

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM PATOLOGIA

IMUNOFENOTIPAGEM EM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

**Imunohistoquímica como ferramenta para estudar a reação imune e a apoptose
em uma série de pacientes com Leishmaniose Cutânea no Distrito Federal**

VERÔNICA MARIA GONÇALVES FURTADO

Dissertação submetida como
requisito para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Médicas, Área
de Concentração Medicina, Sub-
Área de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa
de Magalhães

Brasília, DF
Setembro, 2006

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	
AGRADECIMENTOS.....	
RESUMO.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. PATOGENIA.....	4
2.2. LEISHMANIOSE E APOPTOSE.....	8
2.3. DIAGNÓSTICO.....	11
3. JUSTIFICATIVA.....	15
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. GERAL	18
4.2. ESPECÍFICO.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. DEFINIÇÃO DA AMOSTRA	18
5.2. DEFINIÇÃO DO CASO.....	18
5.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	18
5.4. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	19
5.5. MÉTODOS ESTATÍSTICOS	22
6. RESULTADOS.....	23
7. DISCUSSÃO.....	51
8. CONCLUSÕES.....	59
ABSTRACT.....	
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10. ANEXOS.....	65

A todos que utilizarem este trabalho como fonte de novas pesquisas para auxiliar na evolução da humanidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre Senhor Jesus Cristo, inspiração em todas as horas.

À minha irmã Mônica, verdadeiro exemplo de trabalho e confiança, sempre incentivando todas as minhas realizações.

Aos meus pais Expedito e Teresinha, que com paciência e resignação despertam em mim os sentimentos mais nobres.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, que com despreendimento e alegria me estimulam na realização dos meus propósitos.

À Nashira, que com dedicação e carinho me faz crer na importância dos verdadeiros amigos.

Ao ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, preceptores, residentes e funcionários, pelo acolhimento e facilitação das atividades envolvidas nesta pesquisa.

À CAPES, por transformar idéias em projetos realizáveis.

Ao Prof. Dr. Fernando Schmitt, cujo conhecimento científico foi luminosidade em áreas internacionais.

Aos amigos do Grêmio Espírita Atualpa Barbosa Lima que me acolheram no meu segundo lar.

RESUMO

Os mecanismos patogênicos da Leishmaniose Tegumentar ainda não se encontram plenamente esclarecidos e a utilização de marcadores imune tissulares e de genes de expressão da apoptose podem contribuir para o conhecimento dos eventos envolvidos nesta cadeia.

Quarenta e seis pacientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília sem história de infecção ou tratamento prévios foram estudados entre junho de 2005 e março de 2006. Os pacientes foram agrupados segundo sexo, idade, naturalidade e local de contato. As lesões foram agrupadas segundo o número, a localização, o tempo de evolução e o padrão histopatológico presente.

No estudo imunohistoquímico, as células foram analisadas segundo os marcadores para células T, células B, macrófagos, células de Langerhans, neutrófilos e marcadores para identificar a expressão de genes relacionados com a apoptose.

A análise dos marcadores da apoptose em relação ao tempo de evolução da doença mostrou que, após 2 anos, Bcl-2 e Bcl-x aumentaram seus valores e isto foi estatisticamente significativo. Os demais marcadores para apoptose e os marcadores de imunofenotipagem quando relacionados com o tempo de evolução da doença e os padrões histopatológicos presentes nas biópsias não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

A influência do tempo de evolução da doença sobre os marcadores antiapoptose abre a possibilidade de investigação de um desequilíbrio iônico que favoreça a permanência do parasita *in situ* nos pacientes com Leishmaniose Cutânea.

ABSTRACT

Pathogenetic pathways of Tegumentary Leishmaniasis isn't clear yet and the immunohistochemistry and apoptotic markers can help to know how it happens.

Forty-six patients of Hospital Universitário de Brasília were analyzed from June 2005 to March 2006. They had no history of previous infection or treatment. About the patients we studied: sex, age, where they were born and had been infected; about the lesion: how many, in what part of the body it started, its time of evolution and the histopathologic pictures. Immunohistochemistry markers identified T cells and subsets, B cells, macrophages, Langerhans cells, neutrophils and apoptotic markers.

Bcl-2 and Bcl-x increased after the lesions grown for 2 years. Others apoptotic and immunohistochemistry markers didn't were statistically significant when compared with histopathologic pictures and time of lesion evolution.

The relation between time of lesions evolution and anti-apoptotic markers in terms of ionic imbalance opens the way to know how come parasites remains *in situ* in Cutaneous Leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa de evolução crônica, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas do nariz, boca, faringe e laringe; é primariamente uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente (FUNASA, 2000).

A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae* e com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais superiores) (FUNASA, 2000).

Nos mamíferos silvestres a *Leishmania* causa pouco ou nenhum efeito patológico, caracterizando uma relação de equilíbrio entre o parasita e hospedeiro; muitos animais albergam amastigotas na pele e nas vísceras, sem qualquer sinal de doença. Hospedeiros incidentais, incluindo o homem, reagem intensamente à presença do invasor, resultando daí o aparecimento das lesões. Muitas vezes, porém, a infecção no homem é inaparente ou se manifesta sob a forma de lesão mínima. Além das características ligadas ao hospedeiro, concorrem para a gênese das diferentes formas clínicas da doença fatores relacionados com a espécie parasitária (FALQUETO & SESSA, 2005).

De acordo com a localização das lesões, distinguem-se três formas clínicas: a forma cutânea (LC), a cutâneo-mucosa (LCM) e a mucosa (LM). Dependendo da resposta imune do hospedeiro e da espécie infectante, a doença pode ficar limitada ao local da inoculação do parasita. Os pacientes que reagem à infecção com adequada resposta imune celular, que são a maioria, desenvolvem LC, restrita a um ou mais sítios primários de inoculação do parasita (FALQUETO & SESSA, 2005).

De acordo com dados do Ministério da Saúde em 2000, a leishmaniose no Brasil comporta dois padrões epidemiológicos: surtos de epidemia associado à derrubada de matas no afã de o homem dominar a natureza, o que permitiu o surgimento de uma zoonose de animais silvestres que podem atingir o homem, ou surtos de epidemia relacionado ao processo migratório do homem, com a ocupação de áreas semi-urbanizadas na periferia das cidades. Desse modo, rompe-se o ciclo biológico natural da zoonose, tornando-se os animais domésticos importantes reservatórios dos parasitas.

Houve mudança no padrão de transmissão e no perfil dos pacientes afetados; inicialmente, os casos predominavam em adultos jovens do sexo masculino; com a transmissão ocorrendo em periferias de área urbana, em ambientes domiciliares e peri-domiciliares, a doença passou a atingir também crianças e mulheres (FUNASA, 2000).

A LC é uma doença que afeta, sobretudo, pacientes jovens na fase economicamente ativa, representando uma carga pesada para a saúde pública nos países em desenvolvimento (VIEIRA *et al*, 2002).

Não existem, nas Américas, dados seguros para se avaliar o número de pessoas atingidas pela doença. No Brasil, as estatísticas oficiais têm registrado anualmente cerca de 35 mil casos novos, o que não traduz a realidade, devido às deficiências no sistema de notificação das doenças transmissíveis. Além disso, a assistência médica precária nas zonas rurais faz com que muitos doentes deixem que o mal se cure espontaneamente, passando sem registro (FALQUETO & SESSA, 2005).

Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica crescente, sendo que em 1994 foram registrados casos em 1861 municípios, representando 36,9% do total de municípios do país e em 1998 houve uma expansão da doença para 2055 municípios (FUNASA, 2000).

Na região Norte, em 82% dos municípios, há registros de casos autóctones, sendo que nos estados do Amapá e Roraima 100% dos municípios apresentaram autoctonia. Já no Nordeste, houve um aumento gradativo no número de municípios atingidos pela LTA no período de 1994 a 1998, destacando o estado do Maranhão que apresentou um crescimento de 39% no período estudado, registrando casos em 88,5% dos municípios (FUNASA, 2000).

A região Sudeste apresentou uma queda gradativa no período 1994/1997, entretanto em 1998 houve um acréscimo de 27% em relação ao ano anterior. Ressalta-se que os estados do Espírito Santo e Minas Gerais foram os que apresentaram o maior percentual de municípios com LTA em 1998, com 50,5% e 46,3%, respectivamente. No sul do país o Paraná vem apresentando aumento gradativo no número de municípios com casos de LTA, passando de 117 municípios em 1994 para 146 em 1998 (FUNASA, 2000).

No Centro-Oeste, a LTA vem expandindo, atingindo 64,3% dos municípios em 1998, correspondendo a um aumento de 10% em relação ao ano de 1994. Em Mato Grosso 100% dos municípios têm registro de casos autóctones. No estado de Goiás verificou-se também expansão significativa passando de 71 municípios atingidos em 1994 para 113 em 1998, o que corresponde a um acréscimo de 62% (FUNASA, 2000). Em 2003 foi registrado um surto na cidade de São Sebastião, reforçando a autoctonia da doença no Distrito Federal (PORTO, 2004). No ano de 2004 a ocorrência de novos casos no Distrito Federal chegou a 94, sendo 78 importados de outros estados e 13 autóctones. E quanto à distribuição de casos novos por municípios nos últimos quatro anos, Planaltina, Samambaia, São Sebastião, Ceilândia e Gama contribuíram, cada um, com um novo caso (NÚCLEO DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA SES-DF, 2004).

Dentre as cinco regiões brasileiras, a Centro-oeste figura como a terceira em incidência e a primeira em crescimento da doença, aumentando de 130 casos em 1980 para 4658 em 1996, segundo dados do Ministério da Saúde (FUNASA, 2000).

No Brasil, as espécies mais importantes são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. A espécie *L. (V.) braziliensis*, cuja distribuição geográfica é a mais prevalente no Brasil, também é a forma mais freqüente no Distrito Federal (FUNASA, 2000).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PATOGENIA

O quadro histopatológico geral da Leishmaniose Tegumentar está representado por um infiltrado celular histiolinfoplasmocitário (padrão exsudativo celular), acompanhado por uma reação granulomatosa que pode surgir associada ou não à necrose (MAGALHÃES, 1986). Esta deve representar elemento fugaz e associa-se ao granuloma reacional para constituir o padrão exsudativo necrótico-granulomatoso que surge em até 2 meses de evolução da doença. O padrão de reação exsudativo granulomatoso pode ser considerado resíduo do padrão exsudativo necrótico e este pode evoluir para exsudativo necrótico-granulomatoso. Todos eles são etapas de um mesmo processo, de caráter transitório, que se superpõem à reação de base.

Dos padrões histopatológicos presentes na leishmaniose conforme relata MAGALHÃES (1986), exsudativo celular constitui a primeira reação do organismo à presença do parasito no tecido, pois seus tipos celulares são verificados em maior ou menor proporção nos demais padrões. O melhor prognóstico está relacionado ao padrão exsudativo granulomatoso, pois é uma fase na qual o organismo tendo lançado

mão de um mecanismo endógeno de lise parasitária, já circunscreveu a área de necrose por uma reação granulomatosa e esta é agora apenas um elemento residual.

Sabe-se que o prognóstico da infecção por *Leishmania* é determinado por interações entre o hospedeiro e o parasita. A patogênese da LC envolve um mecanismo de lise intracelular e a formação de granulomas organizados que provavelmente representam uma hipersensibilidade do tipo retardada. Estes mecanismos são ativados após a interação entre a imunidade celular e humoral, acionados pelos estímulos de diferentes espécies de parasitas (RIDLEY, 1979).

Na LC é o mecanismo imune o responsável pela necrose. Qualquer que seja a causa, a necrose tem como conseqüência à produção de um granuloma organizado com células gigantes e epitelióides e mesmo se a hipersensibilidade for um elemento do granuloma, ela pode ser de qualquer tipo. Na presença de baixa carga de antígenos, o mecanismo de necrose é dependente da presença de numerosos plasmócitos (principalmente) e linfócitos, que são os primeiros recrutados na imunidade mediada por células e na imunidade humoral (RIDLEY, 1979).

