L.(L.) amazonensis* e que acidentalmente transmite-se ao homem. Esta forma difusa ocorre em indivíduos com deficiência inata de resposta imunocelular específica (Convit, 1972).

1.3 Histopatologia

No homem e nos diversos hospedeiros vertebrados envolvidos como elos na cadeia de transmissão das leishmanioses, as *Leishmania* spp se multiplicam no interior de macrófagos e de outras células do sistema fagocítico mononuclear (“safe targets”) como parasitos intracelulares obrigatórios.

De um modo geral, aceita-se a existência de um amplo espectro histopatológico na leishmaniose, variando desde formas anérgicas com exacerbado número de parasitos às formas de hipersensibilidade, com escassez de parasito e uma resposta do tipo granulomatosa (Kurban et al, 1966; Ridley, 1987).

O quadro histopatológico de base na LTA (LC e LCM) está representado pela inflamação crônica, frequentemente do tipo granulomatosa, que compromete a derme, ou o córion da mucosa, em extensão variável. Este quadro, porém, não particulariza a doença, cujo diagnóstico só pode ser selado pelo encontro do parasito. Levando-se em consideração o achado inconstante de amastigotas nas lesões, é importante que se estabeleçam certos padrões de alterações histopatológicas peculiares à LTA, resguardando-se especificidades geográficas e genéticas dos microorganismos.

A relevância a ser atribuída aos eventos imunopatológicos, a nível da lesão cutânea leishmaniótica, reside no fato destes poderem estar refletidos a nível do linfonodo satélite à maneira de uma imagem em espelho.

1.3.1 Leishmaniose cutânea (LC)

A análise das alterações histopatológicas de 378 casos de LT na região de Três Braços, na Bahia, revelou que em 40,9% das formas cutâneas, a infiltração celular histiolinfoplasmocitária constituiu a característica básica do padrão de reação exsudativa celular que pôde ser observado tanto na fase aguda como na crônica (Magalhães et al, 1986).

O plasmócito constituiu um elemento praticamente constante em todas as lesões desenvolvidas, porém não foi observado nas lesões residuais, em via de cura ou já cicatrizadas. Os mastócitos foram encontrados geralmente em associação com os eosinófilos, predominando os primeiros no padrão de reação exsudativa e necrótico-granulomatosa. Os granulócitos neutrófilos apareceram discretamente. Em 66% dos casos, a necrose fibrinóide ocorreu nos primeiros 2 meses de lesão. Quanto à reação granulomatosa, foram observados 2 tipos de

granulomas: o desorganizado, em associação com a necrose tissular e o organizado, mais raro, do tipo tuberculóide. As células epitelióides somente foram observadas no granuloma característico do padrão de reação exsudativa e tuberculóide, predominando ligeiramente nas formas cutâneas (Magalhães et al, 1986b).

A neoformação vascular teve uma presença significativamente maior nas formas crônicas, enquanto que nas formas agudas predominou a lesão discreta. A fibrose inexistiu nas formas agudas, sendo observada sobretudo nas formas crônicas (Magalhães et al, 1982).

A infecção cutânea revelou numa fase inicial a presença de uma quantidade variável de parasitos no interior de histiócitos ou livres no tecido, podendo ser encontrados tanto na derme papilar como na reticular. Posteriormente, os parasitos se reduzem em número, tornando difícil a sua visualização através de biópsias (Ridley, 1980; Magalhães et al, 1982; Marsden, 1986).

1.3.2 Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM)

As lesões da LCM são caracterizadas por uma reação granulomatosa necrosante com muitas células inflamatórias, mas com raros parasitos. Estas lesões são com frequência refratárias ao tratamento antimonial (Marsden, 1986).

As lesões histológicas assemelham-se parcialmente àquelas descritas na LC. No início, o aspecto predominante é o de uma reação celular não-específica, exsudativa, com infiltração de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, algumas vezes associado a reações necróticas e granulomatosas de pequena monta. Em seguida, formam-se granulomas em torno da zona necrótica, com degeneração fibrinóide (“active infiltrative granulomata”). Um aspecto importante na patogenia desta forma clínica consiste no quadro de vasculite aguda com necrose coagulativa e/ou fibrinóide da parede de pequenos vasos sanguíneos, que se sobrepõe ao de hipersensibilidade tipo III induzida por deposição local de imunocomplexos. Nestas circunstâncias, a lesão pode evoluir para um granuloma epitelióide (tipo tuberculóide) ou regredir para uma reação exsudativa celular inespecífica (Organização Mundial de Saúde, 1990).

Os fenômenos necróticos tendem a ser extensos e parecem associar-se a acúmulo *in situ* de complexos imunes e não necessariamente relacionam-se à lise de macrófagos ou amastigotas intracelulares. As lesões tendem a comprometer o revestimento mucoso, mormente a nível do septo nasal com perfuração e queda (“nariz em tapir”). Neste sítio, as amastigotas podem ser visualizadas no interior de células endoteliais em áreas de neovascularização associadas a denso infiltrado perivascular e lise de matriz cartilaginosa (Marsden, 1986; OMS, 1990).

1.3.3 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

A LCD nas Américas está estreitamente associada com a *L.(L.) amazonensis* e se caracteriza histopatologicamente pelo infiltrado denso de macrófagos vacuolizados, repletos de formas amastigotas e pela escassez de exsudação linfocitária e pela ausência de fenômeno úlcero-necrosante, aspecto que lembra a hanseníase virchowiana (Marsden et al, 1986). O quadro histopatológico geral, portanto, reflete a ausência de resposta imune celular.

No entanto, Bittencourt & Freitas (1983) demonstraram que ocorria uma variabilidade nos aspectos histopatológicos das lesões ativas e das involutivas, mostrando a presença de infiltrado mononuclear, fibrose, necrose e diferenças na intensidade do parasitismo entre diferentes lesões num mesmo paciente, mesmo na ausência de tratamento. Nas lesões involutivas havia um decréscimo acentuado no parasitismo e extensa fibrose.

1.3.4 Linfadenopatia leishmaniótica: leishmaniose bubônica (LB)

A análise de biópsias de linfonodos de pacientes com leishmaniose revela um quadro de linfadenite, formado por um processo necrótico granulomatoso com a presença de amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos. O infiltrado inflamatório consiste de histiócitos, linfócitos e plasmócitos, que pode estender-se além da cápsula em torno do tecido adiposo, tornando os nódulos adjacentes aderentes, permitindo, assim, a formação de grandes massas que são facilmente palpáveis ao exame físico. Os macrófagos e plasmócitos costumam ser distribuídos na região subcapsular ou na forma de agregados de moderado tamanho com a presença de granulomas bem formados, distribuídos por todo o linfonodo. Há casos em que aparecem áreas de necrose caseosa ou fibrinóide que sugerem o quadro de tuberculose. Outros achados frequentemente descritos incluem ainda hiperplasia folicular com fibrose e ocasionais amastigotas (Pupo, 1946; Berger et al, 1985; Moraes et al, 1993; Sousa et al, 1995).

A linfadenopatia descrita em pacientes com LC no Velho Mundo mostra algumas semelhanças com a do novo Mundo, como pode ser observado em estudos realizados por Daneshbod (1978), Azadeh (1985) e Kumar (1987), os quais assinalaram os seguintes aspectos: fibrose subcapsular com infiltração linfocítica; hiperplasia folicular com grandes centros germinativos; granulomas de tamanho variável apresentando ou não células gigantes multinucleadas, às vezes contendo necrose central e ocasionais plasmócitos e amastigotas intracelulares.

Histologicamente, a linfadenite por *Leishmania* assemelha-se a outras doenças granulomatosas como a toxoplasmose, histoplasmose, tuberculose e sarcoidose. Faz-se, assim, necessário que, além de técnicas rotineiras de coloração como a hematoxilina-eosina, outros recursos laboratoriais auxiliares possam ser utilizados tais como cultura de material de biópsia, inoculação em animais de laboratório, a IDRM e, eventualmente, testes de imunohistoquímica, testes de hibridização molecular e microscopia eletrônica. Estes últimos devem ser feitos como métodos auxiliares para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento linfonodal, já que inexitem, no momento, alterações hematológicas ou sorológicas específicas desta entidade clínica, a linfadenopatia leishmaniótica (Barral et al, 1995).

1.3.5 Classificações histológicas da LTA

O quadro histopatológico da LC e LCM varia de um processo inflamatório com exsudação inespecífica de células mononucleares e neutrófilos a uma reação granulomatosa com ou sem necrose (Bittencourt & Andrade, 1967; Magalhães et al, 1982). Dentro deste contexto são várias as tentativas de classificação histológica, em face de múltiplos aspectos histopatológicos da LC com relação aos aspectos clínico, de prognóstico e resposta terapêutica (Magalhães et al, 1982; Ridley, 1980; Bittencourt & Barral, 1991).

A classificação simplificada adotada por Bittencourt & Barral (1991) consiste de 3 categorias: I- Presença de um infiltrado inflamatório de plasmócitos, linfócitos e macrófagos na ausência de células gigantes e epitelióides; II- ocorrência de células gigantes e/ou epitelióides presentes numa forma desorganizada em associação com o infiltrado inflamatório mononuclear; III- presença de granulomas bem circunscritos com células epitelióides e células gigantes associada ou não com os elementos das outras categorias.

Dos 5 (cinco) padrões histopatológicos descritos por Magalhães et al (1986b), a reação exsudativa de células mononucleares constituiu o tipo mais frequente, tanto nas formas cutâneas como nas mucosas, sendo ainda considerada como a reação imunocelular de base. O padrão de reação necrótico-exsudativa apareceu em um número reduzido de casos da forma cutânea pura. A necrose, seu elemento principal, deve representar, segundo Magalhães et al (1986a), alteração fugaz que antecede o granuloma reacional, constituindo assim o padrão misto de reação exsudativa e necrótico-granulomatosa.

Em trabalho subsequente, Ridley et al (1980), analisando a histopatologia de um grande número de casos de LC e LCM oriundos do estado da Bahia, vêm a consubstanciar achados

anteriores de uma associação positiva entre a marcada reação fibrinóide e formas da doença pauciparasitárias. Inversamente, uma associação entre a débil reação do tecido conjuntivo e formas da doença com intenso parasitismo pôde ser estabelecida.

A classificação elaborada por Ridley (1980) consiste de: I- quadro não-reativo, com escassas ou ausentes células inflamatórias; II- quadro reativo, com leve a moderada reação inflamatória e intenso processo necrotizante; III- quadro infiltrativo, com acentuada infiltração mononuclear da derme mas sem granuloma ou necrose; IV- tipo tuberculóide, com células gigantes esparsas e pequenos focos de células epitelióides, associados ou não com necrose; V- tipo hipersensibilidade, com granuloma composto de células epitelióides bem desenvolvidas, associado ou não com células gigantes.

Tentando avaliar a aplicabilidade das classificações histológicas na LC e LCM, Barral e Bittencourt (1991) avaliaram os padrões morfológicos de duas biópsias colhidas simultaneamente de uma mesma lesão e compararam as classificações de Ridley e de Magalhães com uma classificação simplificada, composta por três categorias: 1- infiltrado inflamatório crônico sem células epitelióides ou gigantes; 2- padrão anterior com presença de células epitelióides e gigantes; 3- presença de granulomas bem circunscritos. Distintos padrões histopatológicos foram observados na mesma biópsia, evidenciando-se que os padrões histopatológicos não representam um estágio da leishmaniose tegumentar e daí a impossibilidade de classificá-la tomando por base unicamente seus aspectos histopatológicos.

1.4- Papel do linfonodo

Os linfonodos podem reagir histopatologicamente a um estímulo lesivo através de dois modos: um genericamente denominado de estado reacional ou hiperplasia reativa, incluindo hiperplasia folicular, hiperplasia paracortical e histiocitose sinusal; outro, reconhecido como linfadenite, que pode exibir aspectos de supuração, necrose, inflamação granulomatosa e infiltração de plasmócitos. A combinação de hiperplasia reativa com outras reações inflamatórias pode ser vista em determinados tipos de doença (Kissane & Anderson, 1985).

A hiperplasia reativa do linfonodo caracteriza-se por reações histológicas inespecíficas que podem ser causadas por uma variedade de estímulos. A do tipo folicular é um tipo de reação causada por estimulação de linfócitos B, sendo caracterizada morfolologicamente pela presença de numerosos folículos linfóides com grandes centros germinativos exibindo elevada atividade mitótica e numerosos macrófagos e plasmócitos. Este tipo de reação pode ser observado na sífilis

secundária, artrite reumatóide, toxoplasmose e estágios agudos da infecção por HIV. O significado da reação que se observa na histiocitose sinusal é desconhecido, a qual se caracteriza pela distensão dos seios por histiócitos bem diferenciados com hipertrofia das células endoteliais, podendo funcionar como um indicador de bom prognóstico para o câncer de mama, por exemplo. A hiperplasia paracortical se caracteriza por modificações restritas à região de linfócitos T, podendo ser identificada pelo considerável número de células grandes com nucléolos proeminentes e citoplasma basofílico (imunoblastos), hipertrofia de células endoteliais sinusais e vasculares, e um infiltrado celular misto, principalmente de macrófagos e eosinófilos (Kissane & Anderson, 1985; Cotran et al, 1994).

Quando os granulomas estão presentes nos linfonodos, a condição passa a ser denominada de linfadenite granulomatosa, que geralmente ocorre nos casos de linfadenite crônica. Várias infecções podem ser incluídas neste tipo de linfadenite, tais como a tuberculose, a histoplasmose, a brucelose, a doença da arranhadura do gato, a sarcoidose e o carcinoma, dentre outras. A tuberculose (Tb) é um exemplo clássico de linfadenite granulomatosa, na qual o envolvimento do linfonodo pode ser considerado resultante da drenagem do sítio primário de infecção para os linfonodos satélites, tal como ocorre com o envolvimento dos linfonodos hilares e peribronquiais no complexo primário da Tb pulmonar. Nas lesões recentes os linfonodos apresentam pequenos tubérculos típicos com pouca necrose caseosa central, contendo células gigantes multinucleadas do tipo Langhans. Nas lesões mais antigas os linfonodos contêm poucos granulomas associados a necrose caseosa significativa com posterior deposição de colágeno e calcificação (Ritchie, 1990). Outros tipos comuns de linfadenite que se observa em nosso meio são as supurativas e as necrotizantes. As primeiras são causadas por organismos piogênicos tais como estafilococos e estreptococos. Os linfonodos nestes casos se apresentam hipertrofiados e dolorosos e a polpa entre os folículos se encontra hiperêmica e infiltrada com polimorfonucleares neutrófilos. As bactérias presentes neste meio podem multiplicar-se e produzir hemorragia e abscessos. A linfadenite necrotizante caracteriza um quadro hemorrágico com extenso processo necrotizante, típico da peste bubônica. (Kissane & Anderson, 1985).