Alguns passos da patogênese encontram-se bem estabelecidos. Ocorre uma modificação na bioquímica na capa glicolípídica do parasita durante sua permanência no intestino do mosquito; esta transformação protege o parasita da lise rápida, via sistema de complemento do mamífero quando entra no hospedeiro. Uma vez neste, o parasita ativa via fagocitose mediada por receptores, as células dendríticas da pele ou macrófagos, que funcionam como um sistema de células apresentadoras de antígenos (APC) iniciando e modulando as respostas imunes. O microorganismo utiliza o sistema de complemento para resistir ao meio hostil do fagolisossomo, onde, apesar do pH de 4.5-5.0 e na presença de proteinases ativadas, possa se desenvolver (OUAISSI ALI *et al*, 2003).

Após a fagocitose de microorganismos os leucócitos sofrem um processo de extrema ativação da cadeia respiratória, resultando em uma rápida utilização de oxigênio molecular. As reações enzimáticas do processo respiratório conduzem à formação de produtos instáveis do oxigênio (como o peróxido de hidrogênio) os quais são tóxicos para os patógenos extra e intracelulares. Este fenômeno caracteriza, a nível bioquímico, o processo de ativação dos fagócitos, o qual é avaliado pelo aumento da capacidade destas células de fagocitar, destruir e digerir os microorganismos. Assim, os leucócitos polimorfonucleares humanos seriam eficientes na destruição da *Leishmania* (BARRAL *et al*, 1986).

As células dendríticas (células de Langerhans da epiderme e células intersticiais da derme) e os macrófagos são sentinelas para a entrada do patógeno na

pele e conhecidos por terem uma forma eficiente de englobar diversos antígenos, entre os quais corpos apoptóticos, bactérias e parasitas como *Leishmania*, estimulando células B e T (BLANK, 1993 apud CUTLER 2001). As células B, precursoras das células secretoras de anticorpo, podem reconhecer diretamente antígenos inatos através de seus receptores. Os linfócitos T necessitam que o antígeno seja apresentado pelas APCs (BANCHEREAU, 1998).

Os linfócitos T sofrem um processo específico de seleção no timo. Os receptores de células T (TCR) permitem que estes linfócitos realizem sua função imunológica. Diferente das imunoglobulinas, os TCRs não reconhecem antígenos solúveis e interagem com antígenos ligados a moléculas de apresentação antigênica, os complexos de histocompatibilidade (MHC) na superfície da APC. As proteínas ligadas aos peptídeos são de dois tipos: complexo de histocompatibilidade Classe I e Classe II, que estimulam respectivamente, as células T citotóxica e T *helper*. Antígenos intracelulares transformados em peptídeos no citosol da APC ligam -se ao complexo de histocompatibilidade Classe I e são reconhecidos pelas células T citotóxicas, que uma vez ativada, pode matar diretamente a célula alvo. Antígenos extracelulares que entraram no mecanismo endocítico da APC são processados lá e geralmente apresentados pelo complexo de histocompatibilidade Classe II, células T *helper*, que uma vez ligadas, têm profundos efeitos na imunorregulação (BANCHEREAU, 1998). As moléculas de TCRs são associadas a uma variedade de outras moléculas de superfície como o T CD-45 RO, T CD-4 e T CD-8. A ligação com estes receptores é fundamental na resposta imune celular.

As células T CD-4 (T *helper*) e T CD-8 (T citotóxica) realizam funções distintas, mas um pouco superpostas. As células T CD-4 ao secretarem fatores solúveis (citocinas) influenciam a função de praticamente todas as outras células do sistema imune, incluindo outras células T, células B, macrófagos e células *Natural Killer* através da interação com células contendo MHC do tipo II (KUMAR *et al*, 2005) (ALVES *et al*, 1999). Duas populações diferentes de células T auxiliares são conhecidas: Th1, que sintetiza e secreta a interleucina (IL-2) e o interferon-gama (*IFN-gama*), e Th2 que produzem IL-4 e IL-5. Em geral o subgrupo Th1 está envolvido na facilitação da hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos e o subgrupo Th2 auxilia a síntese

de outras classes de anticorpos, incluindo IgE (KUMAR *et al*, 2005). Desta forma, a quantidade de células T *helper* pode determinar a suscetibilidade ou a resistência à infecção (ROBERTS *et al*, 2000).

Células T CD-8 semelhantes às células T CD-4, podem secretar citocinas, principalmente do tipo Th1, mas medeiam suas funções principalmente atuando como células citotóxicas, interagindo com células que têm MHC do tipo I (KUMAR *et al*, 2005).

A principal defesa contra os protozoários que sobrevivem em macrófagos, incluindo a *Leishmania*, é a imunidade mediada por células. A resistência à infecção está associada à ativação de linfócitos T CD-4 Th1. Muitos estudos relatam que a imunidade contra *Leishmania* é dependente da interleucina-12 produzida pelos macrófagos ou por células dendríticas levando à produção do Interferon-gama, tanto por células do sistema imune inato (células *Natural Killer*) quanto adquirido (células T CD-4). O Interferon-gama medeia esta proteção por regular positivamente a expressão macrófágica mediante a indução da produção de óxido nítrico, que é letal para o parasita (ROBERTS *et al*, 2000).

Por outro lado, as vias imunológicas que levam à doença não curável são bem menos compreendidas e até ao momento são alvos de debate. A ativação de células Th2 facilita a sobrevivência dos parasitas, além de promover a exacerbação das lesões, em razão das ações supressivas dos macrófagos pela interleucina 4 (IL-4) (ROBERTS *et al*, 2000).

Enquanto alguns estudos sugerem o papel crucial para a resposta Th2 e Interleucina-4 na regulação negativa da produção e atividade do Interferon-gama, outros estudos sugerem que é a falência na produção de interleucina-12 e a conseqüente inabilidade em gerar a resposta Th1 que resulta na suscetibilidade a doença (ROBERTS *et al*, 2001).

Células T CD-8, que também participam da resposta imune celular, contribuem para uma resposta imune protetora na infecção causada por *Leishmania* (MULLER *et al*, 1993). A expansão das células T CD-8 específicas para *Leishmania* implica em que alguns peptídeos derivados de parasitas ganham acesso ao complexo de histocompatibilidade classe I apesar da localização fagolisossomal de amastigotas. A destruição dos parasitas por macrófagos ativados pode levar à liberação de peptídeos antigênicos derivados dos parasitas que podem se ligar às moléculas do

complexo de histocompatibilidade classe I expressas na superfície de células parasitadas ou não infectadas, onde estas células são reconhecidas por células T CD-8 precursoras. Este último mecanismo é mais consistente com a cinética da função efetora mediada por células T CD-8 anti-*Leishmania*, mais pronunciada na resposta secundária *in vivo*. Portanto, a destruição de parasitas durante a resolução da infecção primária deve ser necessária para gerar suficiente quantidade de peptídeos derivados da *Leishmania* para sensibilizar células T CD-8 específicas. Uma vez que este processo requer tempo, podem-se explicar porque células T CD-8 parecem ser mais importantes para a defesa do hospedeiro após reinfecção (MULLER *et al*, 1993).

Os linfócitos B representam 10 a 20% da população de linfócitos periféricos circulantes. À estimulação antigénica, as células B formam plasmócitos que secretam imunoglobulinas, mediadoras da imunidade humoral. As células B reconhecem antígeno através do complexo de receptor de antígenos da célula B. A imunoglobulina M (IgM), presente na superfície de todas as células B, constitui o componente de ligação a antígenos do receptor da célula B. Assim como as células T, cada receptor da célula B tem uma especificidade singular para antígenos, derivada, em parte, de rearranjos somáticos dos genes de imunoglobulinas (KUMAR *et al*, 2005).

De um modo geral, os pacientes com LC localizada apresentam uma adequada resposta imune celular e uma fraca resposta imune humoral, porém de intensidades diferentes nos diversos indivíduos. Como resultado, a lesão de alguns indivíduos pode curar espontaneamente (FALQUETO & SESSA, 2005).

2.2. LEISHMANIOSE E APOPTOSE

O termo apoptose foi introduzido na literatura biomédica em 1972 para definir células que morrem como parte de um programa normal de desenvolvimento celular (WYLLIE *et al*, 1997).

A apoptose observada em mamíferos se centra na ativação proteolítica de uma família de proteases denominada caspases (GRAVRILESCU *et al*, 2003). As caspases podem ser definidas como uma família de genes presentes no genoma dos mamíferos (WYLLIE *et al*, 1997). Seu alvo compreende uma grande variedade de

proteínas envolvidas na sobrevivência celular, incluindo a reparação do DNA, controle do ciclo celular, estruturação nuclear e citoesquelética. Estas enzimas também têm como alvo as caspases que participam no desencadeamento da cascata que leva à apoptose. Além disto, a liberação do citocromo *c* para o citoplasma e as alterações no potencial da membrana mitocondrial são rigorosamente regulados pela família Bcl-2 que agem por dimerização da membrana mitocondrial externa. Algumas proteínas da família Bcl-2 são anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x) ou pró-apoptóticas (Bax) e a relação entre os agonistas e antagonistas é que determina se uma célula irá responder a determinado estímulo de apoptose (GRAVRILESCU *et al*, 2003).

O gene Bcl-2 codifica uma proteína de 25-26 KDa sem achados estruturais que sugerem como a apoptose é controlada. A porção C-terminal do aminoácido 21 codifica aminoácidos hidrofóbicos necessários para sua inserção entre as membranas. É este fenômeno que está associado à habilidade do Bcl-2 de regular a apoptose. O Bcl-2 está presente na membrana mitocondrial externa, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático (face citosólica) (BROWN, 1997).

Um dos primeiros homólogos do Bcl-2 a ser identificado foi o gene Bax. Este foi isolado como uma proteína de ligação ao Bcl-2 em experimentos de imunoprecipitação sendo homólogo a ele em 45%. Em experimentos de super expressão Bax promoveu apoptose e antagonizou o efeito protetor do Bcl-2. Assim, pode-se supor que a regulação da formação de heterodímeros do Bcl-2/Bax é um importante ponto de controle da apoptose (BROWN, 1997).

Análises mutacionais do Bcl-2 e Bax estabeleceram que os domínios BH conservados são regiões através das quais a proteína é considerada homo ou heterodímera. Para o Bcl-2, mutação nos domínios BH1 e BH2 em determinado número de vezes previne a proteína do bloqueio da indução da apoptose e sua ligação ao Bax (BROWN, 1997).

A proteína pró-apoptótica Bcl-x tem três domínios conservados que estão em estreita aproximação espacial e formam uma fenda hidrofóbica extensa. É esta fenda que se pensa ser o local de ligação com os outros membros da família Bcl-2. Além disso, no Bcl-x há sete hélices alfa, três das quais se sobrepõem ao domínio BH. O alinhamento destas hélices é semelhante ao domínio de inserção da membrana de um

grupo de bactérias tóxicas. Assim, é possível que as hélices combinadas formem algum tipo de poro ou canal da membrana responsável pela atividade da proteína (BROWN, 1997).

A formação de poros reguláveis ou canais na membrana nuclear e retículo endoplasmático permite às proteínas Bcl-2 terem efeitos positivos ou negativos no balanço iônico. Evidências existem para a regulação do cálcio intracelular pelo Bcl-2; notou-se que o Bcl-2 estabilizou o gradiente de cálcio entre o citoplasma e o retículo endoplasmático. Portanto, a supressão da apoptose pelo Bcl-2 está correlacionada com a regulação do cálcio nuclear e citosólico (BROWN, 1997).

O gene supressor tumoral p53 constitui o alvo mais comum de alteração genética nos tumores humanos. Quando ocorre lesão do DNA por irradiação, agentes mutagênicos ou luz UV ele é solicitado como freio de emergência que impede a propagação de células geneticamente modificadas. Na presença destes agressores ocorre rápido aumento nos níveis da proteína p53 e sua ativação como fator de transcrição. Com isso, há estímulo à transcrição de vários genes que atuam como mediadores dos dois efeitos principais da p53: parada do ciclo celular e apoptose. A parada no ciclo celular permite que a célula tenha tempo para reparar a lesão do DNA ou aquela causadas por agente mutagênico. Se durante esta pausa não for possível proceder a um reparo bem sucedido do DNA danificado, a p53, como último recurso, induz a ativação dos genes indutores da apoptose (KUMAN *et al*, 2005).

Apoptose induzida pelo p53 além de ser desencadeada pelo dano ao DNA celular pode resultar da ativação inapropriada do oncogene, deprivação de citoquinas, hipóxia e choque térmico (BELLAMY, 1997).

O painel completo de lesões do DNA que provocam a resposta à p53 é desconhecido, mas lesões primárias nas quais a p53 se liga diretamente *in vitro* incluem inserção/deleção mal conjugada e quebras nas fitas do DNA. A p53 se liga avidamente a estas quebras e isto a estabiliza e ativa. Além desta ligação, pouco é conhecido sobre como os outros desencadeadores da apoptose se ligam à p53 (BELLAMY, 1997) (KUMAN *et al*, 2005). Na identificação por imunohistoquímica é importante ressaltar que a positividade para p53 nem sempre corresponde a alterações da proteína. Outros fatores podem estabilizá-la (proteínas do HPV) e acumular-se nas células mesmo na ausência de mutações (ALVES *et al*, 1999).

In vitro, parece haver diferentes mecanismos através dos quais a p53 pode desencadear apoptose; um deles requer transativação transcricional específica da p53, talvez pela Bax, que na presença de relativo excesso de Bcl-2 permite apoptose. Entretanto, Bax é dispensável para a apoptose dependente de p53 em tímócitos gama-irradiados, sugerindo que outros fatores são mais importantes neste caso. Repressão transcricional da p53, por exemplo, pela Bcl-2, pode contribuir também para apoptose e influências de outros membros da família Bcl-2 são provavelmente relevantes como no caso da Bcl-x que inibe a apoptose mediado *in vitro* (BELLAMY, 1997).

Em animais vertebrados, a apoptose é empregada para eliminar linfócitos auto-reativos durante a diferenciação e para concluir a resposta imune a fim de remover linfócitos Antígenos-específicos (GRAVRILESCU *et al*, 2003). No caso de parasitas cinetoplastídeos, vários relatos mostram que ocorre um processo de morte celular semelhante a apoptose dos mamíferos. Entretanto, a despeito das similaridades fenotípicas, demonstrou-se que os mecanismos moleculares (indução/execução), pelo menos para os parasitas da *Leishmania*, diferem significativamente dos metazoários. Além disso, através da fragmentação do DNA em oligonucleossomos, observou-se que na fase estacionária de promastigotas e especialmente nas formas amastigotas de *L. major* e *L. amazonensis*, mesmo na ausência de fatores indutores (estresse), este processo foi independente das caspases ou das enzimas lisosomais catepsina-like. (OUASSI AL *et al*, 2003).

A importância da apoptose na modulação da resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea ainda é incerta. BERTHO *et al* em 2000, em um estudo realizado com citometria de fluxo nos subtipos de células T CD-4 e T CD-8 observou que foram detectadas numerosas células em apoptose inicial a despeito de seu aspecto morfológico normal. Neste estudo, nos pacientes que tiveram cura espontânea, observou-se pequeno número de células apoptóticas T CD-8, frequência similar verificada em células T CD-4 de pacientes com doença ativa. Apesar da amostra utilizada neste estudo ter sido pequena (15 pacientes com lesões ativas, 2 com lesões que curaram espontaneamente) os autores especulam que estes resultados em relação

ao T CD-8 podem apontar para seu papel no mecanismo de cura da leishmaniose cutânea localizada.

2.3. DIAGNÓSTICO

A caracterização da LTA é feita através de exames clínico, laboratorial e histopatológico.

A observação clínica tem sido muitas vezes o único meio de diagnóstico principalmente nas áreas endêmicas e afastadas dos meios de acesso aos exames complementares (FUNASA, 2000).

O diagnóstico laboratorial envolve identificação do parasita, provas imunológicas e caracterização das espécies de *Leishmania* por detecção de DNA, através de técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e anticorpos monoclonais (FUNASA, 2000).

O exame parasitológico direto em esfregaço é obtido por escarificação, punção aspirativa do exsudato ou biópsia das bordas da lesão com impressão por aposição (FUNASA, 2000).

Outras formas de identificação do parasita por métodos laboratoriais consistem em culturas em meios artificiais e inoculação em animais experimentais (hamster), em que se obtém o desenvolvimento de lesões geralmente após um mês da inoculação do parasita; isto torna o método pouco conveniente para o diagnóstico devido ao longo tempo necessário para avaliação, além de que a eficácia do isolamento é variável para as distintas cepas de *Leishmania* (FUNASA, 2000).

O diagnóstico imunológico através do teste de Intradermoreação de Montenegro (IDRM) consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml do antígeno preparado com promastigotas de cultura e revela o grau de sensibilização do hospedeiro contra o parasita. Considera-se positivo o aparecimento de endurecimento, perceptível à palpação, com diâmetro igual ou superior a 5 mm que aparece no prazo de 48 a 72 horas. Em indivíduos com a forma cutânea, a positividade do teste varia de 85% a 97%, segundo diferentes autores. Sua positividade geralmente permanece por toda vida, mesmo após tratamento ou após cicatrização espontânea das lesões. Nas áreas de elevada incidência de leishmaniose, chega a 30% a proporção de indivíduos sadios com o teste positivo (FALQUETO & SESSA, 2005). O teste pode ser negativo na fase inicial da doença, na forma cutânea difusa, na forma cutânea disseminada não tratada, na leishmaniose visceral e em imunodeprimidos (FUNASA, 2000).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem suas melhores utilidades para diagnóstico em casos de leishmaniose com lesões cutâneas múltiplas e nas lesões mucosas. A sua positividade está relacionada com o tempo de duração da doença, sendo o seu percentual de sensibilidade em torno de 71% nas formas cutâneas e 100% nas formas mucosas (FUNASA, 2000).

O teste imunoenzimático (ELISA) é utilizado para a detecção de anticorpos ou antígenos. É um método de ensaios de ligação direta em que é necessária a preparação pura de um antígeno e/ou anticorpo conhecido para que uma enzima seja ligada quimicamente (FUNASA, 2000).

A análise histopatológica do material cutâneo visa à identificação do parasita nos tecidos para o diagnóstico definitivo. As alterações da epiderme são em geral secundárias, não relacionadas com o tempo de evolução da lesão e podem consistir de acantose irregular, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, atrofia, ulceração ou destruição da camada basal. As lesões fundamentais estão localizadas no derma ou no córion onde o infiltrado inflamatório varia de intensidade e de acordo com a fase evolutiva da infecção (SILVEIRA & LAINSON, 1997).

A LC é uma doença crônica de longa evolução, apresentando polimorfismo lesional e, conseqüentemente, aspectos histopatológicos variáveis decorrentes da evolução do processo e da resposta imunológica do homem infectado (SILVEIRA & LAINSON, 1997).

Vários autores tentaram estabelecer uma classificação que fosse reprodutível para as diferentes apresentações histopatológicas verificadas na LC. A classificação que esta será utilizada nesta dissertação corresponde à de Magalhães modificada (2004):

1. Reação Exsudativa Celular (REC) - infiltrado histiolinfoplasmocitário dérmico ou no córion, com proporções celulares que tendem para a equivalência.
2. Reação Exsudativa e Necrótica (REN) - necrose tissular de amplitude e formato variáveis associada à vasculite aguda, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;
3. Reação Exsudativa e Necrótica-granulomatosa (RENG) - reação granulomatosa organizada nas proximidades de área de necrose tissular, com presença de células gigantes, macrófagos ativados e infiltrado histiolinfoplasmocitário associado;
4. Reação Exsudativa e Granulomatosa (REG) - reação granulomatosa desorganizada sem a presença de necrose tissular, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;
5. Reação Cicatricial (RC) - reação observada após a cura clínica com presença de escassos linfócitos em meio à fibrose da derme.

O diagnóstico etiológico através de biópsia nem sempre é possível, principalmente nas lesões cutâneas e mucosas com longo tempo de evolução.

3. JUSTIFICATIVA

A expansão geográfica da leishmaniose tem estimulado investigações e estudos comparativos que possam identificar ocorrências comuns no comportamento desta doença nas diversas regiões do país onde ocorre. Os mecanismos patogénéticos

ainda não se encontram plenamente esclarecidos e a utilização dos marcadores imune tissulares e de genes de expressão da apoptose podem contribuir para o conhecimento dos eventos envolvidos nesta cadeia.

A caracterização fenotípica das subpopulações de células T na lesão inflamatória da leishmaniose pode dar uma importante informação sobre a composição celular na área onde o parasita está.

Há 4 isoformas das proteínas do CD-1: CD1a, 1b, 1c e 1d. O CD-1a é expresso em uma variedade de células apresentadoras de antígenos tais como células de Langerhans e células reticulares interdigitantes (BISHOP, 2006).

O antígeno associado aos granulócitos CD-15 identifica neutrófilos e células dendríticas, mas não linfócitos e macrófagos. Para os linfócitos, os marcadores CD-45RO e CD-20 seriam os ideais. E os macrófagos podem ser expressos pelo antígeno CD-4 que identifica células T auxiliares/*helper* servindo como receptor para moléculas MHC tipo II (ALVES *et al*, 1999). CD-4 expressa linfócitos T *helper*, monócitos/macrófagos e células de Langerhans. Não é expresso em células B.

CD-8 é o antígeno que caracteriza as células T supressoras/citotóxicas. É uma molécula que serve como receptora para moléculas do MHC de classe I. O anticorpo anti-CD-8 marca 15-20% das células T das áreas interfoliculares dos linfonodos, mas cerca de 80% das células T da medula óssea e intestino são positivas (ALVES *et al*, 1999).

O antígeno leucocitário comum CD-45 é uma glicoproteína transmembrânica restrita aos leucócitos e usada como marcador genérico das lesões com proliferação de linfócitos que expressam células T. A variante de baixo peso molecular, CD-45RO, é altamente sensível e específica e é freqüente a co-expressão com lesões de células B. Para estas lesões (de células B), o melhor e mais usado marcador imunohistoquímico, altamente sensível e específico, é o CD-20 (ALVES *et al*, 1999).

O CD-68 é o marcador de macrófago mais confiável. O antígeno é expresso por uma proteína citoplasmática associada aos lisossomos. É capaz de marcar também neutrófilos e células de Langerhans (BISHOP, 2006).

O produto do gene Bcl-2 é uma proteína da membrana mitocondrial externa que inibe a apoptose, prolongando assim a sobrevivência celular (BROWN, 1997). É normalmente expresso em pequenos linfócitos B das células do manto e da zona marginal e em muitas células T. Sua expressão está associada a um melhor prognóstico em muitos carcinomas. Neste contexto, há uma relação inversa com a super expressão da p53 (ALVES *et al*, 1999).

Apoptose induzida pelo p53 além de ser desencadeada pelo dano ao DNA celular pode resultar da ativação inapropriada do oncogene, deprivação de citocinas, hipóxia e choque térmico (BELLAMY, 1997).

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Estudar os aspectos histopatológicos e imunohistoquímicos de pacientes com LTA, forma cutânea, em um grupo de pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília.

4.2. ESPECÍFICO

- Verificar, por meio de anticorpos monoclonais a ocorrência de fenótipos de células T e células B bem como a expressão dos marcadores para apoptose em pacientes com LC.
- Analisar a resposta imune *in situ* em pacientes com LC.
- Verificar a ocorrência de apoptose em pacientes com LC.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Definição da amostra

Amostra de conveniência, não probabilística, realizada em um centro de alta complexidade que funciona como referência para tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana no Distrito Federal, realizada em 46 pacientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, no período entre junho de 2005 e março de 2006.

5.2. Definição de caso

Paciente com lesão cutânea ulcerada, nodular ou papular, não atribuída ao trauma, sem tratamento medicamentoso prévio para leishmaniose, adicionado a histopatológico e mais dois exames laboratoriais positivos (presença positiva de parasitas). Pacientes com histórico de LC tratada com lesão residual. As características da população em estudo estão sumarizadas nos resultados.

5.3. Análise Histopatológica

Para o estudo histopatológico dos pacientes selecionados, o projeto recebeu a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Brasília (CEP-UnB) e cada participante do projeto procedeu à leitura e assinatura do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO. Nos pacientes sem maioridade legal, o termo foi assinado por parentes ou responsáveis (Anexo 2).

O material obtido por biópsia interessou a borda da úlcera e a pele sã, através de um *punch* de 6,0 mm, realizado sob condições estéreis e após anestesia local com xilocaína a 2%; este material foi fixado em formalina a 10%, incluído em parafina, cortado em 5 micrômetros e posteriormente corado em Hematoxilina e Eosina (H.E.).

Todas as lâminas receberam identificação prévia e foram examinadas pelos autores. A avaliação da intensidade das alterações histopatológicas foi feita segundo a classificação de Magalhães modificada, 2004.