Trabalhos experimentais têm revelado a importância dos linfonodos regionais no controle da infecção provocada por *Leishmania* (Poulter & Randolph, 1982; Reed et al, 1986).

Existem evidências de que a migração da *Leishmania* do sítio de inoculação inicial para o linfonodo de drenagem possa ser um mecanismo imunorregulador eficiente no início da resposta imune específica (Moll, 1993).

Já está bem estabelecido que a indução de resposta imune celular frente a antígeno

introduzido topicamente ou intradérmico requer a drenagem linfática a partir do sítio de penetração. Kadivar & Soulsby (1975) demonstraram que a LCD poderia ser experimentalmente induzida pela interrupção da drenagem linfática do sítio de infecção primário na LC.

Estudos realizados, com linhagem de camundongos resistentes (C57BL) à infecção por *L. tropica*, têm demonstrado que a remoção de linfonodos poplíteos previamente à infecção foi capaz de exacerbar consideravelmente a lesão primária em relação ao grupo de animais infectados sem remoção de linfonodos. A gravidade da doença, então, foi associada com a inibição inicial da indução de hipersensibilidade tipo retardada (HTR) e, assim, na falência do mecanismo de resistência adquirida à mediação celular, inibidora da multiplicação parasitária (Poulter & Randolph, 1982).

De modo análogo, Reed et al (1986) observaram que a resposta cutânea positiva de HTR específica para *Leishmania amazonensis* negativava progressivamente em camundongos C57BL/10 (resistente) e DBA2 (moderadamente susceptível) infectados, nos quais a drenagem linfática tinha sido previamente removida. Uma diferença importante entre este estudo e o de Poulter & Randolph (1982) foi o fato da abolição da expressão normal de HTR cutânea, a qual acompanhava-se de metastatização e alto índice de mortalidade à maneira de camundongos da linhagem BALB/C.

A importância dos linfonodos na contenção e controle da LC tem sido claramente demonstrada em modelo experimental. Entretanto, o papel dos linfonodos envolvidos na patogenia da LC/LCM humana necessita ser melhor esclarecido.

Estudos realizados por Barral et al (1992) e Sousa et al (1995) têm demonstrado que ocorre a disseminação precoce de *L. braziliensis* do sítio de inoculação primária na pele para o linfonodo regional de drenagem, em um número significativo de pacientes residentes em área endêmica de LC. De 456 pacientes com linfadenopatia leishmaniótica, 81% apresentaram involução completa da adenopatia antes do estabelecimento da terapêutica, significando que ocorre resolução espontânea da linfadenopatia leishmaniótica na maioria dos pacientes (Sousa et al, 1995). Pacientes com linfadenopatia desenvolvem em geral uma resposta imune celular e humoral maior do que pacientes sem linfadenopatia. Estes resultados sugerem que a disseminação precoce de *Leishmania* para os linfonodos parece ser relativamente comum e importante na indução de uma resposta imune local efetiva na LC (Barral et al, 1992).

1.5- Resposta imune na leishmaniose

Infecções experimentais com *Leishmania major* em camundongos isogênicos susceptíveis resultam numa doença disseminada letal. Os animais infectados respondem aos antígenos parasitários através da estimulação de células Th2 CD4+ e secreção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. De um modo inverso, animais da linhagem C57B1, considerados resistentes à infecção por *Leishmania major*, desenvolvem uma resposta tipo Th1 CD4+ com secreção de IFN γ , IL-2 e TNF β ; estes animais curam-se espontaneamente (Reed et al, 1986; Liew, 1991, Andrade et al, 1984).

Após contato entre os antígenos de *Leishmania*, presentes na superfície dos macrófagos e os linfócitos T CD4+, estes são estimulados a secretar IFN γ , que juntamente com outras citocinas elaboradas por macrófagos ou pelos próprios linfócitos T (por ex. IL-2, GM-CSF e TNF α) irão promover a ativação local de macrófago, tornando-os capazes de destruir as amastigotas. Estas citocinas agem como cofatores estimuladores de macrófagos e promovem um segundo sinal para o IFN γ , na indução da resistência à infecção mediada por óxido nítrico derivado da L-arginina (Locksley et al, 1987; Green et al, 1990)

Um modelo experimental idealizado por Liew (1991), utilizando cepas virulentas de *L. major* (LV 39), mostrou que IFN γ , TNF α e possivelmente outras citocinas, tais como fator de inibição da migração de macrófago (MIF), após ocuparem seus receptores na superfície das células, ativam uma série de vias de sinalização intracelular, que juntamente com outros emitidos por co-estimuladores, tais como os lipopolissacárides, levam a indução da *Óxido Nítrico sintetase (NOS)*, que por sua vez promove a síntese de óxido nítrico, um dos principais mecanismos leishmanicidas. Outras citocinas, como a IL-3, IL-4, TGF β e possivelmente IL-10 emitem também uma série de sinais que funcionam numa direção oposta (Barral-Netto et al, 1996).

Apesar da maioria dos estudos em modelo experimental de leishmaniose apontar no sentido de uma imunidade protetora ligada à produção de IFN γ por linfócitos Th1 CD4+, existem indicativos da participação de linfócitos T citotóxicos (Barral-Netto et al, 1996).

O modo de ação dos linfócitos T citotóxicos CD8+ na leishmaniose permanece ainda obscuro. Os linfócitos T CD8+ exercem efeito citotóxico diretamente sobre as células infectadas, mas podem também produzir citocinas, como o IFN γ , sugerindo assim a participação destas células no mecanismo protetor multifacetário na leishmaniose (Chan, 1993).

Os mecanismos que levam a indução ou expansão preferencial do tipo de resposta celular, tipo Th1 ou Th2, não estão totalmente esclarecidos, embora existam evidências de que vários fatores possam afetá-los durante a infecção: tipos de citocinas produzidas durante a fase inicial da ativação celular, interação com APC que pode preferencialmente apresentar tipos distintos de complexos antígeno-moléculas CHP, influência de outros sinais co-estimulatórios e expansão diferencial de subpopulações de linfócitos T auxiliares (Locksley et al, 1987; Mosmann & Moore, 1991). O conjunto de elementos assim disponíveis permite postular um papel relevante da imunidade inata sobre o tipo predominante de resposta imune celular tardia. Células ou componentes solúveis da imunidade inata [macrófagos (IL-12), células NK (IFN γ), célula T “natural” (IL-4)] fornecem instruções que capacitam à resposta imune de linfócitos T selecionar peptídeos e estratégias mais apropriadas à eliminação de agentes infecciosos (Fearon & Locksley, 1996).

Várias tentativas têm sido feitas para identificar uma dicotomia correspondente à do modelo experimental na resposta das células T CD4⁺ humanas frente à *Leishmania*, procurando estabelecer sempre que possível, uma correlação entre o perfil de citocinas, a gravidade do dano tissular e a subpopulação linfocitária predominante no exsudato inflamatório (Kemp et al, 1996).

Apesar da dicotomia no modelo murino por *L. major* já estar bem definida, o mesmo não se pode falar com relação à leishmaniose humana. Estudos com humanos no Brasil mostraram um predomínio do perfil de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN γ e LT) nos casos de LC, e perfil Th2 com predomínio de IL-4 e pouca quantidade de IL-10 na forma LCD (Pirmez et al *apud* Barral-Netto et al, 1995).

Pacientes com LV têm um elevado nível sanguíneo de IL-4; ademais, os mononucleados sanguíneos (PBMC) não proliferam nem produzem IFN γ em resposta à estimulação antigênica específica *in vitro* (Kemp et al, 1996).

A falta de produção de IFN γ pelas PBMCs nos estágios iniciais da infecção por *L. donovani*, permite prever a progressão da infecção para uma forma evolutiva e grave de LV. Por outro lado, indivíduos que produzem quantidade elevada de IFN γ são geralmente assintomáticos ou oligossintomáticos (infecção subclínica) (Kemp et al, 1996).

Estas e outras observações têm sugerido uma ativação diferencial de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em diferentes apresentações clínicas da infecção leishmaniótica. A análise por RNAm para várias citocinas tem sido feita em pacientes com LTA, demonstrando que RNAm para IL-2, IFN γ e TNF β são observados predominantemente em lesões localizadas, ao passo que RNAm para IL-4 predominava nas lesões cutâneo-mucosas tardias (Cáceres-Dittmar et al *apud*

Barral-Netto et al, 1995).

Como já referido acima, pouco se sabe sobre o papel dos linfócitos T citotóxicos na LTA. Estas células estão presentes tanto nas lesões de pacientes com LC como na LCM, porém estão ausentes nas reações de hipersensibilidade tipo retardada induzida por antígeno de *Leishmania*, sugerindo assim um papel destas células no dano tissular associado com estas formas clínicas (Modly et al. *apud* Barral-Netto et al, 1995).

A IL-10 tem sido responsabilizada pela redução na expressão de moléculas do CHP e, conseqüentemente, na apresentação de antígeno de *Leishmania* pelos macrófagos bem como na produção de citocinas por células Th1, cujo efeito se traduz numa ação inibitória do sistema de ativação macrofágico, fagocitose e morte intracelular de microrganismos (Mosmann & Moore, 1991).

A ação inibitória do TGF β sobre as células T citotóxicas e células NK estimuladas por antígenos parasitários pode ser devida ao bloqueio da ação do IFN γ , pois o TGF β neutraliza os efeitos leishmanicidas do IFN γ em macrófagos infectados por *Leishmania* tanto em humano como em modelo murino (Barral et al, 1996). Estudo realizado por Barral et al (1992) demonstrou, através de imunomarcação para TGF β em biópsias cutâneas de pacientes com LC e LCM, uma grande produção de TGF β por fibroblastos e ocasionalmente por outras células inflamatórias no sítio de lesão, principalmente nos primeiros dois meses de desenvolvimento da úlcera cutânea e da lesão mucosa ativa. Todas estas observações apontam para um papel fundamental do TGF β , produzido por macrófagos infectados, na persistência parasitária, mormente na fase inicial da infecção e na progressão da doença. O TGF β teria assim um papel relevante no mecanismo de virulência da *L.(V.) braziliensis* e, conseqüentemente, no mecanismo de evasão parasitária e no aumento da susceptibilidade à doença (Barral et al, 1995).

Um estudo recente demonstrou uma maior expressão de RNAm para TGF β em lesões de pacientes portadores de LC com mais de 4 (quatro) meses de doença comparativamente a lesões mais precoces (Melby et al, 1994). Reiteramos, portanto, que a produção local de TGF β está fortemente implicada na proliferação da *Leishmania*, e subseqüentemente, na progressão da doença.

Em várias patologias cutâneas, os queratinócitos, que expressam moléculas de classe II do CHP, são capazes de processar o antígeno bruto e apresentá-lo a células T previamente sensibilizadas, embora sejam fracos ativadores de células T quando em repouso (Moll, 1993). As células T, uma vez ativadas, tornam-se aptas a produzir IFN γ , que funciona como um sinal estimulatório para o aumento da expressão de antígenos classe II do CHP na superfície de

queratinócitos. Estas células, além de funcionarem como APC, são capazes de produzir citocinas que mantêm a expansão clonal de linfócitos T ativados. Os queratinócitos têm sido observados em lesões de pacientes com LC/LCM, mas não em lesões de pacientes com LCD. O TGF β inibe a expressão de classe II do CHM induzida pelo IFN γ e pode igualmente estar implicado numa menor indução de imunidade celular mediada por queratinócitos a nível das lesões causadas por *Leishmania* (Barral et al, 1995).

O TNF α é uma potente citocina imunomoduladora e pró-inflamatória que tem sido implicada na patogênese de diversas doenças infecciosas e auto-imunes. Níveis plasmáticos elevados de TNF α correlacionam-se positivamente com a gravidade e a mortalidade de doenças como a malária e a leishmaniose (Wilson et al, 1997). Estudos recentes têm descrito um polimorfismo genético na posição -308 do promotor de TNF α , mostrando que um raro alelo desta citocina está implicado nos fenômenos de auto-imunidade e alta produção de TNF α que podem ser demonstradas na lepra lepromatosa, malária e leishmaniose (Roy et al, 1997).

Contrariando o que ocorre na leishmaniose experimental, o TNF α pode estar presente em elevados níveis no soro de pacientes com LC, podendo então associar-se com uma resposta imune não protetora tipo tolerogênica, muitas vezes implicado no agravamento de outras doenças infecciosas (Da Cruz et al, 1996).

No soro de pacientes com LV (Barral-Netto et al, 1991) e LCD (Pisa et al, 1990), foram observados títulos relativamente elevados de TNF α , ambos caracterizados por uma falha da resposta imune mediada por clone de células T específicas anti-*Leishmania*. Entretanto, pacientes com LC caracterizados por uma resposta imune bem modulada, mostraram níveis de TNF α similares aos de indivíduos normais.

Na LC, o efeito protetor no hospedeiro mediado por TNF α , é capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões. Este efeito pode estar associado à presença de TNF α m (TNF α membranar), expresso nas superfícies de macrófagos e linfócitos. Em pacientes com LC, uma boa produção de TNF α m juntamente com outras citocinas poderiam induzir mecanismos envolvidos no processo de cura das lesões. Por outro lado, uma liberação excessiva de TNF α solúvel poderia exercer efeitos deletérios como ocorre nos casos de pacientes com LCM (Da Cruz et al, 1996).

De um modo geral, a indução preferencial de um tipo de resposta, Th1 ou Th2, dependerá do tipo de APC ou classe II do CHP, bem como do conjunto de citocinas apresentadas durante a maturação de precursores de células T CD4+. As citocinas podem influenciar, então, a sobrevivência inicial de *Leishmania* dentro do macrófago e determinar por último, um curso

dirigido à resistência ou susceptibilidade em relação ao desfecho da infecção por *Leishmania* dermatrópica (Kemp et al, 1996).

1.6. Patogênese da LTA

A ocorrência de leishmaniose clinicamente evidente está na dependência do tipo do parasito, da resistência natural do hospedeiro e da resposta imunocelular induzida pelo parasito, que representa a resistência adquirida (Barral-Netto et al, 1986).

Para a infecção se instalar no hospedeiro susceptível é necessária a endocitose das promastigotas pelo macrófago (células-alvo), que é precedida do contato intercelular, o qual pode envolver qualquer segmento da superfície do corpo do parasito (Chang, 1979).

Uma vez fagocitada pelos macrófagos, a *Leishmania* sp pode ser processada e apresentada às células T imunocompetentes sob a forma de polipeptídeos antigênicos (epítomos antigênicos) na superfície de macrófagos apresentadores de antígeno em associação com antígenos de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (CHP). Estes complexos funcionam como estímulo para a proliferação de linfócitos T ou linfócitos B (neste caso, em interação com imunoglobulinas de superfície), que uma vez ativados darão início às respostas imunocelular e humoral. Existe, ainda, a possibilidade destes macrófagos tornarem-se susceptíveis à destruição por intermédio da ação dos linfócitos T citotóxicos (neste caso, antígeno parasitário associado a moléculas de classe I do CHP) ou por mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo e mediado por leucócitos não linfocitários (Bryceson, 1970).

A capacidade inata ou adquirida do macrófago em destruir parasitos intracelulares parece estritamente relacionada com a eliminação ou controle da leishmaniose. A hipótese atualmente aceita é que a ativação de macrófagos via $IFN\gamma$, mediada por linfócitos T auxiliares $CD4+$, seja o principal mecanismo protetor que se estabelece contra a infecção (Locksley et al, 1987; Green et al, 1990)

A interação linfócito/macrófago parasitado também pode ser vista tanto nas lesões ativas como naquelas em regressão. O macrófago frequentemente aparece lisado por conta da ação lítica do linfócito T citotóxico/citolítico ($CD8+$), através de mecanismos dependentes de grânulos liberadores de granulicina. Por outro lado, o contato com o linfócito T aumenta a ação leishmanicida intracelular do macrófago parasitado (Panossian et al, 1984).

Segundo Bittencourt & Andrade (1967), existiria mais de um mecanismo de combate aos

parasitos: na fase inicial da doença, a maioria das formas amastigotas seria eliminada junto com o material necrótico através da úlcera; numa fase posterior ocorreria a degradação dos parasitos remanescentes a nível intracelular, o que precederia a resolução e cura da lesão.

Ademais, tem-se observado que na forma de doença em que o número de parasitos era restrito, a lise dos macrófagos ocorria em presença de amastigotas extracelulares. Entretanto, isto não fora observado nos casos em que os parasitos eram livremente tolerados. Estas relações sugeriam, na época, que os mecanismos básicos da doença dependeriam da toxicidade e da imunogenicidade dos antígenos do parasito. Parasitos bem “tolerados” poderiam alcançar níveis tissulares consideráveis. No caso de uma resposta imune efetora efetiva, um moderado número de parasitos seria necessário e suficiente para provocar uma necrose imunologicamente induzida (tipo hipersensibilidade) de macrófagos infectados, seguindo-se de cura. Por outro lado, cepas de parasitos consideradas presumivelmente mais tóxicas e pobremente “toleradas” pelo hospedeiro, não alcançariam grande densidade, mas mesmo assim seriam capazes de desencadear ulcerações cutâneas com necrose de macrófagos e dano tissular. A destruição de amastigotas extracelulares acompanhar-se-ia de alterações secundárias do colágeno ou tecido conjuntivo do derma, as quais poderiam ou não ser imunologicamente induzidas (Ridley, 1980).

A eliminação da *Leishmania* pode ser representada por 2 tipos de resposta imunohistológica; morte oxidativa intracelular através da ativação de macrófagos ou morte através da lise de macrófagos infectados. A lise, por sua vez, afeta células parasitadas isoladas ou em pequenos grupos. Após a erradicação das amastigotas, cada resposta evolui para um fraco granuloma tuberculóide, que pode ser observado em um menor número de casos (Ridley & Wells, 1986).

Análise imunopatológica tem sido realizada em pacientes com LC/LCM na região de Três Braços, Bahia, revelando a presença de uma infiltração histolinfoplasmocitária prevalente na maioria dos casos associada à reação fibrinóide, a qual parecia desempenhar o papel de exsudação inflamatória inespecífica como resposta à presença de um irritante tecidual tais como parasitos extracelulares ou complexos antígeno-anticorpo ou ambos (Magalhães et al, 1986a). Nos casos de LCM, entretanto, não se pôde afastar a possibilidade de que esse infiltrado estivesse participando de uma reação do tipo auto-imune (tipo infiltrativo, lítico com ausência de parasito). O plasmócito, quando presente nas lesões residuais, era indicador forte de tendência à recidiva. Os mastócitos estavam em número significativamente maior no local onde os fenômenos necróticos eram bem mais proeminentes. Os eosinófilos estavam fortemente associados com mastócitos, confirmando assim a existência de um eixo bidirecional no qual

estes dois tipos celulares participariam da modulação com a reação inflamatória dérmica na LC em fase evolutiva inicial (Magalhães et al, 1986a). A presença de granuloma desorganizado foi interpretada como sendo de origem pós-necrótica, surgindo após a redução da carga parasitária local propiciada pelo fenômeno necrótico de hipersensibilidade. O granuloma organizado foi caracterizado como granuloma epitelióide, que podia surgir em dois grupos de pacientes. Nos pacientes jovens com doença de curta duração e com IDRM+, mas não exacerbado, este tipo de granuloma seria a expressão da hipersensibilidade granulomatosa específica, originalmente descrita por Epstein (1977). No outro grupo havia em todos IDRM fortemente positivo, exacerbado. Nestes casos, a hipersensibilidade granulomatosa associada à imunidade celular amplificar-se-ia por seqüestro de antígeno parasitário, o que reforçaria o processo granulomatoso por reverberação do estímulo antigênico e provável recrutamento e ativação de um maior contingente de células apresentadoras de antígeno (APC). Tal via imunoregulatória de amplificação tornaria o tratamento mais difícil e com pior prognóstico (Magalhães et al, 1986b), pois prenunciaria um maior índice de recidivas e, conseqüentemente, complicações tardias sob a forma de mutilação de mucosa nasal e de orofaringe.

Moraes et al (1993) suspeitaram que os agentes da LC/LCM, após penetrarem no organismo hospedeiro, poderiam alojar-se em órgãos do sistema fagocítico mononuclear (SFM), permanecendo nestes durante muito tempo ou talvez por toda a vida do indivíduo. Eventualmente, sob a ação de fatores diversos, capazes de afetar a resistência do hospedeiro, as amastigotas poderiam migrar para a pele ou mucosas, determinando lesões secundárias metastáticas ou de reativação.

Embora pouco se saiba sobre a imunopatologia da forma progressiva e destrutiva da LCM, algumas das possíveis causas da resposta hiperérgica são: 1- resistência por “escape” e maior virulência de algumas cepas de *Leishmania*, e assim, a persistência de antígenos “alérgicos”(superantígenos?) que evocam a resposta inflamatória de hipersensibilidade através da mediação de várias famílias de receptores linfocitários T; 2- fenômeno auto-imunitário relacionado com reações cruzadas entre antígenos de *Leishmania* e peptídeos do hospedeiro (Grimaldi & Tesh, 1993). O polo extremo do espectro imunopatológico pode ser representado pela forma dita leishmaniose “recidivans” ou forma lupóide.

Uma visão distinta sobre a imunopatologia da LCD foi defendida por Bittencourt & Freitas (1983) que observaram aspectos ultra-estruturais reveladores de uma resposta à mediação celular: lise de macrófagos albergando amastigotas de *Leishmania*, contato direto entre macrófagos parasitados e linfócitos, infiltrado linfocitário e fibrose. Assim, eles sugerem existir

na LCD uma limitada resposta imune-celular, insuficiente para controlar a infecção.

Vários fatores podem estar envolvidos na patogênese da LC, dentre eles o tipo de resposta imune do hospedeiro frente a parasitos e a seus produtos. Comparando a resposta do linfonodo com a resposta na pele, observa-se a resposta ocorre de modo diferenciado nos dois sítios. No primeiro parece ocorrer aparentemente um controle da infecção, num espaço de tempo relativamente curto, isto é, em 80% dos pacientes que desenvolvem linfadenopatia ocorre resolução da adenomegalia antes do estabelecimento da terapêutica, levando em média 5 semanas. Já com a lesão na pele, a história natural da LC tem demonstrado um curso mais lento, levando à cura num prazo de 5 anos (Herwaldt et al, 1992).

Nesse sentido, o estudo do tipo de resposta que se desenvolve no linfonodo parece ser de fundamental importância para melhor compreender a patogênese da leishmaniose cutânea

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a patogênese da linfadenopatia causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

2.2 Específicos

2.2.1 Descrever as alterações histológicas observadas em linfonodos regionais de pacientes com linfadenopatia leishmaniótica;

2.2.2 Caracterizar *in situ* algumas sub-populações celulares (linfócitos T CD4+, linfócitos T memória e macrófagos) prevalentes na linfadenopatia leishmaniótica;

2.2.3 Avaliar *in situ* as citocinas inflamatórias (TNF α e TGF β);

2.2.4 Avaliar a carga antigênica *in situ*;

2.2.5 Correlacionar os achados clínicos, morfológicos e imunohistoquímicos na linfadenopatia leishmaniótica

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Critério de seleção dos pacientes

Utilizamos um total de 26 biópsias de linfonodos processadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Faculdade de Medicina da UFC no período de 1987-1990. As amostras foram obtidas de pacientes com LC provenientes do Hospital São José e Hospital Universitário Walter Cantídio.

Foram incluídos no estudo somente os pacientes que tiveram o diagnóstico de leishmaniose tegumentar comprovado parasitologicamente, quer através da cultura (do linfonodo ou da pele da lesão) ou através da demonstração de amastigotas de *Leishmania* no exame histopatológico ou em “inprints” de material de biópsia.

As cepas obtidas por isolamento a partir de meio de cultura NNN foram todas identificadas como *L.(V.) braziliensis* através de métodos isoenzimáticos e por anticorpos monoclonais (Vasconcelos, 1996).

3.2- Estudo histopatológico

As amostras de linfonodos foram fixadas em Lavdowsky (formol/etanol/ácido acético/água), processadas e incluídas em parafina. O material foi cortado em secções de espessura de 5-6 μm e corado pela hematoxilina-eosina. As colorações de Wade e Grocott foram também realizadas para a pesquisa de micobactérias e fungos, respectivamente.

O estudo histopatológico foi realizado nas 26 amostras, sendo feito então levantamento sistemático das alterações microscópicas observadas.

3.3- Estudo imunohistoquímico

Para o estudo imunohistoquímico foram analisadas 11 amostras que foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo com 5-6 μm de espessura, aderidas em lâminas previamente preparadas com Poly-L-Lisina (SIGMA) e processadas pela técnica da imunoperoxidase utilizando o sistema biotina-avidina (Guesdon et al, 1979).

Os anticorpos monoclonais utilizados como marcadores das populações e subpopulações celulares foram os seguintes: macrófagos: CD68, clone PG-M1 (Catálogo N° M 876, Dako

Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA); linfócitos T memória: CD45RO, clone UCHL1 OPD4 (Catálogo N° M 0834, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA); linfócito T CD4+: CD45RO, clone OPD4 (Catálogo N° M 742, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA).

As citocinas foram marcadas utilizando-se os seguintes anticorpos policlonais: anti-Fator de Necrose Tumoral *alpha* (anti-TNF α) humana (Catálogo IP-300, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA); anti- Fator de Transformação do Crescimento beta (anti-TGF β): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY.

O antígeno de *Leishmania* foi marcado pelo anticorpo policlonal anti-*Leishmania*, produzido em coelho (LIMC- FIOCRUZ-BA).

Para a detecção destes marcadores, secções das amostras foram desparafinizadas em xilol, acetona e álcool, e posteriormente, hidratadas em álcool 70%, 50% e 30%, água corrente e água destilada, e lavadas com solução salina tamponada PBS pH 7,4. Após a hidratação, os cortes foram incubados com tripsina 0,1% em PBS-BSA 2% por 30 minutos nos casos dos anticorpos para TNF α , TGF β e macrófagos. As ligações inespecíficas dos marcadores de citocinas (TNF α e TGF β) e antígeno de *Leishmania* foram bloqueadas com o soro de cabra 10% em PBS pH 7,4, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Para os marcadores das subpopulações celulares foi utilizado leite mólico a 10% em PBS pH 7,4, sendo todos incubados por 30 minutos à temperatura de 37° C. Prosseguiu-se, então, com a incubação dos anticorpos monoclonais nas seguintes diluições: CD45RO, clone OPD4 - 1:100; CD45RO, clone UCHL1 - 1:200; CD68 - 1:25 e os policlonais anti-TNF α - 1:250; anti-TGF β - 1:200; e anti-*Leishmania* - 1:1500, sendo todos incubados em câmara úmida pelo mínimo de 12 horas (pernoite) à temperatura de 4°C. Decorrido o tempo de incubação dos anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS-BSA 2% e incubados com os anticorpos secundários biotinilados [anti-IgG de coelho, produzidos em cabras (VECTOR)] usados na diluição de 1:800, no caso das citocinas e antígeno de *Leishmania*; em se tratando das populações celulares usamos os anticorpos secundários biotinilados [(anti-IgG de camundongo, produzidos em cavalos (VECTOR)] na diluição de 1:800, durante 45 minutos à temperatura de 37°C. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS pH 7,4, sendo então feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando o metanol a 3% em água oxigenada por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram novamente lavados em tampão PBS pH 7,4 e incubados com o complexo avidina-biotina (VECTOR), da seguinte forma: 1 μ l de avidina mais 1 μ l de biotina em 50 μ l de PBS pH 7,4, durante 30 minutos à temperatura de 37°C. Para a revelação da reação formada pelo sistema avidina-biotina, utilizamos o cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB, 1mg/ml) diluído na

proporção de 250mg/10ml em água destilada e posteriormente ativada pelo peróxido de hidrogênio a 0,4% preparado no momento da reação, da seguinte forma: 2 µl de tampão PBS pH 7,4 mais 48µl de solução estoque de DAB mais 2 µl de peróxido de hidrogênio 4%. Os cortes, então, foram incubados em ambiente escuro por 2 minutos. Após revelação, os cortes foram mergulhados em água corrente e água destilada e contra-corados com a hematoxilina de Harris, filtrada através de banhos rápidos. Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos, desidratados e montados com bálsamo do Canadá.

Deve-se ressaltar que, para cada reação, utilizamos controles positivos de pele infectada com *Leishmania* (para marcar material antigênico), amígdala normal e linfonodos reativos (para marcar as populações, subpopulações celulares e citocinas). Como controles negativos, procedeu-se à substituição do anticorpo primário por soro não-imune.