5.4. Análise Imunohistoquímica

Para a realização do estudo imunohistoquímico, as células foram analisadas segundo os marcadores para células T (CD-4, CD-8, CD45-RO), células B (CD-20), macrófagos (CD-68, CD-4), células de Langerhans (CD-1a, CD-68, CD-15),

neutrófilos (CD-15, CD-68) utilizando-se também marcadores para identificar a expressão de genes relacionados com a apoptose (Bcl-2, Bcl-x, Bax e p-53).

Áreas do epitélio e da lâmina própria foram selecionadas aleatoriamente e o número de células positivas para cada marcador foi contado em 30 campos de 500 X correspondendo a uma área microscópica total de 1,4 mm².

A expressão dos marcadores celulares foi avaliada segundo critérios semi-quantitativos e qualitativos.

A técnica de imunohistoquímica utilizou o Kit Estreptavidina Peroxidase, e os seguintes anticorpos da Dako Cytomation e Neomarkers:

- a. M x H CD-45RO (célula T), da Dako, código M-0742, clone UCHL1.
- b. M x H CD-20CY (célula B), da Dako, código M – 0755, clone L26.
- c. M x H CD-8 (célula T), da Dako, código M-7103, clone C8/144B.
- d. M x H CD-68 (macrófago), da Dako, código M-0876, clone PG-M1.
- e. M x H CD-1a (timócito cortical), da Dako, código M-3571, clone 10.
- f. M x H CD-4AB-2 (célula T), da Neomarkers, código MS392S, clone 1F6.

Para identificar a expressão de genes relacionados com a apoptose, os anticorpos utilizados foram:

- a. Mx Bcl-2 oncoproteína da Dako, código M0887, clone 124, diluição de 1:100.
- b. R x H Bax da Dako, código A-3533, diluição de 1:3000.
- c. M x R Bcl-x da Dako, código M-4512, clone A -35-10, diluição de 1:100.

Os procedimentos técnicos para a utilização desses anticorpos foram divididos em várias etapas, conforme esquema abaixo:

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

b. Bloqueio da Peroxidase Endógena – após 3 banhos de 10 minutos, cada um, em solução de água oxigenada a 3% (equivalente à água oxigenada de 10 volumes) as

soluções foram trocadas e obtidas à maneira da água oxigenada (peróxido de hidrogênio a 3% mais ou menos 51ml e água destilada 460ml);

c. Pré-tratamento das lâminas – todos os marcadores foram pré-tratados com solução tampão citrato pH 6, exceto CD-4 onde foi utilizado o tampão EDTA pH 8; as lâminas foram dispostas em suportes plásticos e usou-se o vaporizador (Steamer), marca T-Fal; fez-se imersão em solução de tampão citrato pH 6 ou tampão EDTA pH 8 (de acordo com a exigência requerida pelo tipo de anticorpo primário utilizado) a 97°C, durante 30 minutos; retirou-se do vaporizador, ainda dentro da solução utilizada e foram esfriadas por um período de aproximadamente 15 minutos;

d. Preparo de tampão:

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

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

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

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

f. Reagentes secundários (Kit Dako K – 0690 – LSAB+) –as lâminas foram lavadas com TBS e o excesso foi cuidadosamente retirado com lenço de papel; foi gotejado o reagente secundário (indicado no Kit LSAB+) que recobriu toda a secção, logo após foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente;

g. Reagente Streptavidina Peroxidase (Kit Dako K-0690) – as lâminas foram lavadas com TBS e o excesso retirado com lenço de papel; foi gotejado o reagente

Streptavidina Peroxidase (indicado no Kit ISAB+) que recobriu toda a secção durante 30 minutos à temperatura ambiente.

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

i. Solução DAB – as lâminas foram lavadas com TBS e o excesso foi retirado com lenço de papel; a solução DAB foi gotejada e recobriu toda a secção durante 10 minutos.

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

k. Montagem das lâminas –as lâminas foram desidratadas, diafanizadas, montadas com resina sintética (Entellan) e deixadas úmidas;

l. Leitura das lâminas – as lâminas foram examinadas sob microscopia de luz, obedecendo aos critérios de análise de todos os campos microscópicos com objetivas de pequeno, médio e grande aumento; para a contagem de células marcadas, utilizando-se o método de semi-quantificação dos resultados da imunohistoquímica.

5.5. Métodos Estatísticos

5.2.1. Anova

Testa se várias médias são provenientes de populações de mesma média, ou seja, se as várias médias são iguais entre si.

5.2.2. Correlação Linear

Mede e avalia o grau de relação existente entre duas variáveis aleatórias.

5.2.3. Teste do Qui-quadrado

Verifica a associação entre duas variáveis dispostas em uma tabela de contingência composta de variáveis categóricas independente da quantidade de categorias em cada uma das variáveis.

5.2.4. Teste exato de Fisher

Verifica a associação entre duas variáveis dispostas em uma tabela de contingência se a amostra é pequena a frequência das células apresenta-se baixa.

6. RESULTADOS

Quarenta e dois (42) pacientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília foram submetidos à biópsia; eles não tinham história de infecção prévia ou tratamento para leishmaniose; eram portadores de úlceras cutâneas únicas ou múltiplas, com aspecto macroscópico sugestivo de Leishmaniose Cutânea. Quatro (04) pacientes tinham histórico de Leishmaniose Cutânea tratada e apresentavam lesão residual. Todos tinham histopatológico positivo na fase ativa da doença. Os pacientes foram agrupados segundo sexo, idade, naturalidade e local de contato. As lesões foram agrupadas segundo o número, a localização, o tempo de evolução e o padrão histopatológico presente (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos pacientes estudados discriminando número de biópsia, prontuário, sexo, idade, naturalidade e local de infecção, número de lesões, localização das lesões, tempo de evolução das lesões (em dias, meses e anos) e o padrão histopatológico das biópsias.

Número dos casos	Prontuário	Biópsia	Sexo	Idade	Naturalidade	Local de Infecção	Local das lesões	Número de lesões	Tempo de evolução das lesões (em dias, meses e anos)	Padrão histopatológico das biópsias
1	375464	3697	F	18	CE	CE	Pé	1	4 meses	celular
2	377898	3699	M	32	GO	Fercal	Abdome	1	30dias	celular
3	109598	3700	M	24	GO	GO	Antebraço D	1	6 meses	granulomatosa
4	383369	3701	M	44	DF	GO	Abdomen	7	30 dias	celular
5	388299	3704	F	59	BA	BA	Cotovelo	3	60 dias	celular
6	390072	3706	M	51	TO	TO	Pavilhão auricular	1	6 meses	necrotica
7	392178	3708	F	11	DF	GO	Dorso	1	2 anos	granulomatosa
8	391488	3709	F	6	TO	TO	Pavilhão auricular	1	2 anos	granulomatosa
9	391537	3710	M	21	PE	GO	Perna	1	60 dias	necrótica
10	394761	3711	M	24	BA	Ceilândia	Dorso	1	2 anos	necrotica-granulomatosa
11	394667	3712	M	73	BA	São Sebastião	Nariz, PunhoE, mão E	3	8 meses	cicatricial

Continua na página seguinte

Tabela 1. Relação dos pacientes estudados discriminando número de biópsia, prontuário, sexo, idade, naturalidade e local de infecção, número de lesões, localização das lesões, tempo de evolução das lesões (em dias, meses e anos) e o padrão histopatológico das biópsias. (Continuação)

Número dos casos	Prontuário	Biópsia	Sexo	Idade	Naturalidade	Local de Infecção	Local das lesões	Número de lesões	Tempo de evolução das lesões em dias e meses	Padrão histopatológico das biópsias
12	395402	3714	M	27	DF	MG	Perna	1	4 meses	granulomatosa
13	386507	8076	M	25	DF	BA	Perna	1	15 dias	granulomatosa
14	394015	3716	M	21	BA	BA	Dorso	1	2 anos	granulomatosa
15	399223	3718	M	26	SP	Planaltina	Mão	3	3 meses	celular
16	399015	3720	M	18	DF	MT	Antebraço	1	4 meses	necrótica
17	399215	3721	M	43	GO	GO	Antebraço	1	2 meses	celular
18	399677	3722	M	34	MG	MG	Perna	2	20 dias	celular
19	68000	3723	M	42	BA	São Sebastião	Cotovelo, antebraços	3	4 meses	granulomatosa
20	399676	3724	M	26	MG	Planaltina	Abdome	2	2 meses	necrótica

21	291806	3725	M	26	BA	GO	Perna, face	2	5 meses	celular
22	74947	3726	M	37	SC	GO	Antebraço	9	2 meses	granulomatosa
23	100580	3727	M	58	BA	BA	Antebraço	1	2 meses	granulomatosa
24	401840	3728	M	15	PA	PA	pernaE	1	3 meses	cicatricial
25	401887	3729	M	41	MG	Gama	Abdome	2	4 meses	necrótica-granulomatosa
26	401886	3730	F	64	MG	Sobradinho	Perna	1	30 dias	granulomatosa
27	401910	3731	M	50	BA	Ceilândia	Mão	2	3 meses	celular
28	401879	3732	M	15	DF	Gama	Perna	1	2 meses	necrotica-granulomatosa
29	402533	3733	M	41	PA	São Sebastião	PernaD	1	2 meses	celular
30	402542	3734	M	18	MG	MG	PernaE	1	3 meses	granulomatosa
31	40075	3735	M	35	GO	GO	PernaE	1	3 meses	granulomatosa
32	40660	3737	F	24	PI	PI	joelhoD	1	15 dias	celular
33	40072	3739	F	55	GO	GO	pernaE	1	45 dias	cicatricial
34	41446	3740	M	16	AC	AC	MãoD	1	3 meses	necrotica-granulomatosa
35	41434	3741	M	71	MG	GO	Pescoço	1	2 meses	granulomatosa
36	41404	3744	M	27			Antebraço; face	3	4 meses	granulomatosa
37	42322	3745	M	33	DF	Fercal		1	1 mes	celular
38	270404	3746	M	19	PI	PA	BraçoD,	1	5 meses	celular

Continua na página seguinte

Tabela 1. Relação dos pacientes estudados discriminando número de biópsia, prontuário, sexo, idade, naturalidade e local de infecção, número de lesões, localização das lesões, tempo de evolução das lesões (em dias, meses e anos) e o padrão histopatológico das biópsias. (Continuação)

Número dos casos	Prontuário	Biópsia	Sexo	Idade	Naturalidade	Local de Infecção	Local das lesões	Número de lesões	Tempo de evolução das lesões em dias e meses	Padrão histopatológico das biópsias
39	42278	3747	F	35	GO	São Sebastião	dorso	1	1 mes	necrot-granul
40	57685	3748	F	30	TO	PA	Rosto, torno,	varias	3 meses	necrot-granul
41	47251	3749	F	40	DF	GO			2meses	cicatricial
42	329178	5108	M	26	GO	São Sebastião	Perna D	1	3 meses	granulomatosa
43	325305	4629	M	17	DF	São Sebastião	Tornozelo D	2	3 meses	necrótica
44	258478	3273	M	31	BA	BA	Braço D	1	5 meses	necrótica
45	263359	3277	F	18	TO		malarE	3	2 anos	granulomatosa
46	329178	5200	M	22	GO	São Sebastião	Perna D	1	3 meses	celular

Tabela 2. Distribuição dos pacientes segundo o sexo.

sexo		
Sexo	Freqüência	Percentual
Masculino	35	76,1
Feminino	11	23,9
Total	46	100,0

Dos 46 pacientes estudados, 76,1% são do sexo masculino e 23,9% do sexo feminino (Tabela 2).

Tabela 3. Distribuição dos pacientes segundo a naturalidade.

Naturalidade		
Naturalidade	Freqüência	Percentual
BA	9	19,6
DF	9	19,6
GO	8	17,4
MG	6	13,0
TO	4	8,7
PA	2	4,3
PI	2	4,3
AC	1	2,2
CE	1	2,2
PE	1	2,2
SC	1	2,2
SP	1	2,2
Não respondeu	1	2,2
Total	46	100,0

Em relação às regiões do Brasil os pacientes foram assim provenientes: Nordeste: Bahia (19,6%), Piauí (4,3%), Ceará (2,2%) e Pernambuco (2,2%); Centro-oeste: Distrito Federal (19,6%), Goiás (17,4%) e Tocantins (8,7%); Sudeste: Minas Gerais (13,0%) e São Paulo (2,2%); Sul: Santa Catarina (2,2%); Norte: Acre (2,2%) e Pará (4,35) (Tabela 3).

Tabela 4. Distribuição dos pacientes segundo o local do contágio.

Contato		
Contato	Freqüência	Percentual
GO	11	23,9
São Sebastião	7	15,2
BA	5	10,9
MG	3	6,5
PA	3	6,5
Ceilândia	2	4,3
Fercal	2	4,3
Gama	2	4,3
Planaltina	2	4,3
TO	2	4,3
AC	1	2,2
CE	1	2,2
MT	1	2,2
PI	1	2,2
Sobradinho	1	2,2
Não respondeu	2	4,3
Total	46	100,0

Na distribuição dos pacientes segundo o local do contágio, o Distrito Federal esteve relacionado no histórico de 16 pacientes, provenientes da Ceilândia, Gama, Planaltina e São Sebastião e Sobradinho. Os casos importados foram a maioria e provenientes principalmente dos estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais e Pará. A grande maioria deles era de fora do Distrito Federal (28 pacientes, 60,9%) e 16 pacientes eram do DF (34,8%) (Tabela 4).

Tabela 5. Distribuição dos pacientes segundo o local da lesão.

Local da Lesão		
Local da Lesão	Freqüência	Percentual
Perna	6	13,0
Antebraço	4	8,7
Abdome	3	6,5
Dorso	3	6,5
PernaD	3	6,5
Braço D	2	4,3
Mão	2	4,3
Pavilhão auricular	2	4,3
PernaE	2	4,3
pernaE	2	4,3
Abdomen	1	2,2
Antebraço D	1	2,2
Antebraço; face	1	2,2
Cotovelo	1	2,2
Cotovelo, antebraços	1	2,2
MãoD	1	2,2
Nariz, PunhoE, mão E	1	2,2
Perna, face	1	2,2
Pescoço	1	2,2

Tabela 6. Distribuição dos pacientes segundo o número de lesões.

Número de lesões		
Número de lesões	Freqüência	Percentual
1	31	67,4
2	6	13,0
3	6	13,0
7	1	2,2
9	1	2,2
10	1	2,2
Total	46	100,0

A maioria dos pacientes analisados apresentou uma lesão (31 pacientes, 67,4 %) localizada em membros superiores (34,8%) e inferiores (34,8%). Na face foram observadas lesões em 08 pacientes (17,4%). As lesões de dorso e tronco ocorreram em igual número de pacientes (8,7%). Em dois pacientes não foi possível a identificação do local da lesão (Tabelas 5 e 6).

Tabela 7. Distribuição dos pacientes segundo o padrão histopatológico da lesão.

Padrão		
Padrão	Freqüência	Percentual
Celular	15	32,6
Cicatricial	4	8,7
Granulomatosa	15	32,6
Necrótica	6	13,0
Necrótica-Granulomatosa	6	13,0
Total	46	100,0

Dos 46 pacientes, 32,6% estão classificados no padrão exsudativo celular (Fig.1), 32,6% no padrão exsudativo granulomatoso (Fig.3 e 4), 13,0% no padrão exsudativo necrótico (Fig.2), 13,0% no padrão exsudativo necrótico-granulomatoso (Fig.5) e 8,7%, no padrão cicatricial (Fig.6) (Tabela 7).

Tabela 8. Comparativo entre as variáveis idade, número de lesões e tempo de evolução das lesões em dias.

variável	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Mediana	Percentis		
							25	50	75
Idade	46	32,3	16,0	6,0	73,0	27,0	21,0	27,0	41,0
Número de lesões	46	1,9	2,0	1,0	10,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Tempo (dias)	46	155,8	208,1	15,0	730,0	90,0	60,0	90,0	120,0

Os pacientes tinham entre 6 e 73 anos e a maioria apresentou de 41 anos de idade na época da pesquisa (Tabela 8).

O número de lesões variou entre 1 e 10 e a maioria (75% dos pacientes) apresentou uma lesão (Tabela 8).

O tempo mínimo de aparecimento das lesões foi 15 dias, o máximo, 730 dias (2 anos) e 75% dos pacientes desenvolveram as lesões em até 120 dias (Tabela 8).

Tabela 9. Comparativo entre as variáveis média, desvio-padrão, mediana e percentis para os marcadores imunocelulares e de apoptose.

variável	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Mediana	Percentis		
							25	50	75
CD1a	46	176,6	140,1	0,0	530,9	161,6	69,3	161,6	253,9
CD8	46	1284,2	731,1	0,0	2562,3	1385,0	807,9	1385,0	1800,6
CD15	46	166,6	376,3	0,0	2377,7	46,2	0,0	46,2	161,6
CD20	46	489,1	362,8	0,0	1431,2	346,3	207,8	346,3	761,8
CD45	45	2151,8	1083,1	277,0	4916,9	2077,6	1477,4	2077,6	2585,4
CD68	45	1214,4	522,8	46,2	2562,3	1177,3	969,5	1177,3	1546,6
Bcl2	43	964,2	848,1	0,0	4339,8	807,9	369,3	807,9	1362,0
Bclx	45	36,4	79,7	0,0	461,7	0,0	0,0	0,0	46,2
BAX	46	69,8	222,6	0,0	1131,1	0,0	0,0	0,0	0,0
p53	45	434,5	486,2	0,0	1731,3	253,9	46,2	253,9	669,4
CD4	42	1096,2	611,9	92,3	2631,6	934,9	738,7	934,9	1523,5

Para alguns marcadores imunohistoquímicos, o N apresentado é inferior a 46 (número de pacientes deste estudo); isto aconteceu devido à não adesão do fragmento de biópsia à lâmina. Nestes casos, o resultado está apresentado como “ausente” (Tabela 9 e Anexo 1).

Tabela 10. Comparativo entre os marcadores imunes celulares e de apoptose e o tempo de evolução das lesões (em dias).

Análise de variância (ANOVA)
Comparação entre o tempo (em dias) e os marcadores

Padrão	Valor F para Modelo anova	p-valor
CD1a	0,81	0,3732
CD8	3,90	0,0546
CD15	0,46	0,4993
CD20	0,97	0,3308
CD45	1,90	0,1752
CD68	2,23	0,1425
Bcl2	4,54	0,0391
Bclx	6,91	0,0119
Bax	0,61	0,4384
P53	1,34	0,2534
CD4	2,84	0,0998

De acordo com esta tabela verifica-se que existe diferença significativa somente entre o tempo e os marcadores Bcl-2 e Bcl-x (Tabela 10).

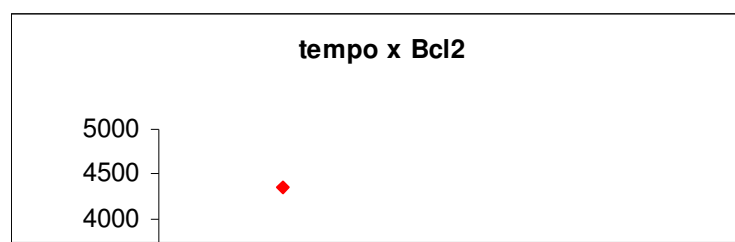
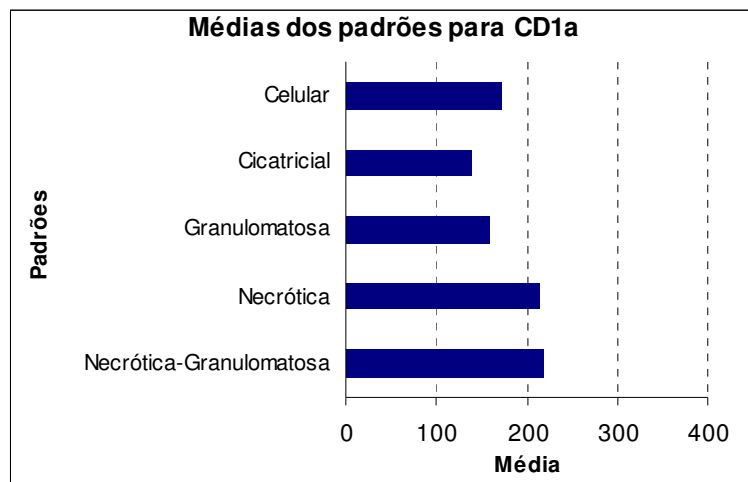


GRÁFICO 2. Comparativo entre tempo de evolução da lesão em dias e Bcl-x.

Verifica-se que o Bcl-x aumenta com o aumento do tempo de evolução das lesões em dias. O aumento de uma unidade no tempo (um dia) causa um aumento de 0,14 na variável Bcl-x (p -valor=0,0119) (Gráfico 2).



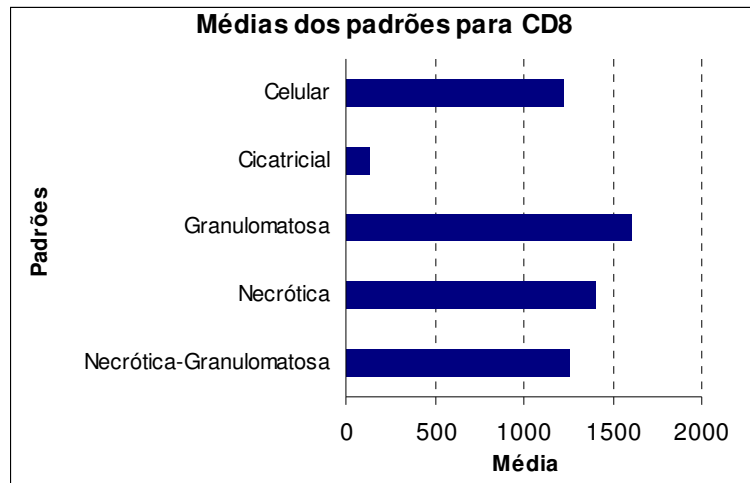
Médias de CD1a para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica-Granulomatosa	6	219,3
Necrótica	6	215,5
Celular	15	172,4
Granulomatosa	15	158,5
Cicatricial	4	138,5

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 3. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-1a.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre CD-1a e os padrões histopatológicos das biópsias, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,8266). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (Gráfico 3)(Fig.7).



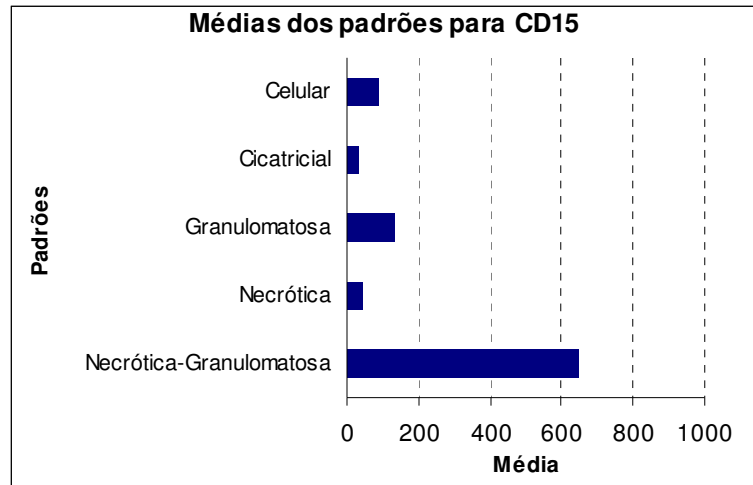
Médias de CD8 para os padrões

Padrão	N	Média
Granulomatosa	15	1611,3
Necrótica	6	1408,1
Necrótica-Granulomatosa	6	1261,9
Celular	15	1223,4
Cicatricial	4	132,7

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRÁFICO 4. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-8.

Verifica-se que embora o p-valor é menor que 0,05 (p-valor = 0,0057) indicando diferença estatisticamente significante entre os padrões histopatológicos e o CD-8, o teste de Scheffé mostra que o padrão exsudativo granulomatoso, exsudativo necrótico, exsudativo necrótico-granulomatoso e exsudativo celular não diferem entre si e que os padrões exsudativo celular e cicatricial também não diferem entre si (GRÁFICO 4)(Fig.9).