A quantificação das sub-populações celulares e de células com Ag de *Leishmania* foi feita utilizando um retículo padrão de pontos, segundo o método de AHERNE modificado (Aherne, 1967). A contagem das células marcadas foi feita de acordo com a sua localização entre as linhas do retículo e não através das células que coincidiam com os pontos do retículo, como descrita no método original. A leitura foi feita através da contagem de 10 (dez) campos aleatórios, correspondendo a 10 (dez) áreas do retículo, com a objetiva de 40X, estimando-se o percentual de células marcadas em relação ao total de células contadas.

As citocinas TNF α , TGF β foram quantificadas usando escores de 0 a 4, em que o 0 correspondia à ausência de marcação; 1, até 25 células marcadas; 2, até 50 células marcadas; 3, até 75 células marcadas; 4, até 100 células marcadas. Foram contados 20 campos aleatórios, através da modificação do método de AHERNE, estimando-se o índice através da seguinte fórmula: Σ frequências (0-20 campos) x intensidade da variável em questão (0-4+) calculado em termos de índice relativo: índice da variável em questão/índice máximo, que significava a frequência máxima (20 campos) x intensidade máxima (4+) X 100.

3.4- Análise Estatística:

A comparação entre as frequências de amostras qualitativas foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-Quadrado para amostras não pareadas (χ^2). A correlação entre variáveis quantitativas foi analisada pelo coeficiente de Pearson (r).

4.0 RESULTADOS

4.1 Dados clínicos

Foram estudados 26 pacientes com LC apresentando linfadenopatia como uma manifestação importante da doença. Todos os pacientes foram provenientes do Hospital São José ou do Hospital Universitário Walter Cantídio.

A idade dos pacientes variou de 9 a 50 anos, sendo 23 do sexo masculino e apenas 3 do sexo feminino.

Os linfonodos eram clinicamente palpáveis, com tamanho variando de 20 a 120 milímetros de diâmetro, localizados na área de drenagem da lesão cutânea, mais frequentemente na região femural (62%), sendo que 3 pacientes não tinham ainda apresentado lesão cutânea até o momento da avaliação. O tempo de evolução da linfadenopatia variou de 1 a 20 semanas (TAB. 1).

TABELA 1: Dados clínicos e laboratoriais de 26 pacientes com linfadenopatia leishmaniótica

Nº	Paciente		Linfonodo			Lesão	
	Idade	Sexo	Localização	Tamanho (mm)	Duração (sem.)	Tamanho (mm)	IDRM (mm)
1	50	M	Inguinal	25	9	10	ND
2	38	M	Femural	70	6	15	6
3	24	M	Femural	120	7	5	ND
4	50	M	Axilar	22	1	8	ND
5	15	M	Femural	ND	18	0	9
6	25	M	Axilar	25	8	10	0
7	18	M	Femural	ND	20	20	ND
8	ND*	M	ND	ND	ND	ND	ND
9	15	M	Femural	ND	14	5	3
10	16	M	ND	ND	2	ND	0
11	26	M	Femural	ND	4	ND	0
12	15	M	Femural	ND	6	ND	ND
13	17	M	Femural	80	4	5	18
14	15	M	Femural	30	8	20	12
15	45	M	Femural	50	6	0	11
16	17	M	Femural	50	6	ND	10
17	9	F	Femural	30	12	25	25
18	13	F	Cervical	40	8	10	13
19	9	M	Axilar	25	2	2	4
20	12	M	Femural	65	6	6	8
21	14	F	EpitrocLEAR	90	8	10	27
22	40	M	Femural	30	15	40	14
23	41	M	Femural	40	4	0	20
24	ND	M	supraclavic.	ND	3	ND	5
25	ND	M	ND	ND	8	ND	ND
26	19	M	Femural	50	16	45	35

*ND - dados não disponíveis

4.2 Análise histológica

O quadro que mais chamou atenção nos pacientes com LC, que desenvolveram linfadenopatia como um dos primeiros sinais da doença, foi o de uma linfadenite crônica, observada em 96% dos pacientes estudados. Somente um paciente não apresentava linfadenite, observando-se apenas uma hiperplasia reacional intensa, associada a discreta perilinfadenite. Este paciente encontrava-se com sete semanas de evolução (ANEXO 1)

A linfadenite crônica caracterizou-se pela exsudação histiocitária, que variou de discreta a intensa, com histiócitos distribuídos difusamente ou em focos, quer como células isoladas, ou em grupamentos, de tamanho variado, chegando à formação de granulomas. A linfadenite granulomatosa ocorreu em 23 (92%) dos linfonodos, predominando os com intensidade moderada ou acentuada, 17 (68%) (FIG. 1; FIG. 2A, 2B). Os granulomas se distribuíam difusamente através do parênquima, às vezes circundando os folículos linfóides, ou ao longo dos seios linfáticos. Por vezes se confluíam, formando nódulos de tamanhos variáveis com poucas células gigantes (40 %), tanto do tipo Langhans como de corpo estranho. As células gigantes foram predominantemente observadas no período com mais de 7 semanas ($p=0,001$) (TAB. 5).

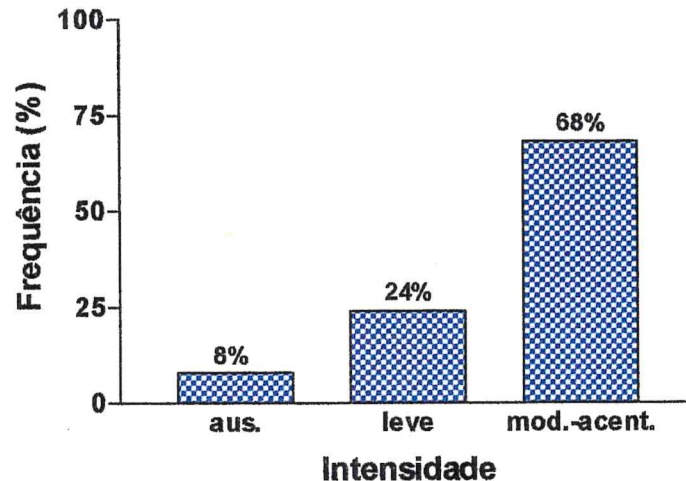


FIGURA 1 : Frequência de granuloma na linfadenite leishmaniótica

Na linfadenite granulomatosa foram observados dois tipos de granulomas: não-organizados e organizados. Os primeiros predominaram nas sete primeiras semanas de evolução, diminuindo de frequência após este período, enquanto que os granulomas organizados eram mais frequentes após a 7ª semana (FIG. 3). Além disso, houve uma associação positiva entre IDRMs e

presença de granulomas organizados, embora não tenham sido estatisticamente significantes, provavelmente pelo tamanho da amostra.

Os dois linfonodos que não tinham granulomas estavam com 4 e 9 semanas de evolução e apresentavam linfadenite crônica intensa, caracterizada por exsudação histiocitária e histiocitose sinusal intensas, associadas a extensa necrose (ANEXO 1).

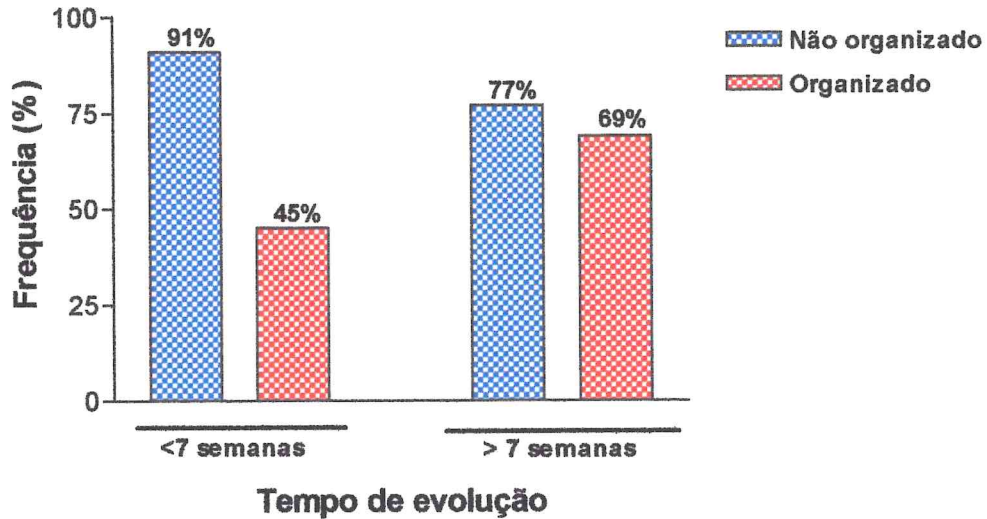


FIGURA 3: Frequência de diferentes tipos de granulomas na linfadenite leishmaniótica

A linfadenite estendia-se além da cápsula, comprometendo o tecido conjuntivo subjacente, sendo observada em 96% dos casos. O infiltrado inflamatório variou de discreto a intenso, por vezes comprometendo toda a região, englobando vários linfonodos da cadeia linfática acometida. Em seis pacientes (25%) foram observados granulomas no infiltrado inflamatório perilinfonodal. Após a 7^a semana verificou-se uma redução na frequência da perilinfadenite.

Um outro achado importante foi a necrose, ocorrendo em 15/25 (60%) dos casos, muitas vezes, localizada no interior dos granulomas e acometendo extensas áreas do parênquima envolvendo tanto a zona cortical como a medular (FIG. 4; FIG. 5A).

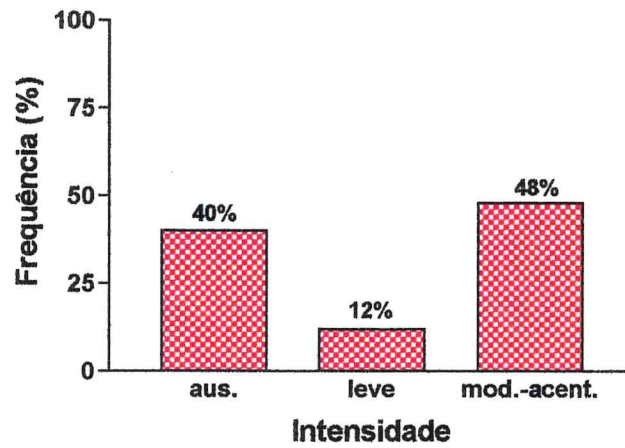


FIGURA 4: Frequência de necrose na linfadenite leishmaniótica

Observou-se necrose caseosa em 40% dos linfonodos, lembrando o quadro da linfadenite tuberculosa; outras vezes a necrose era do tipo fibrinóide 4/15 (27%), ocorrendo simultaneamente os dois tipos de necrose em 5 casos (33%) (TAB. 2).

Tabela 2: Tipos de morte celular na linfadenopatia leishmaniótica

Morte celular								
Necrose							Apoptose	
Caseosa		Fibrinóide		Caseosa/Fibrinóide				
	Pres.	%	Pres.	%	Pres.	%	Pres.	%
Frequência	6	40	4	27	5	33	22	88

A apoptose, outro tipo de morte celular, foi observada em 88% dos casos, tendo sido identificada histologicamente pelo achado de corpos apoptóticos, ocorrendo em grandes focos nas áreas de histiocitose ou de células isoladas no centro germinativo dos folículos linfóides. Foi vista com maior frequência nas sete primeiras semanas de evolução (TAB.3, FIG. 6; FIG. 7A, 7B).

TABELA 3: Evolução dos tipos de morte celular na linfadenopatia leishmaniótica

Tipos de morte celular	Tempo de Evolução	
	<7 semanas	>7 semanas
Apoptose	11 (100%)	10 (77%)
Necrose	7 (64%)	7 (54%)

Um aspecto particular da linfadenite leishmaniótica foi a histiocitose, que assumiu características peculiares. Ela comprometia os seios linfáticos de modo intenso e difuso em 96% dos casos, por vezes dilatando-os, obliterando-os e formando verdadeiras faixas histiocitárias com conseqüente distorção da arquitetura do linfonodo (TAB. 4, FIG. 8A). Apoptose isolada ou associada a necrose caseosa era frequentemente observada, acometendo extensas áreas da histiocitose (FIG. 8A).

Verificou-se uma correlação inversa entre a intensidade da histiocitose e o tamanho da IDR. M.

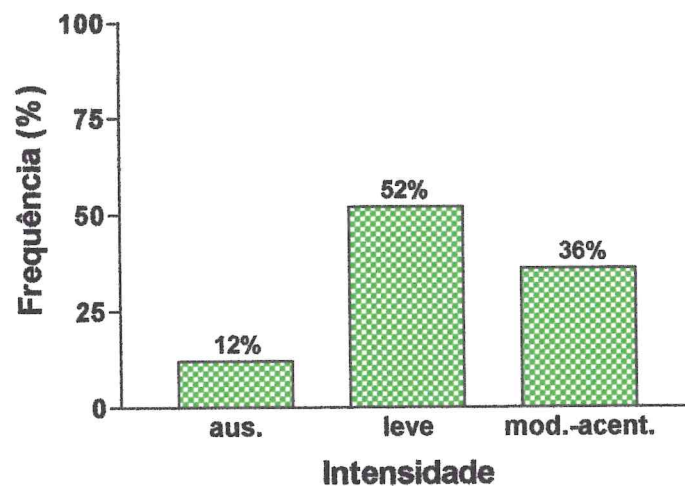
**FIGURA 6: Frequência e intensidade da apoptose na linfadenopatia leishmaniótica.**

TABELA 4: Frequência de histiocitose sinusal na linfadenopatia leishmaniótica

Histiocitose					
Focal		Difusa		Total de Histiocitose Sinusal	
Aus	Pres	Aus	Pres	No	%
21	5	6	20	24	96

A plasmocitose variou de discreta a intensa, estando presente em 25/26 (96%) dos linfonodos, 46% dos casos apresentaram plasmocitose intensa, sendo verificada com menor frequência nos linfonodos com maior tempo de evolução (TAB. 5). Observou-se uma associação positiva entre a intensidade da plasmocitose e o tamanho da IDRM ($p=0,04$).

Os neutrófilos eram raros e presentes em 27% dos casos, enquanto que os eosinófilos foram observados em 35% deles, aumentando de frequência a partir da sétima semana, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa (TAB. 5).