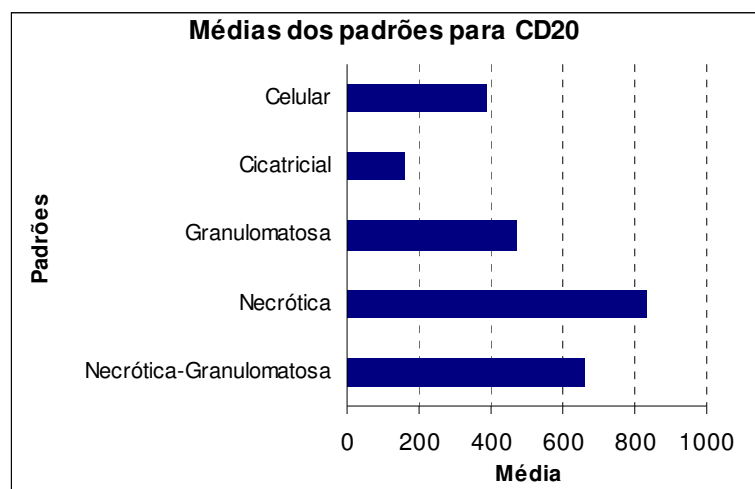
Médias de CD15 para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica-Granulomatosa	6	650,2
Granulomatosa	15	135,4
Celular	15	89,3
Necrótica	6	42,3
Cicatricial	4	34,6

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 5. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-15.

Verifica-se que embora o p-valor é menor que 0,05 (p-valor = 0,0126) indicando diferença estatisticamente significativa entre os padrões histopatológicos e o CD-15, o teste de Scheffé mostra que o padrão exsudativo granulomatoso, exsudativo necrótico-granulomatoso e exsudativo celular não diferem entre si e que os padrões exsudativo granulomatoso, exsudativo celular, exsudativo necrótico e cicatricial também não diferem entre si (GRAFICO 5)(Fig.10).



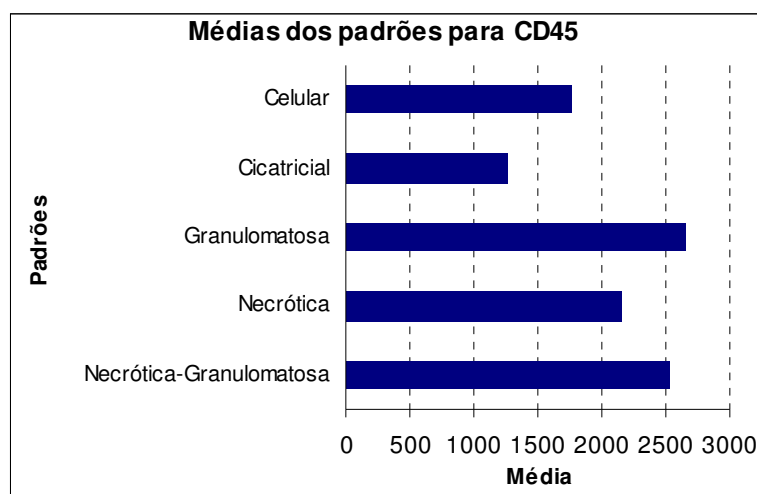
Médias de CD20 para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica	6	831,0
Necrótica-Granulomatosa	6	661,7
Granulomatosa	15	470,4
Celular	15	389,3
Cicatricial	4	161,6

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRÁFICO 6. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-20.

Verifica-se que embora o p-valor é menor que 0,05 (p-valor = 0,018) indicando diferença estatisticamente significativa entre CD-20 e os padrões histopatológicos, o teste de Scheffé mostra que os padrões exsudativo necrótico, exsudativo granulomatoso, exsudativo necrótico-granulomatoso e exsudativo celular não diferem entre si e que os padrões exsudativo necrótico-granulomatoso, exsudativo granulomatoso, exsudativo celular e cicatricial também não diferem entre si (GRÁFICO 6) (Fig.11).



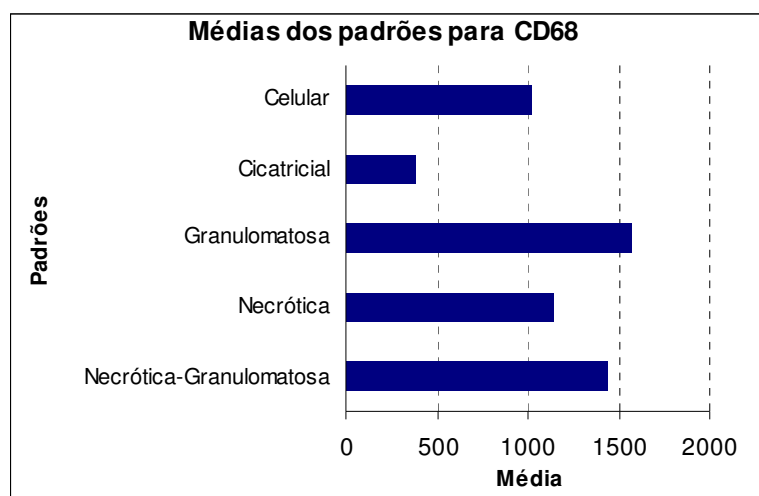
Médias de CD45 para os padrões

Padrão	N	Média
Granulomatosa	14	2659,6
Necrótica-Granulomatosa	6	2523,8
Necrótica	6	2161,0
Celular	15	1763,6
Cicatricial	4	1258,1

Nota: Teste Scheffé - Linha contínua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 7. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-45 RO.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre CD-45 e os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,0684). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 7) (Fig.12).



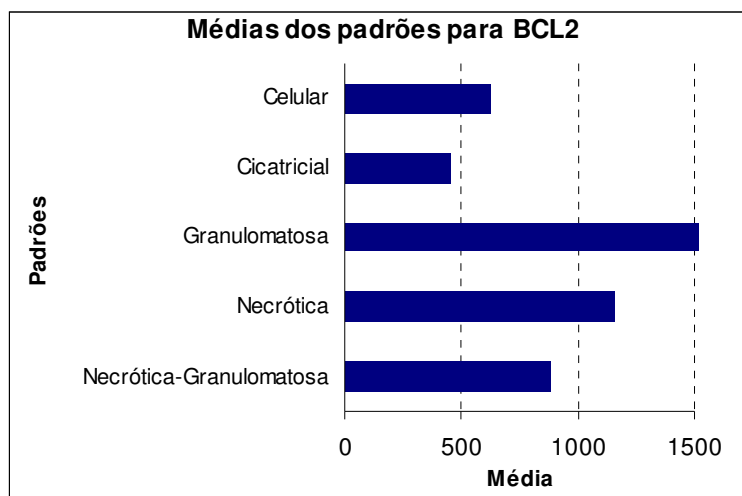
Médias de CD68 para os padrões

Padrão	N	Média
Granulomatosa	15	1571,2
Necrótica-Granulomatosa	6	1438,9
Necrótica	6	1138,8
Celular	15	1020,3
Cicatricial	4	380,9

Nota: Teste Scheffé - Linha contínua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 8. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-68.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre CD-68 entre os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi igual a 0,0001. De acordo com o teste Scheffé de comparação múltipla de médias, verifica-se que não existe diferença entre os padrões exsudativo granulomatoso, exsudativo necrótico-granulomatoso, exsudativo necrótico e exsudativo celular, mas estes diferem do cicatricial, ou seja, são estatisticamente maiores do que este. Entretanto verifica-se que não existe diferença entre os padrões exsudativo celular e cicatricial (GRAFICO 8) (Fig.13).



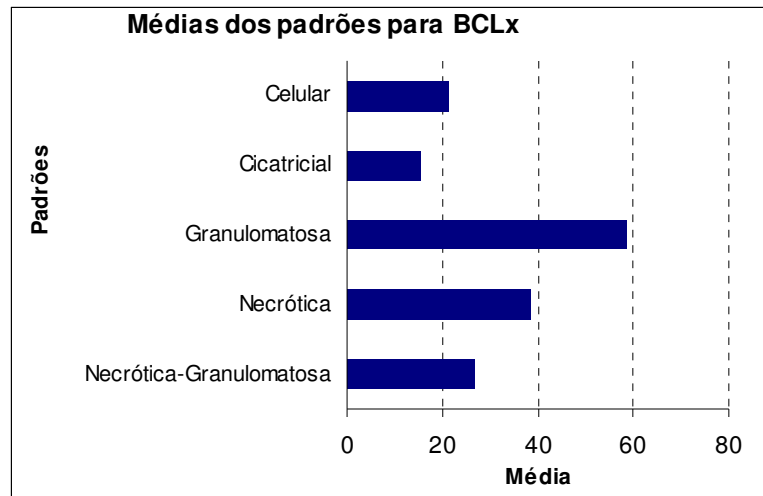
Médias de Bcl2 para os padrões

Padrão	N	Média
Granulomatosa	6	1531,2
Necrótica	15	1158,8
Necrótica-Granulomatosa	6	881,0
Celular	14	621,6
Cicatricial	2	450,1

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 9. Comparativo entre os padrões histopatológicos e Bcl-2.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significante entre Bcl-2 entre os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,1582). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 9)(Fig.14).



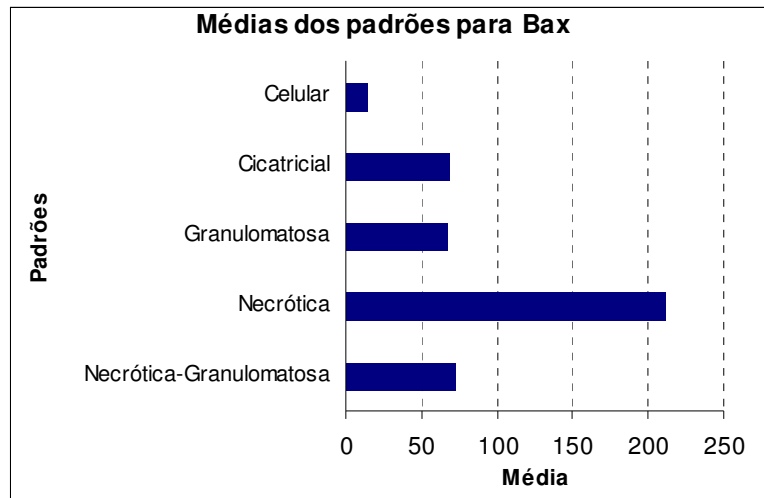
Médias de Bclx para os padrões

Padrão	N	Média
Granulomatosa	15	58,5
Necrótica	6	38,5
Necrótica-Granulomatosa	6	26,9
Celular	15	21,5
Cicatricial	3	15,4

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 10. Comparativo entre os padrões histopatológicos e Bcl-x.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre Bcl-x e os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,7587). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 10) (Fig.15).



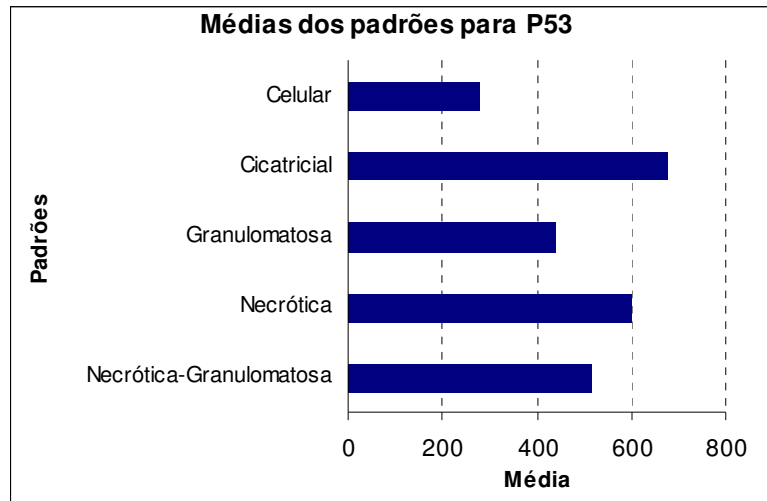
Médias de Bax para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica	6	211,6
Necrótica-Granulomatosa	6	73,1
Cicatricial	4	69,3
Granulomatosa	15	67,7
Celular	15	13,9

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRÁFICO 11. Comparativo entre os padrões histopatológicos e Bax.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre Bax e os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,5114). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRÁFICO 11) (Fig.16).