TABELA 5: Frequência das células inflamatórias nos dois períodos de tempo analisados na linfadenopatia leishmaniótica

Tipos de células do exsudato	Tempo de Evolução	
	<7 semanas	>7 semanas
Plasmócitos	11 (100%)	12 (92%)
Histiocitose parenquimal	11 (100%)	13 (100%)
Neutrófilos	2 (18%)	4 (31%)
Gigantócitos	1 (9%)	10 (77%)*
Eosinófilos	3 (27%)	6 (46%)

* $p < 0,05$

Observou-se fibrose em 77% dos casos estudados. Dentre os linfonodos que tinham fibrose, 35% apresentavam-na de intensidade moderada a acentuada, dispendo-se focalmente subjacente à cápsula, ou de modo difuso septando áreas do parênquimas (FIG. 9; FIG. 10A, 10B). Um linfonodo com 16 semanas de evolução apresentava escassos granulomas, sendo dois deles completamente fibrosados. A fibrose ocorreu com maior frequência nas sete primeiras semanas de evolução (TAB. 6) e era de maior intensidade nos pacientes que apresentavam IDRMs mais reativa ($p = 0,05$).

TABELA 6: Evolução da linfadenite na leishmaniose cutânea.

	Tempo de Evolução	
	<7 semanas	>7 semanas
Linfadenite	11/11 (100%)	13/13 (100%)
Perilinfadenite	10/10 (100%)	12/13 (92%)
Fibrose	10/11 (91%)	9/13 (69%)

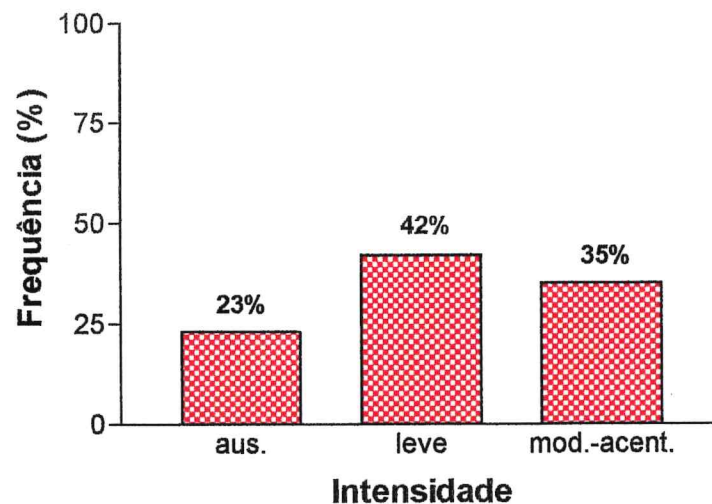


FIGURA 9: Frequência de fibrose na linfadenopatia leishmaniótica

Todos os linfonodos apresentavam estado reacional associado à linfadenite, predominando histiocitose sinusal e hiperplasia paracortical (96%), ambas foram observadas de modo mais intenso após a 7ª semana. A histiocitose sinusal foi intensa em 21/26 (81%) dos linfonodos. Hiperplasia folicular foi observada menos frequentemente a partir da 7ª semana ($p < 0,05$) (TAB. 7, TAB. 8).

TABELA 7: Linfadenopatia leishmaniótica: ocorrência e tipos de hiperplasia reacional

Hiperplasia reacional					
Hiperplasia folicular		Hiperplasia Paracortical		Histiocitose Sinusal	
Pres	%	Pres.	%	Pres.	%
18	69	25	96	25	96

TABELA 8: Evolução dos tipos de estado reacional na linfadenopatia leishmaniótica

Tipos de estado reacional	Tempo de Evolução	
	<7 semanas	>7 semanas
Hiperplasia paracortical	11 (100%)	13 (100%)
Histiocitose sinusal	10 (91%)	13 (100%)
Hiperplasia folicular	10 (91%)	7 (54%)*

*p <0,05

Para fazer o diagnóstico diferencial com tuberculose e micoses, todas as lâminas foram avaliadas nas colorações de Wade e Grocott, não sendo encontrado nenhum dos dois microorganismos nas amostras analisadas.

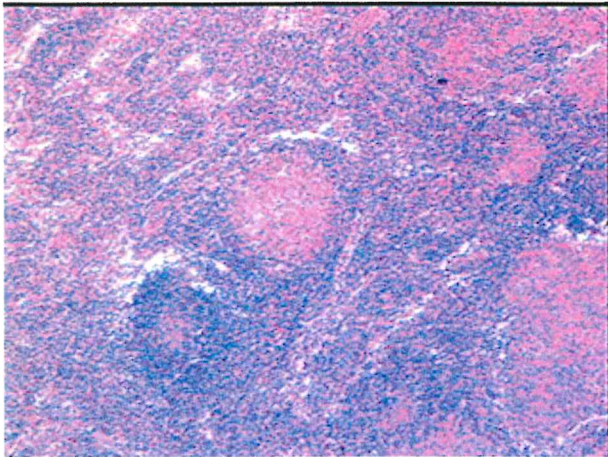


FIGURA 2A Linfadenite leishmaniótica rica em granulomas (10X)

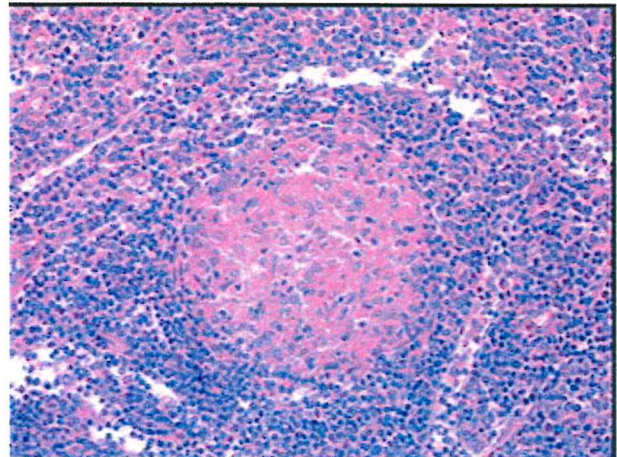


FIGURA 2B- Destaque para o granuloma organizado na linfadenite leishmaniótica (detalhe da figura 2A) (40X)

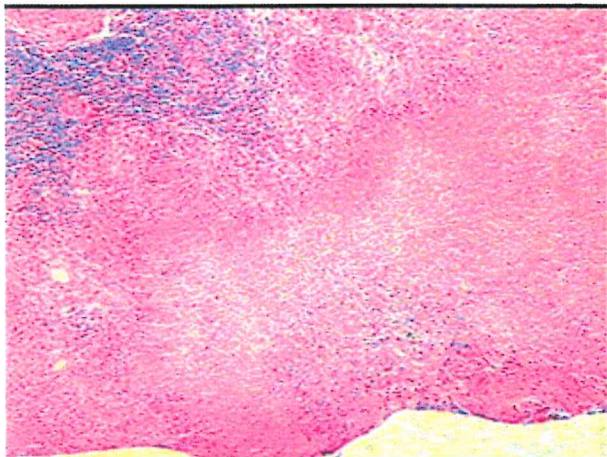


FIGURA 5A Extensa área de necrose caseosa no centro de granulomas confluentes (10X)

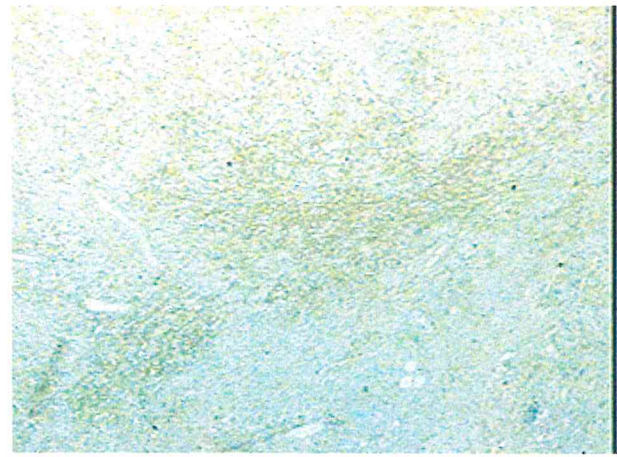


FIGURA 5B- Marcação de TNF α na interface do granuloma com área de necrose (10X)

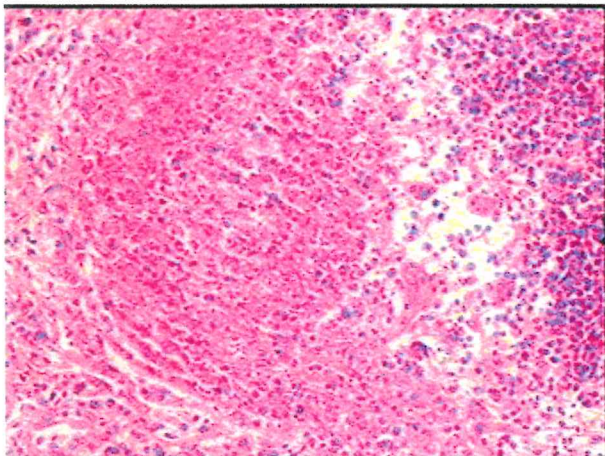


FIGURA 7A Intensa apoptose em área de histiocitose (40X)

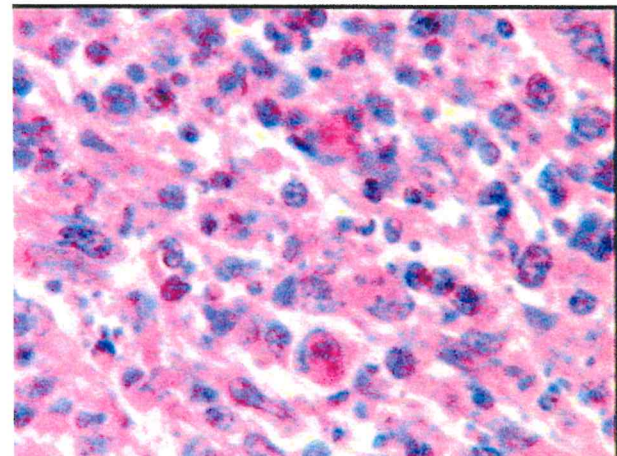


FIGURA 7B Destaque para os corpos apoptóticos fagocitados por células mononucleares em área de histiocitose (detalhe da fig. 7A) (100X)

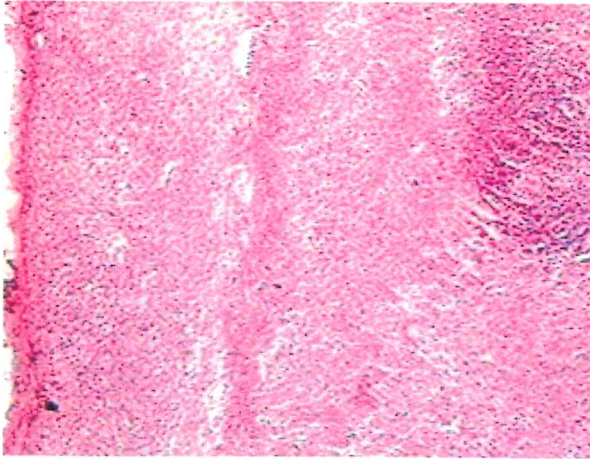


FIGURA 8A Intensa histiocitose alargando e obliterando o seio subcapsular, com faixa de necrose (10X)

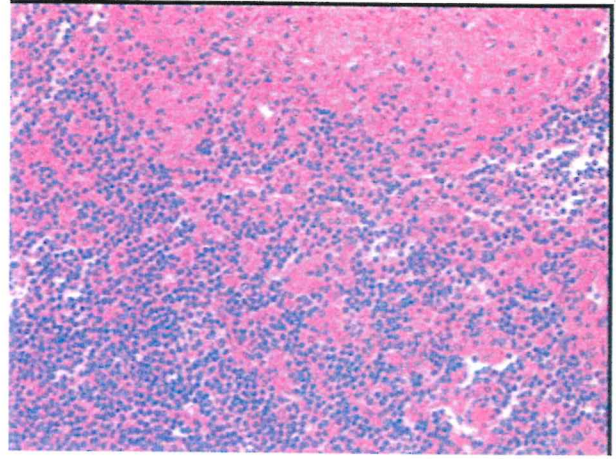


FIGURA 8B Exsudação histiocitária com células isoladas e granuloma não organizado (40X)

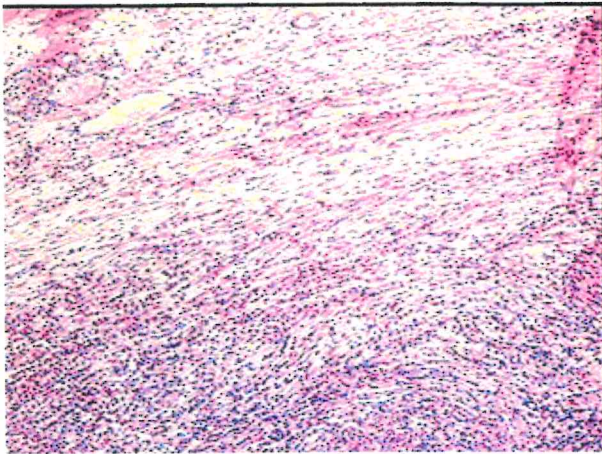


FIGURA 10A Área de fibrose acometendo a cortical subjacente a cápsula (10X)

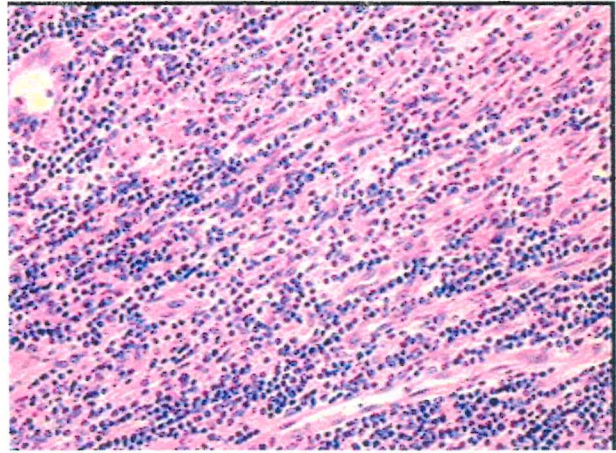


FIGURA 10B Proliferação de capilares com discreta deposição de colágeno (detalhe da fig 10A) (40X)