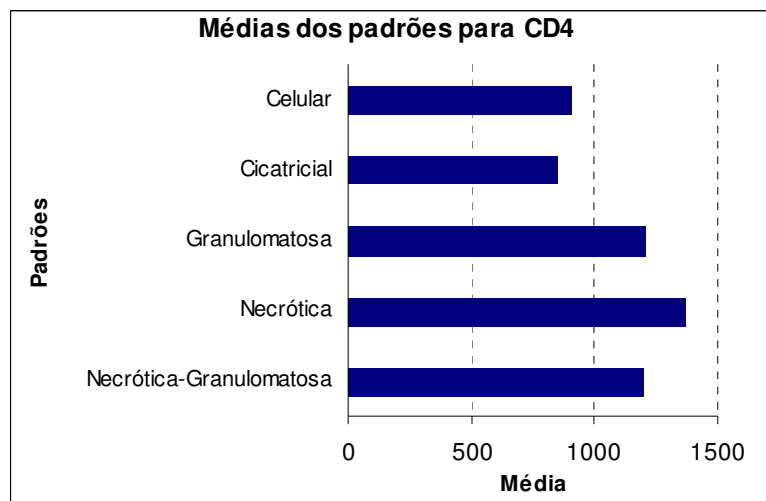
Médias de P53 para os padrões

Padrão	N	Média
Cicatricial	3	677,1
Necrótica	6	600,2
Necrótica-Granulomatosa	6	515,5
Granulomatosa	15	441,7
Celular	15	280,1

Nota: Teste Scheffé - Linha contínua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRÁFICO 12. Comparativo entre os padrões histopatológicos e p53.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre p53 e os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,5543). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRÁFICO 12) (Fig.17).



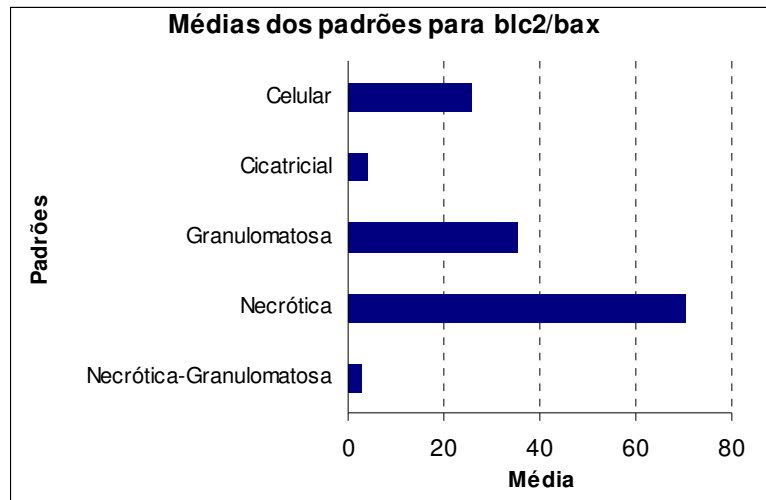
Médias de cd4 para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica	6	1369,6
Granulomatosa	14	1207,0
Necrótica-Granulomatosa	4	1203,2
Celular	14	906,9
Cicatricial	4	854,1

Nota: Teste Scheffé - Linha contínua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 13. Comparativo entre os padrões histopatológicos e CD-4.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre CD-4 entre os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor=0,4571). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 13).



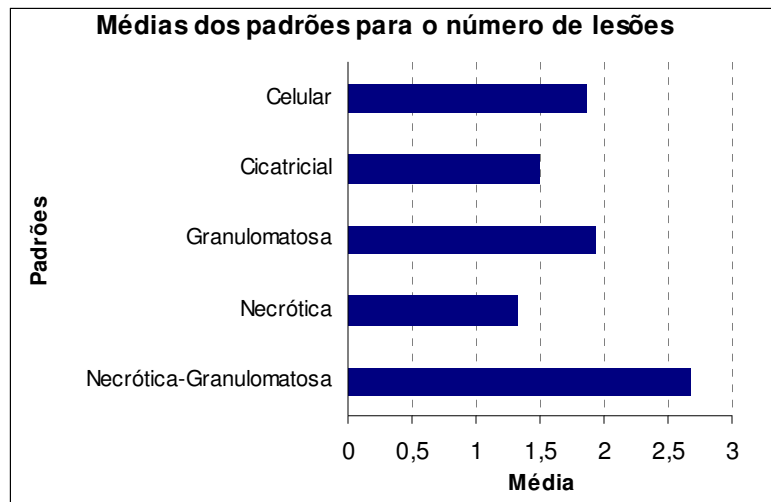
Médias de bcl2/bax para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica	3	70,5
Granulomatosa	2	35,5
Celular	1	26,0
Cicatricial	1	4,3
Necrótica-Granulomatosa	2	3,0

Nota: Teste Scheffé - Linha contínua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 14. Relação entre Bcl-2/Bax.

Para fazer a análise da razão Bcl-2/Bax retiraram-se as observações iguais a zero do Bax e do Bcl-2, ficando com somente 9 observações. Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa para a razão Bcl-2/Bax entre os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,8683). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 14).



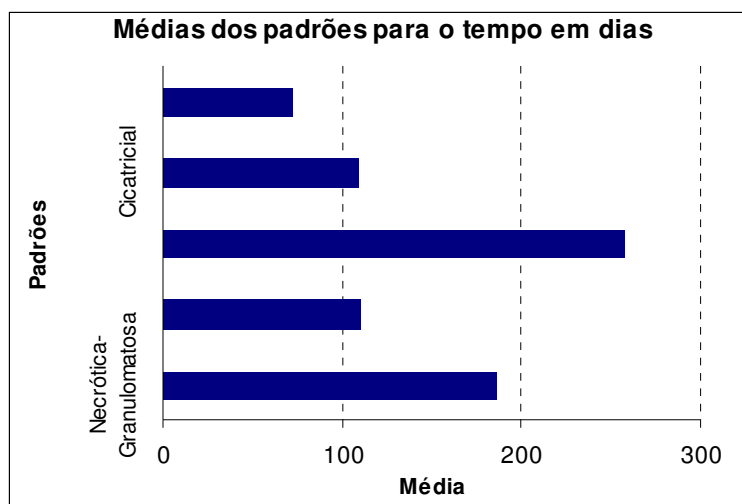
Médias do numero de lesões para os padrões

Padrão	N	Média
Necrótica-Granulomatosa	6	2,7
Granulomatosa	15	1,9
Celular	15	1,9
Cicatricial	4	1,5
Necrótica	6	1,3

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 15. Comparativo das médias entre os padrões histopatológicos e o número de lesões.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa para o número de lesões e os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,8266). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 15).



Médias do tempo em dias para os padrões

Padrão	N	Média
Granulomatosa	15	257,7
Necrótica-Granulomatosa	6	186,7
Necrótica	6	110,0
Cicatricial	4	108,8
Celular	15	72,3

Nota: Teste Scheffé - Linha continua indica que não existe diferença significativa entre os grupos

GRAFICO 16. Comparativo das médias entre os padrões histopatológicos e o tempo de evolução das lesões em dias.

Verifica-se que não existe diferença estatisticamente significante entre o tempo de evolução das lesões em dias e os padrões histopatológicos, pois o p-valor obtido foi maior do que 0,05 (p-valor = 0,153). Este resultado também pode ser confirmado no teste Scheffé de comparação múltipla de médias (GRAFICO 16).

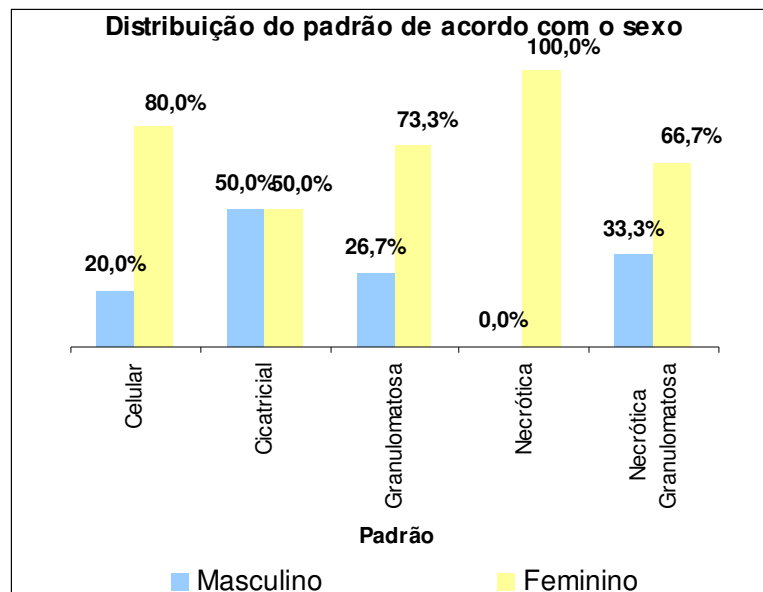


GRAFICO 17. Distribuição de freqüência entre os padrões histopatológicos e o sexo.

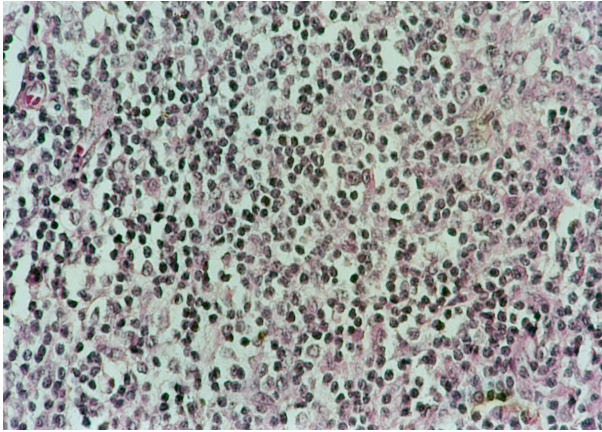
TABELA 11. Comparativo entre o padrão histopatológico e o sexo.

Distribuição do padrão dos pacientes de acordo com o sexo.

Padrão	Masculino		Feminino		Total	
	Freq	%	Freq	%	Freq	%
Celular	3	20,0	12	80,0	15	100,0
Cicatricial	2	50,0	2	50,0	4	100,0
Granulomatosa	4	26,7	11	73,3	15	100,0
Necrótica	0	0,0	6	100,0	6	100,0
Necrótica-G	2	33,3	4	66,7	6	100,0

Teste utilizado: Teste Exato de Fisher - p-valor = 0,4130

De acordo com a distribuição de freqüência entre os padrões histopatológicos e o sexo, verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa, pois o p-valor obtido no teste exato de Fisher foi de 0,4130. Embora a distribuição do sexo aparentemente seja diferente para cada padrão, esta diferença não é estatisticamente significativa (TABELA 11 e GRAFICO 17).



**Figura 1. Caso 42. Infiltrado linfo-histioplasmocitário.
Padrão exsudativo-celular. HE 40X**

Figura 3. Caso 18. Granuloma em organização com células-gigantes e histiócitos. Padrão exsudativo granulomatoso. HE 40X

Figura 5. Caso 10. Necrose e granuloma organizado com células-gigantes e

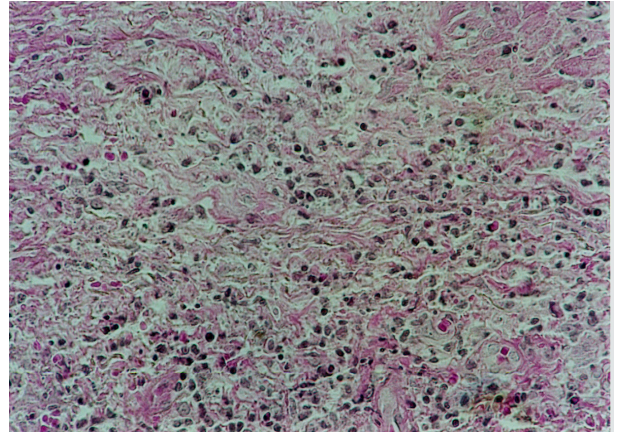


Figura 2. Caso 6. Linfócitos, histiócitos e plasmócitos em área de necrose. Padrão exsudativo-necrótico. HE 40X

Figura 4. Caso 22. Granuloma desorganizado. Células-gigantes, linfócitos, plasmócitos e amastigotas de *Leishmania* no interstício. Padrão exsudativo granulomatoso. HE 40X

histiócitos. Padrão exsudativo necrótico-granulomatoso. HE 40X

Figura 6. Caso 24. Escassos linfócitos, neoformação vascular e fibrose. Padrão

cicatricial.HE 40X

Figura 7. Caso 9. CD-1a identificando células de Langerhans.HE 40X

Figura 8. Caso 20. CD-4 identificando linfócitos T *helper*. HE 40X

Figura 9. Caso 30. CD-8 identificando linfócitos T supressores. HE 40X

Figura 10. Caso 25. CD-15 identificando polimorfonucleares em área de necrose. HE 40X

Figura 11. Caso 19. CD-20 identificando linfócitos B. HE 40X.