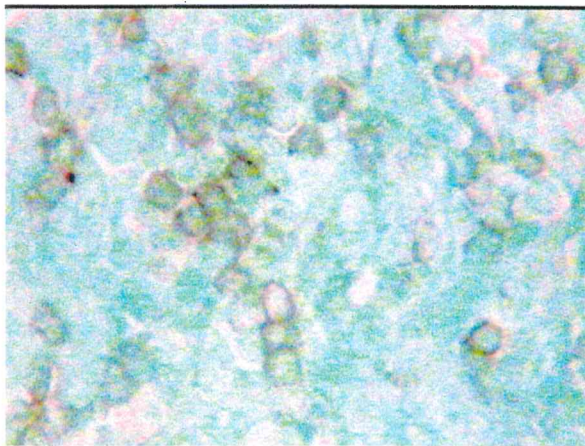


FIGURA 12A Marcação de membrana de linfócitos T CD4+ ativados (CD45RO) (100X)

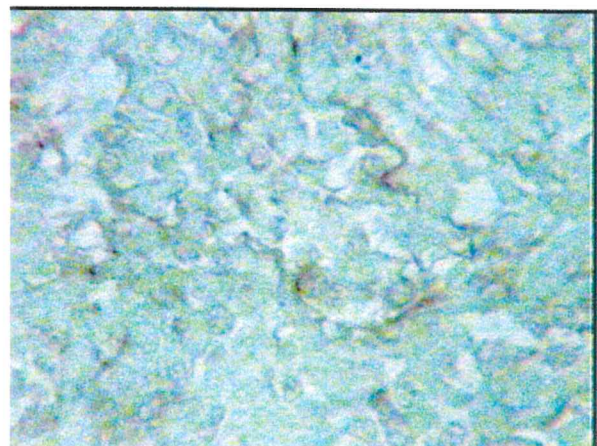


FIGURA 12B Marcação de produtos de degradação de *Leishmania* no interior de células epitelióides (100X)

4.2 Análise imunohistoquímica

Analisando o perfil imunocelular que constituiu o quadro da linfadenite leishmaniótica, observou-se uma grande dispersão na frequência de LT auxiliar, LT memória e macrófagos (FIG. 11a), chamando atenção a frequência de LT memória, com uma média de $35 \pm 15.3\%$, correspondendo a 84% da população de LT auxiliar (LTh) (FIG. 12; ANEXO 2). Outro aspecto importante foi o aumento da população de macrófagos, já descrito previamente nos aspectos morfológicos. Chamou atenção o aumento da frequência de LT memória (LTmem.) observada nos linfonodos com mais de sete semanas de evolução, chegando a ser 1,4 vezes maior que a verificada nas sete primeiras semanas (FIG. 11b), embora não tivesse sido estatisticamente significativa, possivelmente pelo tamanho da amostra.

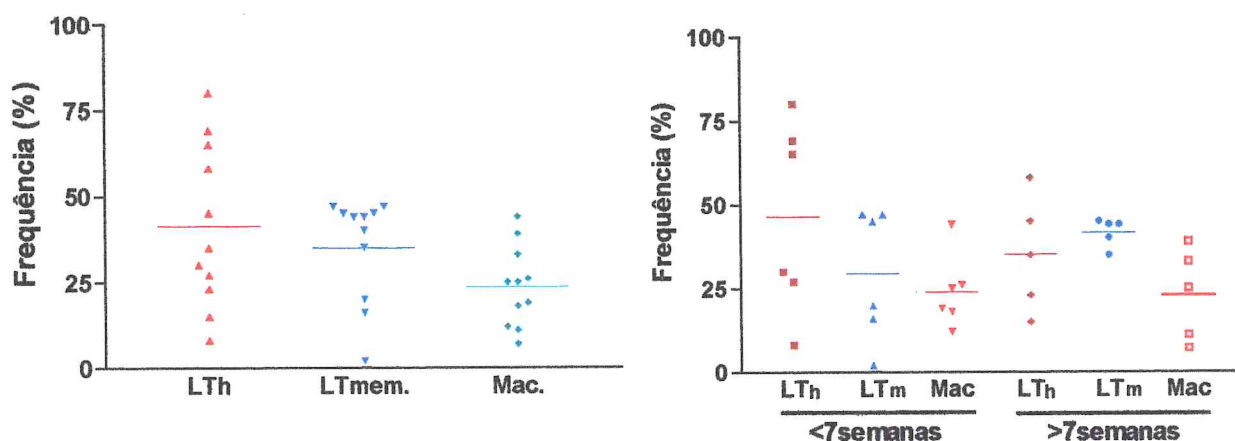


FIGURA 11: Frequência das sub-populações celulares na linfadenopatia leishmaniótica: a) em todos os linfonodos avaliados; b) nos linfonodos mais ou menos sete semanas.

O $\text{TNF}\alpha$ foi observado no interior de macrófagos, linfócitos e parede vascular, aparecendo de modo proeminente na interface do granuloma com a necrose (Fig. 5B). Comparando o índice relativo de $\text{TNF}\alpha$ nos linfonodos, antes e após a sétima semana de evolução, verificou-se que nos últimos, o $\text{TNF}\alpha$ aumentou 1,9 vezes em relação ao das sete primeiras semanas ($P = 0,03$) (FIG. 13).

O $\text{TGF}\beta$ foi observado no interior de macrófagos e membrana de linfócitos, distribuindo-se difusamente no parênquima do linfonodo, não havendo diferença significativa entre os dois períodos da evolução (FIG. 13).

O antígeno de *Leishmania* foi detectado como amastigotas ou com fina marcação no citoplasma de macrófagos. Em quatro linfonodos observou-se antígeno de *Leishmania* adsorvido no endotélio de vênulas pós-capilares, conjuntivo e em áreas de necrose no interior de granulomas (FIG. 14).

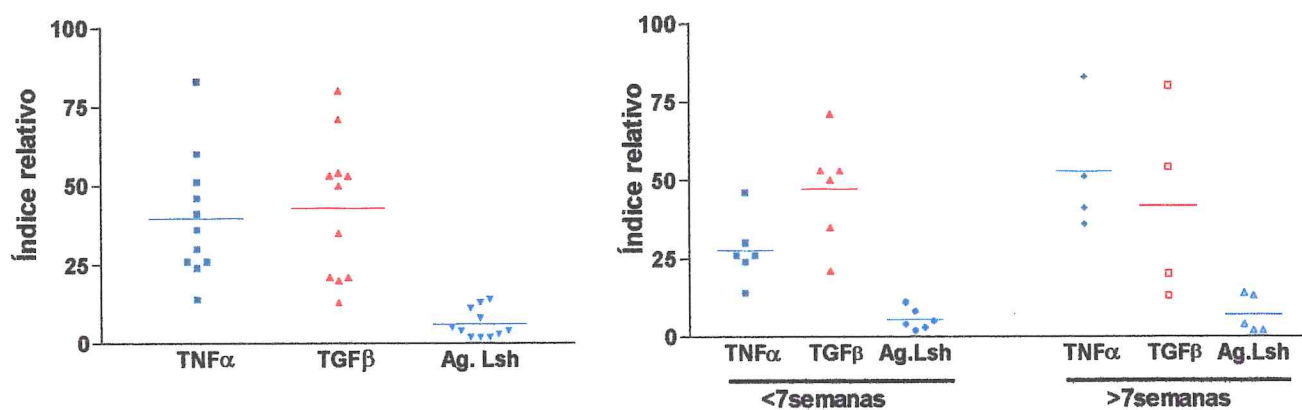


FIGURA 13: Expressão de TNF α , TGF β e Ag. *Leishmania* na linfadenopatia leishmaniótica: a) em todos os linfonodos; b) antes e após a sétima semana de evolução.

5 DISCUSSÃO

Comprometimento de linfonodos na LC tem sido relatado, tanto no velho mundo (Bell et al, 1958; Daneshbod, 1978; Azadeh, 1985; Kumar et al, 1987) como nas Américas (Berger et al, 1985; Barral et al, 1992; Moraes et al, 1993; Sousa et al, 1995). Estes estudos fazem relatos que ressaltam em parte os aspectos clínicos e imunológicos dos casos permanecendo, ainda, muitos aspectos da patogênese desta entidade obscuros.

O presente estudo, embora apresentando as limitações de um estudo transversal e com uma casuística pequena, traz elementos que corroboram dados da literatura, bem como subsídios que podem servir de base para novas investigações.

A característica básica desta linfadenopatia é o desenvolvimento de um quadro de intensa linfadenite crônica, predominantemente granulomatosa, acompanhada de necrose caseosa e/ou fibrinóide. Embora a casuística avaliada seja reduzida, foram detectados pelo menos três tipos distintos de resposta: linfadenite crônica não granulomatosa, a granulomatosa e, hiperplasia reacional, todas elas associadas à perilinfadenite.

O quadro histológico da linfadenite não granulomatosa dos casos estudados correspondeu a uma histiocitose intensa, com grande número de células em apoptose e necrose caseosa ou fibrinóide, tendo sido observado alguns gigantócitos. É possível que este quadro possa representar uma etapa inicial na formação do granuloma epitelióide, ou uma resposta imune celular frustra.

Analisando a evolução da linfadenopatia na LC, Sousa et al (1995) observaram que em 80% dos pacientes a adenomegalia desaparecia antes do início do tratamento, indicando o aspecto auto-limitado da reação no linfonodo, bem como o controle da infecção neste sítio. Estes autores referiram também, numa fração não negligenciável dos pacientes com LC um quadro de doença sistêmica caracterizado por febre, perda de peso e discreta hepatoesplenomegalia, o que suscitou a hipótese de uma disseminação linfo-hematogênica da *L.(V.) braziliensis*. Os autores obtiveram sucesso, em uma única ocasião, no isolamento de *L.(V.) braziliensis* por semeadura do “buffy coat” em meio NNN. Não é tido como improvável que o primeiro acastamento à distância, a nível de mucosa nasal ou de orofaringe, da *Leishmania*, se faça durante este breve período inicial de disseminação hematogênica do parasito. É plausível se admitir também que os pacientes que se apresentam somente com linfadenopatia leishmaniótica, possam representar uma forma subclínica da LC, associada

com o controle natural da infecção e obviamente a cura do paciente com imunização duradoura sem a necessidade de tratamento específico (Barral et al, 1995).

Como observado por Ridley (1979a) e Magalhães et al. (1986a), o controle da infecção parece ser mediado pelo granuloma maduro ou imune com ativação de macrófagos por citocinas e produção de radicais livres derivados da redução do oxigênio e da L-arginina (óxido nítrico) (Ridley & Wells, 1986; Liew, 1991; Gross et al, 1992). Pudemos observar em nosso material que os granulomas pareciam surgir em presença de antígeno de *Leishmania* (dados estatisticamente não significativos), tornando-se cada vez mais organizados e capazes de conter a proliferação da *Leishmania*. Um dos pacientes (não incluído no estudo), foi diagnosticado inicialmente com doença de Hodgking, tendo mesmo iniciado a quimioterapia anti-tumoral. Este paciente após 32 semanas de evolução, apresentou em biópsia para avaliação do tratamento, um quadro importante de histiocitose sinusal e parenquimal difusas, com extensas áreas de necrose fibrinóide e discreta apoptose, porém sem formação de granuloma, e conseqüentemente sem controle da infecção. A recuperação e a cura na leishmaniose cutânea estão fortemente associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune efetora mediada por linfócitos T CD4+, fenótipo Th1, e com a ativação de macrófagos e formação de granulomas. Após a primo-infecção por *Leishmania*, os indivíduos em geral desenvolvem imunidade duradoura à re-infecção ou reativação, a qual pode ser avaliada pela IDRM (Barral-Netto et al, 1995; Kemp et al 1996).

A LC com linfadenopatia assemelha-se, em muitos aspectos, à tuberculose primária, tanto em relação ao aspecto morfológico da lesão, como pelo acometimento de dois sítios topográficos (ganglionar e parenquimatoso), como em aspectos clínicoepidemiológicos, ou seja, a maioria desenvolve o complexo primário com controle da infecção e evolução para a cura espontânea, como documentado em indivíduos da área endêmica do Maciço de Baturité, onde pôde-se recentemente estabelecer uma coorte de indivíduos IDRM positiva mas sem história prévia de leishmaniose ou presença de cicatriz típica (Vasconcelos, 1996). Um contingente importante, entretanto, evoluiu sem controle da infecção, com manifestação da doença e risco de metastatização para mucosas.

Como a reação granulomatosa da linfadenite leishmaniótica pode assemelhar-se muito a da tuberculose, foi feita pesquisa de BAAR e aplicação do PPD em todos os casos estudados. O diagnóstico diferencial com a tuberculose deve incluir também a avaliação da intensidade da linfadenite e seu aspecto morfológico, este último podendo decorrer em função de reação cruzada ou concomitante com antígeno do *Mycobacterium tuberculosis*. Não foi

detectado BAAR em nenhum linfonodo analisado e dos pacientes que realizaram intradermo-reação para tuberculose, todos foram negativos, com exceção de um que apresentou uma induração de 5mm no PPD, o que possibilitou a exclusão de possível reação cruzada com tuberculose.

A apoptose, diferentemente da necrose, caracteriza-se pela condensação de cromatina resultante da fragmentação internucleosomial do DNA e consequente formação de grumos de cromatina presos a membrana citoplasmática e nuclear. A condensação citoplasmática subsequente leva à formação de corpúsculos apoptóticos eosinofílicos que são reconhecidos e rapidamente fagocitados por macrófagos da vizinhança, sem desencadear resposta inflamatória (Lovschall & Mosekilde, 1997). A apoptose é uma forma de suicídio celular que tem sido conservada ao longo da evolução dos seres vivos e que exige um mecanismo bioquímico complexo cujas bases moleculares só agora começam a ser esclarecidas. Em relação à resposta imune, a apoptose parece ser um mecanismo importante de imunorregulação, principalmente através da interação de certas proteases conhecidas como caspases com receptores FAS expressos à superfície de linfócitos ativados, principalmente linfócitos T citotóxicos (Onish et al, 1997). O ligante de FAS (FAS-L) é expresso na superfície de linfócitos T CD4+ e CD8+ após ativação. Interação FAS - FAS-L induz dimerização das moléculas FAS, associação com uma proteína intracitoplasmática, MORT-1 e, ao final, a apoptose é ativada.

No início da linfadenite leishmaniótica, quando ainda não havia a formação de granulomas, pudemos verificar intensa apoptose, que acometia principalmente as áreas de histiocitose. Nas fases mais tardias do processo, ela foi ainda observada em áreas de histiocitose, mas principalmente à nível dos centros germinativos. Possivelmente a apoptose desempenhe importante papel na limitação da multiplicação da *Leishmania* e na regulação da resposta inflamatória, principalmente por inibir a secreção de citocinas quimiotáticas (IL-8) e assim menor recrutamento de histiócitos-macrófagos ("safe targets") (Savill, 1997). Vale a pena ressaltar que a ocorrência de apoptose pode ser superior à detectada, dada a rapidez da cinética do processo apoptótico e a baixa sensibilidade da metodologia adotada neste estudo.

A necrose caseosa e/ou fibrinóide verificada por nós na linfadenite leishmaniótica, na maioria dos casos associada à reação granulomatosa, tanto pode indicar como que um importante fator no controle da infecção por mecanismo adquirido de imunidade celular efetiva, como pode representar um elemento na patogênese da leishmaniose tegumentar. Alguns pacientes com mais de sete semanas de evolução apresentaram altos níveis de TNF α ,

superiores aos observados nas sete primeiras semanas ($p = 0,03$). Estes pacientes ainda apresentavam extensa necrose, podendo representar uma parcela dos indivíduos que só controlam a linfadenite após o estabelecimento do tratamento.

De um modo geral, o TNF α funciona como um importante mediador pró-inflamatório, através da ativação de células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. Além de estimular os fagócitos mononucleares e outros tipos celulares a produzirem citocinas, incluindo IL-8 e IL-6, o TNF α e outras citocinas de baixo peso molecular que vão potencializar o efeito microbicida, funcionam também como co-estimuladores para a ativação de linfócitos T auxiliares, os quais podem regular a produção de imunoglobulinas por linfócitos B (Abbas et al, 1991). Por outro lado, uma liberação excessiva de TNF α solúvel pode ter efeitos catastróficos, como sugerido por Cabrera e cols. (1995), Da Cruz et al (1996), Wilson e cols. (1997); estes autores mostraram haver uma correlação entre o polimorfismo do promotor do gene de TNF α e gravidade da doença em pacientes com leishmaniose.

A propósito da associação entre a secreção de citocinas e a gênese do granuloma assinalamos os experimentos de Amiri et al (1992) nos quais se pôde restaurar inteiramente a reação granulomatosa epitelióide através da administração de TNF α em modelo murino de esquistossomose por *S.mansoni* utilizando-se camundongos SCID (“severe combined immunodeficient”).

Outra associação possível a ser assinalada foi a da necrose no seio do granuloma e o TNF α , pois sabe-se que esta citocina, a níveis elevados, induz extensa necrose tumoral e, eventualmente, de tecidos normais (“reação de Shwartzman”). O TNF α pode tanto induzir apoptose quanto necrose isquêmica por coagulação intravascular na microcirculação.

Pacientes com LTA que desenvolvem linfadenopatia apresentam valores médios de IDRM+ superiores aos que não apresentam linfadenopatia (Sousa et al, 1995; Barral et al, 1992). Possivelmente decorrente da maior estimulação antigênica a nível do linfonodo, dando, assim, origem a um estado de imunidade adquirida mediada por células e, conseqüentemente, ao maior número de células de memória. Um fato que corroborou este achado foi o da IDRM apresentar uma associação estatisticamente significativa com os níveis de hiperplasia paracortical ($p=0,03$), estado reacional representativo da participação da resposta imune celular no controle da infecção, assim como os níveis de plasmocitose ($p=0,04$). Ademais, pacientes com linfadenopatia demonstram em geral intradermoreação cutânea maior (sobretudo considerando-se os resultados $\geq 15\text{mm}$) ao antígeno de *Leishmania* (Teste de

Montenegro), assim como proliferação linfocitária *in vitro* após estimulação antigênica, do que pacientes sem linfadenopatia (Sousa et al, 1995). Todos estes achados sugerem que a difusão de *L.(V.) braziliensis* para os linfonodos satélites é uma das primeiras manifestações da primo-infecção na LC por *L.(V.) braziliensis* e que existe significativa diferença no perfil imunocelular da resposta do hospedeiro com relação à presença ou não de linfadenopatia.

Assim, o destino final da infecção por *L.(V.) braziliensis* pode já estar selado pelo envolvimento ou não do tecido linfóide próximo ao nódulo cutâneo de inoculação, o qual, como já observara Gutierrez et al (1992), configura um índice da carga parasitária no sítio da lesão cutânea. Uma possível ilação a ser tirada deste fato é de que a linfadenite leishmaniótica possa estar à base da baixíssima prevalência de LCM registrada no estado do Ceará, onde somente 0,3% dos pacientes com LTA desenvolvem algum tipo de lesão de mucosa (Sousa et al, 1995), prevalência esta muito baixa quando comparada com outras áreas endêmicas no Brasil, como por exemplo a de Três Braços- BA cuja prevalência fica em torno de 5% (Marsden et al, 1984). Levando-se em consideração o fato da existência de uma única espécie dermatrópica endêmica de *Leishmania* no Ceará, a *L.(V.) braziliensis*, bem como a existência de focos de transmissão em áreas de colonização antiga (Vasconcelos, 1996), podemos postular que a infecção secundária dos linfonodos possa representar um tipo especial de adaptação do sistema imune do organismo hospedeiro com expressão clínica bubônica capaz de limitar a disseminação da *L.(V.) braziliensis* e consequente visceralização.

Os níveis de TGF β expressos nos linfonodos analisados apresentaram uma tendência a associar-se positivamente com os níveis crescentes de fibrose, sugerindo assim a participação desta citocina com o processo de resolução da linfadenopatia.

Merece destaque a ocorrência de perilinfadenite em 92% dos casos, tendo como consequência a aderência de linfonodos adjacentes, e formação de massas palpáveis ao exame físico.

O estudo da LC em pacientes com acometimento do linfonodo regional tem mostrado aspectos interessantes. A infecção no linfonodo apresenta-se como uma reação auto-limitada, com aparente controle espontâneo da infecção num espaço de tempo relativamente curto (9 semanas) (Sousa et al, 1995). Quando se avalia o comportamento da reação na pele, a lesão tem, em geral, curso indolente, aparentemente com menor índice de cura espontânea. Estudo realizado na Guatemala mostrou que lesões causadas por *L. braziliensis* apresentaram 6% de cura espontânea (Herwaldt et al, 1992). Esta forma de leishmaniose parece conter dois compartimentos com respostas distintas: o linfonodo, com controle da infecção e auto-

resolução, e a lesão cutânea, aparentemente sem contenção da infecção na maioria dos indivíduos afetados.

Uma perspectiva que se delinea como possível de melhor compreender a patogênese da LC por *L.(V.) braziliensis* seria se proceder à avaliação comparativa das características imunológicas da resposta in situ nos compartimentos que reagem de modo diferente no mesmo indivíduo, isto é, no linfonodo, que controla a infecção num curto espaço de tempo, e na lesão cutânea, que aparentemente não controla, para que se possa assim detectar as diferenças básicas entre os dois tipos de resposta. Esta abordagem teria a vantagem de se dispor do mesmo “background” genético nas duas respostas, evitando-se assim os vieses decorrentes de características genéticas individuais.

6. CONCLUSÕES

- A linfadenopatia, observada em pacientes com LC no Estado do Ceará, caracterizou-se por uma intensa linfadenite crônica em 96%, sendo granulomatosa em 92%;
- O quadro da linfadenite granulomatosa caracterizou-se por:
 - necrose caseosa e/ou fibrinóide, assemelhando-se ao da tuberculose
 - histiocitose sinusal maciça, que assumiu características particulares, como o alargamento e obliteração dos seios linfáticos, formando faixas de macrófagos (96%);
 - exsudação histiocitária com infiltração difusa do parênquima por macrófagos isolados ou em grupamentos (100%);
 - Os granulomas desorganizados predominaram nas primeiras sete semanas de evolução, enquanto os organizados foram mais frequentes acima de 7 semanas;
 - Apoptose, foi mais frequente nas 7 primeiras semanas;
- A linfadenite leishmaniótica em seu aspecto histopatológico guardou analogia com o complexo primário da tuberculose;
- À linfadenite leishmaniótica, associou-se estado reacional, predominando a histiocitose sinusal e hiperplasia paracortical (96%);
- A IDRМ associou-se positivamente com a intensidade da plasmocitose e hiperplasia paracortical ($p=0,04$);
- Os linfócitos T CD4⁺ associaram-se positivamente com os níveis de LT memória ($p=0,002$) e macrófagos ($p=0,001$);
- Houve maior marcação de TNF α nos linfonodos com mais tempo de evolução ($p = 0,03$).

7. ANEXOS

ANEXO 1: Análise histológica de 26 pacientes com linfadenopatia leishmaniótica no estado do Ceará

Biópsia	T. evol.	IDRM	H.folic	H.pcart	H.sin.	H.parq	Linfad.	Gran.	Gr.nO	Gr.O	PMN	PI	Eos	C.Gig	Apop.	Nec	Fibr.	Peri-linf.	PIGran
866	1	ND	2	1	1	1	2	1	1	0	1	2	1	1	1	0	2	1	0
7611	2	4	1	2	2	2	2	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	0
JMS	2	0	1	2	2	1	2	2	2	2	0	2	0	0	1	2	2	2	0
5886	4	0	1	2	2	1	2	0	0	0	0	1	2	0	2	2	0	2	0
8739	4	20	1	2	2	2	2	1	1	0	0	1	0	0	2	2	1	2	1
6415	4	18	2	1	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	1	2	1	ND	0
3679	6	6	1	2	0	2	2	1	1	0	2	1	2	0	1	0	2	1	0
7293	6	11	0	1	2	2	2	2	1	1	0	2	0	0	2	2	2	1	0
7294	6	10	2	1	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	1	2	1	1	0
7612	6	8	2	2	2	2	2	2	1	1	0	2	0	0	2	1	1	2	0
6068	6	ND	2	1	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0
3296	7	ND	2	2	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0
6826	8	18	1	2	2	2	1	2	2	1	0	2	0	1	1	2	2	2	0
7610	8	13	0	2	1	2	2	2	1	2	1	1	0	1	1	0	1	1	0
7613	8	27	0	2	2	2	2	2	1	2	0	2	0	2	2	2	2	1	2
3412	8	ND	1	1	2	2	2	2	1	0	0	0	2	0	1	0	2	2	0
FEP	8	0	2	2	1	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	2	2
7622	9	ND	0	1	2	2	2	0	0	0	1	2	0	1	2	2	0	1	0
11483	12	5	1	2	2	0	2	2	2	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
7295	12	25	0	1	2	2	2	2	2	2	0	2	0	1	1	2	2	2	2
9919	14	3	1	2	2	2	2	2	2	2	0	1	1	0	2	2	1	2	0
7698	15	14	0	1	2	2	2	2	1	2	0	2	0	2	1	0	1	2	2
6414	16	35	1	1	1	1	1	1	0	2	0	2	2	0	0	0	1	0	0
3050	18	9	0	2	2	2	2	2	2	2	0	1	0	1	0	2	0	2	0
10188	20	ND	2	2	2	1	2	2	0	2	1	2	2	1	2	1	1	2	0
6342	ND	0	0	2	2	2	2	2	0	2	0	1	1	0	1	1	2	2	2

ANEXO 2: Análise imunohistoquímica de 11 pacientes com linfadenopatia leishmaniótica no estado do Ceará

Biópsia	T.evol.	IDRM	H.fol.	H.pcort	H.sin.	H.par.	Linfad	Gran	Gr.nO	Gr.O	PMN	PI	Eos	C.G.	Apop.	Nec	Fibr	Peril.	AgLsh	TNF	TGF	LTm	CD4	Mac
866	1	ND	2	1	1	1	2	1	1	0	1	2	0	1	1	0	2	1	11	24	53	20	69	12
7611	2	4	1	2	2	2	1	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	4	30	50	45	30	25
5886	4	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	2	5	14	53	2	80	18
6415	4	18	2	1	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	1	2	1	ND	2*	46	21	47	8	44
7612	6	8	2	2	2	2	2	2	1	1	0	2	0	0	2	1	1	2	8	26	35	47	27	26
6068	6	ND	2	1	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	2	3	26	71	16	65	19
6826	8	18	1	2	2	1	2	2	2	1	0	2	0	1	1	2	2	2	2	83	54	44	45	11
7610	8	13	0	2	1	2	2	2	1	2	1	1	0	1	1	0	1	1	13*	36	13	45	15	39
9919	14	3	1	2	2	2	2	2	2	2	0	1	1	0	1	2	1	2	4	51	20	35	58	7
6414	16	35	1	1	1	1	1	1	0	2	0	2	0	0	0	0	1	0	14*	41	80	44	23	33
6342	ND	0	0	2	2	2	2	2	0	2	0	1	1	0	1	1	2	2	2	60	21	40	35	25

* antígeno de *Leishmania* no endotélio e no conjuntivo

8 SUMMARY

Lymphadenopathy has been considered an important clinical manifestation of human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmaniaia (Viannia) braziliensis* in Ceara State-Brazil.

We carried out the histopathological and immunohistochemical analysis of 26 lymph nodes from 11 confirmed human cases of cutaneous leishmaniasis aiming to better characterize and clarify the pathogenesis of american cutaneous leishmaniasis.

An intense chronic lymphadenite made up the baseground feature of leishmaniasis lymphadenopathy ($p=0,001$), which has showed up in 96 per cent of the cases. This lymphadenite was predominantly granulomatous (92%) and used to be associated to sinusoidal histiocytosis (96%) and paracortical hyperplasia (96%). There has still been noticed a role played by apoptosis and necrosis in, respectively, 88 and 53 per cent of the lymphadenite cases.

T CD4+ lymphocytes were positively associated with the frequency of T memory cells ($p=0,002$) and macrophage ($p=0,001$); cells expressing TNF α were more frequently increased at long-lasting lymphadenitis.

Cutaneous leishmaniasis with concurrent regional lymphadenite showed to be analogous to the immunopathology of the primary complex of tuberculosis and as a lymph node reaction it plays an important part in the mechanism that controls cutaneous leishmaniasis; patients who develop lymphadenopathy present a more effective immune reaction with spontaneous lymphadenite resolution in 80 per cent of the cases.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S., United State of America: W.B. Saunders Company, 1991. 417p. cap.11: Citokynes, p.226-242.
- AHERNE, W. Methods of counting discrete tissue components in microscopical sections. **J. R. Microscop. Soc.**, v.87, p. 493-508, 1967.
- AMIRI, P., LOCKSLEY, R.M., PARSLOW, T.G., SADICK, M., RECTOR, E., RITTER, D., McKERROW, J.H. Tumor necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**, v.356, p.604-607, 1992.
- ANDRADE, Z.A., REED, S.G., ROTERS, S.B., SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Path.**, v.114, p.137-148, 1984.
- AZADEH, B. Localized Leishmanialymphadenites: a light and electron microscopic study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.34, p.447-455, 1985.
- BARKER, J.N.W.N., MITRA, R.S., GRIFFITHS, C.E.M., DIXIT, V.M., NICKOLOFF, B.J. Keratinocytes as initiators of inflammation. **Lancet**, v. 337, p.211-214, 1991.
- BARRAL, A., SAMPAIO, P.D., GRIMALDI, J.G. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.44, p.536-546, 1991.
- BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., ALMEIDA, R., RIBEIRO, J.A., GRIMALDI, G.Jr., NETTO, E.M., SANTOS, I., BACELLAR, O., CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.47, p.587-592, 1992.
- BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., YONG, E.C., BRONELL, C.E., TWARDZIK, D.R., REED, S.G. Transforming growth factor- β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.3442-3446, 1993.

- BARRAL, A., GUERREIRO, J., BOMFIM, G., CORREIA, D., BARRAL-NETO, M., CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy as the first signal of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p. 256-259, 1995.
- BARRAL, A., TEIXEIRA, M., REIS, P., VINHAS, V., COSTA, J., LESSA, H., BITTENCOURT, A.L., REED, S., CARVALHO, E.M., BARRAL-NETO, M. Transforming growth factor- β in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v.147, p.12-16, 1992.
- BARRAL-NETTO, M., BADARÓ, R., BARRAL, A., ALMEIDA, RP., SANTOS, SB, BADARÓ, F., PEDRAL-SAMPAIO, D., CARVALHO, EM., FALCOFF, E., FALCOFF, R. Tumor necrosis factor in human visceral leishmaniasis. **J. Inf. Dis.** v.163, p.853-857, 1991.
- BARRAL-NETTO, M., BADARÓ, R., BARRAL, A., CARVALHO, E.M. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.19, p. 173-191, 1986.
- BARRAL-NETTO, M., BRODSKYN, C., BONFIM, G., BARRAL, A. Cytokine regulation in human cutaneous leishmaniasis. **Fund. Osw. Cruz**, Salvador, 1996.
- BELL, D.W., CARMICHAEL, J.A.G., WILLIAMS, R.S., HOLMAN, R.L., STEWART, P.D. Localized leishmaniasis of lymph nodes. **Br. Med. J.**, v.1, p.740-743, 1958.
- BERGER, T., MELTZER, M.S., OSTER, C.N. Lymph node involvement in leishmaniasis. **J. Am Acad. Dermatol.**, v.12, p. 993-996, 1985.
- BITTENCOURT, A.L., ANDRADE, Z. Aspectos imunopatológicos na leishmaniose cutâneo-mucosa. **Hospital (Rio)**. v.71, p.975-983, 1967.
- BITTENCOURT, A.L., BARRAL, A. evaluation of the histopathological classifications of american and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, p.51-56, 1991.

- CHANG, KP. *L.donovani*: promastigote-macrophage surface interaction in vitro. **Exp. Parasitol.** v.48, p.178-189, 1979.
- CONVIT, J., PINARD, M.E, RONDON, A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 603-610, 1972.
- COSTA, J.M.L., MARSDEN, P.D., LLANOS-CUENTAS, E.A., NETTO, E.M., CARVALHO, E.M., BARRAL, A., ROSA, A.L., CUBA, C.A., MAGALHÃES, A.V., BARRETO, A.C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clin in Bahia. A report of eight cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v. 89 p.319-323, 1986.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 1519p. cap.15: White cells and lymph nodes, p. 703-754.
- Da CRUZ, A.M., OLIVEIRA, M.P., De LUCA, P.M., MENDONÇA, S.C.F., COUTINHO, S.G. Tumor necrosis factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 225-229, 1996.
- DANESHBOD, K. Localized lymphadenitis due to *Leishmania* simulating toxoplasmosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.69, p.462-467, 1978.
- EPSTEIN, W.L. Granuloma formation in man. **Pathobiol. Ann.**, v.7, p.1-30, 1977.
- FARAH, F.S., SAMRA, S.A., NUWAYRI-SALTI, N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v.29, p.755-775, 1975.
- FEARON, D.T., LOCKSLEY, R.M. The instrutive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v.272, p.50-54, 1996.

- GREEN, S.J., CRAWFORD, R.M., HOCKMEYER, J.T, MELTZER, M.S., NACY, C.A.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, v.145, p.4290-4297.
- GRIMALDI, G.JR., TESH, R.B., McMAHON-PRAT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.41, p. 687-725, 1989.
- GROSS, A., SLIWA, K., FRANKENBURG, S., WYLER, D., KLAUS, S. Human cutaneous leishmaniasis: *in vitro* parasite-mononuclear cell interactions in immune and naive individuals. **Arch. Dermatol. Res.**, v.284, p.209-211, 1992.
- GUESDON, J.L., TERNYNCH, T., AVRAMEUS, S. The use of avidin biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **J. Histochem. Cytochem.** V.27, p.1131-1139, 1979.
- GUTIERREZ, Y., SALINAS, G.H., PALMA, G., VALDERRAMA, L.B., SANTRICH, C.V., SARAVIDA, N.G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.281-289, 1991.
- HERWALDT, B.L., ARANA, BA, NAVIN, T.R. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, v.165, p.518-527, 1992.
- JAFFE, L. Further observations on leishmaniasis americana in the upper respiration passages in Panama. **Arch. Dermatol.**, v.72, p.464-470, 1960.
- KADIVAR, D.M.H., SOULSBY, E.J.L. Model for disseminated cutaneous leishmaniasis. **Science**, v.190, p.1198, 1975.
- KEMP, M., THEANDER, T G., KHARAZMI, .A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunol. Today**, v.17, p.13-16, 1996.

- KISSANE, J.H., ANDERSON, W.A.D. **Anderson's Pathology**. St Louis Missouri: Mosby Yearbook, 1985, v.1, cap. 30: Hemopoietic system: reticuloendothelial system, spleen, lymph nodes, bone marrow, and blood, p.1257-1351.
- KUMAR, P.V., HAMBARSOOMINA, B., VAEZZADEH, K. Fine needle aspiration cytology of localized leishmania lymphadenitis. **Acta Cytol.** v.31, p.14-16, 1987.
- KURBAN, A.K., MALAK, J.A., FARAH, F.S., CHAGLIASSIAN, H.T., LEBANON, B. Histopathology of cutaneous leishmaniasis. **Arch. Dermatol.**, v.93, p.396-401, 1966.
- LAINSON, R., SHAW, J.J. Ecology and epidemiology: new world. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. Orlando: Academic Press, 1987. v.1, cap.7, p.291-363.
- LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA, F.T., SOUSA, A.A.A., BRAGA, R.R., ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, p. 435-443, 1994.
- LIEW, F.Y. Role of cytokines in killing of intracellular pathogens. **Immunol. Lett.**, v.30, p.193-198, 1991.
- LOCKSLEY, R.M., HEINZEL, F.P., SADICK, M.D., HOLADAY, B.J., GARDENER, K.D. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann. Inst. Pasteur/Immunol.**, v.138, p.744-749.
- LOVSCHALL, H. MOSEKILDE, L. Apoptosis: cellular and clinical aspects. **Nord. Med.**, v.112, p.133-137, 1997.
- MAGALHÃES, A.V., CHIARINI, L.H., RAICK, A.N. Histopatologia da leishmaniose tegumentar. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** v.24, p.268-276, 1982.

- MAGALHÃES, A.V., MORAES, M.A.P. RAICK, LLANO-CUENTAS, A., COSTA, J.M.L., CUBA, C.C., MARSDEN, P.D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania (Leishmania) braziliensis*. 3- Reação celular nos tecidos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.28, p.300-311, 1986a
- _____. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania (Leishmania) braziliensis*. 1- Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.28, n.4, p.253-262, 1986b.
- MARSDEN, P.D., LLANO-CUENTAS, E.A, LAGO, E.L., CUBA, C.C.BARRETO, AC., COSTA, J.M., JONES, T.C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.17, p.179-186, 1984.
- MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911) **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.80, p.859-876, 1986.
- MARSDEN, P.D., NONATA, R.R. Mucocutaneous leishmaniasis- A review of clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.9, p.309-326, 1975.
- MARZOCHI, M.A.C., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil- emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, v.10. suppl. 2, p. 359-375, 1994.
- MAYRINK, W., WILLIAMS, P., COELHO, M. V., DIAS, M., MARTINS, A.V., MAGALHÃES, P.A., de COSTA, C.A., FALCÃO, A.R., MELO, M.N., FALCÃO, N. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.73, p.123-137, 1979.
- MELBY, PC., ANDRADE-NARVAEZ, FJ., DARNELL, BJ, VALENCIA-PACHECO, G., TRYON, VV., PALOMO-CETENA, A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infec. Immunol.**, v.62, p.837-842, 1994.

- MODLY et al *apud* BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P., BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **J. Dermatol.**, v.5, p.104-113, 1995.
- MOLL, H. Epidermal langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immun. Today**, v.14, p.383-386, 1993.
- MORAES, M.A.P., CORREIA, D.F., SANTOS, J.B. Linfadenopatias na leishmaniose tegumentar americana: considerações sobre dois casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.26, p.181-185, 1993.
- MORIEARTY, P.L., BITTENCOURT, A.L., PEREIRA, C., TEIXEIRA, R., BARRETO, E., GUIMARÃES, N.A. Bordeline Cutaneous Leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.20, p.15-21, 1978.
- MOSMANN, T.R., MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunol. Today**, v.12, p.49-53, 1991.
- NORTON, S.A., FRANKENBURG, S.; KLAUS, S.N. Cutaneous leishmaniasis acquired during military service in the Middle East. **Arch. Dermatol.**, v.128, p. 83-87, 1992.
- OLIVEIRA LIMA, José Wellington. **Domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Brazil**. Boston, 1995. Thesis (Doctoral) - Harvard School of Public Health.
- ONISH, Y., TANIMOTO, Y., KIZAKI, H. Inflammation and apoptosis. **Bull. Tokyo dent. Coll.**, v.38, p.65-76, 1997.
- Organização Mundial da Saúde. **Lutte contre les leishmanioses**. Geneve, 1990. (Série de Rapports Techniques, 793).
- PANOSSIAN, C.B. SYPEC, J.P, WYLER, D.J.. Cell-contact mediated macrophage activation for antileishmanial defence. I- Lymphocyte effector mechanism that is contact dependent and noncytotoxic. **J. Immunol.**, v.133, p. 3358-3365, 1984.

- PETTIT, J.M.S. Chronic (Lupoid) leishmaniasis. **Brit. J. Dermatol.**, v.74, p.123-131, 1962.
- PIRMEZ et al apud BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P., BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **J. Dermatol.**, v.5, p.104-113, 1995.
- PISA, P., GENNENE, M., SÖDER, D., OTTENHOFF, T., HANSSON, M., KISSLING, R. Seven tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.161, p.988-991, 1990.
- POULTER, L.W., RANDOLPH, C.R. Mechanisms of immunity to leishmaniasis IV. Significance of lymphatic drainage from the site of infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v.48, p.396-402, 1982.
- PUPO, J.A. Estudo clínico da leishmaniose tegumentar americana-*Leishmania braziliensis*-Viannia (1911). **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v.1, p.113-164, 1946
- QUEIROZ, R.G, VASCONCELOS, I.A.B., VASCONCELOS, A.W., PESSOA, F.A.C., SOUSA, R.N., DAVID, J.R. Cutaneous leishmaniasis in Ceara State in Northeastern Brazil: Incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *L. braziliensis* in Baturite Municipality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.50, n.6, p.693-698, 1994.
- REED, S.G., ANDRADE, Z.A., ROTERS, S.B., INVERSO, J.A., SADIGURS, M. *Leishmania mexicana amazonensis* infections in "resistant" inbred mice following removal of the draining lymph node. **Clin. Exp. Immunol.**, v.64, p.8-13, 1986.
- RIDLEY, D.S. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.74, p.515-521, 1980. _____ Pathology. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Orlando: Academic Press, 1987. v.2, cap. 14, p.666-701.

- _____. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.73, p.150-160, 1979a.
- _____. The pathological mechanism of leprosy as a broad spectrum disease **Brasil Médico**, v.17, p.77-81, 1979b.
- RIDLEY, D.S., MARSDEN, P.D., CUBA, C.C., BARRETO, A.C. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.74, p.508-514, 1980.
- RIDLEY, M.J., WELLS, C.W. Macrophage-parasite interaction in the lesions of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v.123, p.79-85, 1986.
- ROY, S., McGUIRE, W., MASCIE-TAYLOR C.G., SAHA, B., HAZRA, S.K., HILL, A.V., KWIATKOWSKI, D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J. Infect. Dis.**, v.176, p.530-532, 1997.
- RUSSEL, D.G., TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunology Today**, v.10, p.328-333, 1989.
- SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J. Leukoc. Biol.** V.61, p.375-380, 1997.
- SILVA, D.B. Leishmaniose anérgica hansenóide. **An. Bras. Dermatol.**, v.57, p.147-150, 1982.
- SOUSA, A.Q., PARISE, M.E., POMPEU, M.M.L., COELHO, J.M.F., VASCONCELOS, I.A.B., LIMA, J.W.O., OLIVEIRA, E.G., VASCONCELOS, A.W., DAVID, J.R., MAGUIRE, J.H. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (V.) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p.380-385, 1995.
- VASCONCELOS, Isabel de Alencar Barros. **Epidémiologie de la leishmaniose cutané dans un foyer du Ceará (Brésil): Définition des parasites impliqués.** França 1996. Tese de Doutorado- Science de la vie et de la Santé, Universidade Paris XII, Val de Marne.

- VASCONCELOS, I.A.B, VASCONCELOS, A.W., FE FILHO, N.M.,*Sousa*, R.G.,SANTANA, E.W., BOZZA, M., SALLENAVE, S.M., VALIM, C., DAVID, J.R., LOPES, U.G. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate host in a major focus of Cutaneous Leishmaniasis in Baturite, Northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, p.158-164, 1994.
- VERESS, B., OMER, A., SATER, A.A., HASSAN, A.M. Morphology of spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v.33, p.605-610, 1977.
- WALTON, B.C., CHINEL, L.V., EGUIA, O.E. Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.22, p.696-698, 1973.
- WILSON, AG., SYMONS, J.A, McDOWEL, T.L., McDEVITT, H.O, DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcription activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p.3195-3199, 1997.
- WHO Division of Control of Tropical Disease (on line), 1998.
- ZENIAN, A., ROUELES, P., GINGELL, D. Scanning electron-microscopic study of the uptake of leishmania parasite by macrophage. **J. Cell Sci.**, v.39, p.187-199, 1979.