Figura 12. Caso 21. CD-45RO identificando linfócitos pan-T. HE 40X.

Figura 13. Caso 23. CD-68 identificando células de Langerhans. HE 40X

Figura 14. Caso 31. Bcl-2. HE 40X.

Figura 15. Caso 25. Bcl-X. HE 40X.

Figura 16. Caso 37. Bax. HE 40X

Figura 17. Caso 10. p53. HE 40X

7. DISCUSSÃO

No material de estudo e considerando tratar-se de uma amostra de pacientes que procuraram espontaneamente o Ambulatório de Dermatologia do HuB é mesmo de se esperar que o local mais freqüente de infecção seja o Distrito Federal sendo os pacientes provenientes das cidades-satélites Planaltina, Samambaia, São Sebastião, Ceilândia, Gama e Sobradinho. Os casos de fora do Distrito Federal foram provenientes principalmente dos estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais e Pará confirmando, portanto, a tendência observada nos anos anteriores. O custo de vida elevado observado no Plano Piloto (Asa Norte, Asa Sul, Lago Norte e Lago Sul) pode ser o responsável por um grande número de pessoas vivendo nas cidades-satélites. Estes locais, que guardam proximidade às zonas de matas existentes no Distrito Federal, aliados à introdução da prática do ecoturismo e subsequente exploração da mata do cerrado, podem ter contribuído para o aumento do número de novos casos nesta região. A participação de pacientes do DF foi expressiva, considerando-se que até há poucos anos não se registravam casos de LTA nessa unidade da Federação. Em 2003, aliás, foi registrado um surto na cidade de São Sebastião, reforçando a autoctonia da doença no DF. Suportando essas observações, pesquisas revelam a presença de vetores da doença no DF, ainda que neles não tenham sido encontrados parasitas (NAME *et al*, 2005).

Neste trabalho, constatou-se a predominância do sexo masculino (76,1%) sobre o sexo feminino (23,9%). A alta taxa de incidência em pacientes do sexo masculino está relatada em outros estudos (NIMRI, 2002) e pode estar relacionada a uma maior exposição deste sexo a locais endêmicos onde é mais comum a picada de insetos (viagem a trabalho e/ou lazer). Relacionando a distribuição dos padrões histopatológicos com a variável sexo, a amostra, ainda que predominantemente de pacientes do sexo masculino, não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação sexo.

Em relação ao número de lesões, a maioria dos pacientes apresentou uma lesão localizada em membros superiores e/ou inferiores. Na face, dorso e tronco

as lesões ocorreram em menor número. Em dois pacientes não foi possível a identificação do local da lesão. Estes dados estão de acordo com os relatos de FALQUETO & SESSA (2005), onde os pacientes normalmente apresentam uma ou poucas lesões iniciais, no local da inoculação do parasita pelo inseto e em áreas expostas do corpo onde o mosquito tem fácil acesso. Os pacientes que reagem à infecção com adequada resposta imune celular, que são a maioria, desenvolvem a forma localizada da doença, restrita a um ou mais sítios primários de inoculação do parasita. Entretanto, em pequena parcela de indivíduos com inadequada resposta imune celular, surgem várias lesões secundárias na pele (mais de 20 lesões), a chamada forma disseminada (FALQUETO & SESSA, 2005). Nesta pesquisa, todos os pacientes apresentaram resposta imune celular verificada através dos marcadores de linfócitos T (CD-4, CD-8 e CD45 RO) e nenhum deles desenvolveu a forma disseminada da doença.

No presente trabalho foram reconhecidos os seguintes padrões histopatológicos: exsudativo celular, exsudativo necrótico, exsudativo necrótico granulomatoso, exsudativo granulomatoso e cicatricial. Dos cinco padrões descritos, exsudativo celular e exsudativo granulomatoso foram os mais freqüentes. Exsudativo celular foi observado na maior parte das lesões que se desenvolveram em até 5 meses de evolução, e o padrão exsudativo granulomatoso foi predominante naquelas cujas lesões se desenvolveram em até 2 anos. Observa-se então que, após apresentação histopatológica inicial (exsudativo celular), os padrões exsudativo necrótico e necrótico granulomatoso surgem e evoluem para a apresentação histopatológica final, o padrão exsudativo granulomatoso, confirmando os trabalhos de MAGALHÃES (1986). Segundo este autor, todos os padrões histopatológicos são etapas de um mesmo processo que se superpõem à reação de base (exsudativo celular). Por fim, foi encontrado um pequeno número de pacientes com o padrão cicatricial, sinalizando o estágio de resolução histológica da doença.

Quando foram relacionados os marcadores de imunofenotipagem (CD-1a, CD-4, CD-8, CD-15, CD-20, CD-45RO, CD-68) com os padrões histopatológicos (exsudativo celular, exsudativo necrótico, exsudativo necrótico-granulomatoso, exsudativo granulomatoso e cicatricial), observou-se que, embora alguns marcadores

predominassem em certos padrões histopatológicos, não houve diferença estatisticamente significativa.

O estudo do CD-1a confirma a presença células apresentadoras de antígenos (APC) em todos os pacientes estudados. A inflamação suscitada pela LC ativa as APC porque estas iniciam e modulam as respostas imunes. As APC são componentes normais na pele humana (CERIO, 1993) e reconhecem diretamente os antígenos através de seus receptores (BLANK apud CUTLER 2001). A ligação com estes receptores é fundamental na resposta imune celular. As células B, precursoras das células secretoras de anticorpo, podem reconhecer diretamente antígenos inatos através de seus receptores, mas os linfócitos T necessitam que o antígeno seja apresentado pelas APCs (BANCHEREAU, 1998).

CD-1a esteve discretamente predominante nos padrões necrótico granulomatoso e exsudativo necrótico. Como os macrófagos estão presentes em grande número nestes padrões, seja em processo de necrose ou na formação de granulomas, é esperado que eles sejam identificados com freqüência por este marcador.

O imunomarcador CD-15 esteve presente em todos os pacientes, mas foi expresso, principalmente, no padrão necrótico granulomatoso. A positividade para o CD-15 em tipos histológicos que não estão associados à necrose (cicatricial, celular e granulomatoso) está relacionada à presença de células dendríticas (células de Langerhans da epiderme e células intersticiais da derme) (ALVES *et al*, 1999) que são acionadas na resposta imune da LC (BLANK apud CUTLER, 2001).

A positividade para CD-15 nos padrões histopatológicos que têm necrose (necrótico e necrótico-granulomatoso) identifica polimorfonucleares na área central da lesão. Para RIDLEY (1979) e MAGALHÃES (1986), a necrose resulta de reação antígeno-anticorpo, fixação de complemento e atração para os tecidos de granulócitos neutrófilos que após sua explosão citotóxica resulta em dano tissular necrótico e constitui um mecanismo importante da lise dos parasitas. Na fase inicial da necrose, a maioria das formas amastigotas seria eliminada junto com o material necrótico, através da úlcera e, em fase posterior, ocorreria a degradação de parasitas remanescentes, precedendo a resolução. A predominância deste marcador

era esperada também no padrão exsudativo necrótico, o que não ocorreu neste estudo.

Ao estudar o CD-68 observou-se que todos os pacientes apresentaram marcação celular, com predomínio no padrão exsudativo granulomatoso seguido pelo exsudativo necrótico granulomatoso, o que demonstra que há ativação dos macrófagos e células de Langerhans no processo inflamatório gerado na LC.

A marcação para o CD-45RO foi mais expressiva no padrão exsudativo granulomatoso, seguido pelo padrão exsudativo necrótico granulomatoso. Uma provável explicação é o recrutamento de linfócitos para a formação do granuloma. A análise da frequência de células B (utilizando o marcador CD-20) e de células T (marcador CD-45RO), demonstrou uma contagem numérica de CD-45RO quatro vezes superior à do CD-20. Deste modo, pode-se demonstrar o predomínio da resposta imune celular em relação à resposta humoral em todos os pacientes, semelhante ao verificado por VIEIRA *et al* (2002).

A resposta imune celular está representada pelos linfócitos T CD-4 e T CD-8. As células T CD4 podem ser fontes de citocinas no meio local da ativação primária de células T específicas à *Leishmania*. Estas células estão divididas em 2 sub-populações, Th1 e Th2. As características diferentes destas sub-populações implicam em funções diferentes no curso da elaboração da resposta imune. As células Th1 estão envolvidas principalmente na eliminação de patógenos intracelulares e nas respostas imunológicas do tipo celular. Por outro lado, os linfócitos ditos do tipo Th2 estão envolvidos na indução da resposta humoral (PINHEIRO 2004).

Todos os pacientes que foram avaliados nesta pesquisa apresentaram involução das lesões, então, apresentaram uma predominância da resposta imune celular com características da sub-população Th1.

Os marcadores CD-4 e CD-20 predominaram no padrão exsudativo necrótico. A tendência à predominância do CD-4 no padrão exsudativo necrótico que se verificou neste trabalho, está de acordo com estudos de TERABE *et al* (2000) que observou o papel das células CD-4 no desenvolvimento de úlceras em ratos infectados por *Leishmania amazonensis*. A tendência à marcação de CD-20

predominar neste mesmo padrão pode ser atribuída ao recrutamento de células B responsáveis pela produção de anticorpos que devem participar da reação antígeno-anticorpo na gênese da necrose imuno-induzida como proposto por MAGALHÃES (1986).

O papel das células B na Leishmaniose ainda não está claro. Altos níveis de anticorpos estão presentes nas formas clínicas mais severas da doença cutânea, a LC difusa. Parece que as células B são importantes na indução da reação de hipersensibilidade tardia em cepas de camundongos resistentes além de participarem do desenvolvimento da resposta humoral em animais suscetíveis (VIEIRA *et al*, 2002).

Alguns dados sobre a função dos linfócitos B foram obtidos através do estudo com modelos experimentais de LC em animais que não produziam células B. Quando estes animais receberam IL-7 (fator hematopoiético de células B) ou células B se verificava um aumento da suscetibilidade à doença. Por outro lado, na Leishmaniose visceral, o aumento da resistência foi demonstrado em camundongos sem células B maduras (GOTO & LINDOSO, 2004).

Para distinguir o efeito das células B daqueles causados pelas imunoglobulinas, os pesquisadores estudaram ratos geneticamente modificados que não produziam anticorpos circulantes, com e sem células B funcionantes. Estes estudos mostraram que a presença de anticorpos circulantes é crucial para o desenvolvimento da suscetibilidade na LC. Pesquisas *in vitro* com amastigotas obtidos em lesões de LC mostram que estas formas são opsonizadas por IgG e internalizadas por macrófagos, o que leva à produção de IL-10 e, conseqüente, à multiplicação intracelular do parasita (GOTO & LINDOSO, 2004). Enquanto as células T CD-4 têm seu papel bem esclarecido na evolução da Leishmaniose, tanto na forma tegumentar como na visceral, os pesquisadores ainda não têm dados conclusivos sobre a função das células T CD-8. Apesar das células T CD-8 demonstrarem serem importantes para a imunidade da reinfecção em camundongos que obtiveram cura de suas lesões primárias, camundongos C57BL/6 deficientes em CD-8 mantiveram sua habilidade de cura, bem como camundongos tratados com anticorpos anti-CD-8, o que indica que estas células não são

requisitadas para o controle primário da infecção envolvendo altas doses de inóculo por via sub-cutânea em animais (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

No trabalho de GOTO & LINDOSO (2004) a resistência à infecção na Leishmaniose visceral envolve não só as células T CD-4, mas também as células T CD-8, e a suscetibilidade envolve, entre outras, células B. Estes autores ressaltam a participação das células T CD-8 na redução da carga parasitária na leishmaniose visceral. No presente trabalho, os pacientes apresentaram marcação para CD-8, e, de modo geral, houve predomínio destas células sobre as células T CD-4. Como todos os pacientes desta pesquisa apresentaram confirmação de cura clínica, supõe-se que os linfócitos T CD-8 sejam realmente importantes no mecanismo de resistência à LC. O linfócito T CD-8 estaria envolvido em dois mecanismos de inativação do parasita: a liberação de IFN- γ , uma das principais citocinas envolvidas na lise da *Leishmania*, e a sua capacidade citotóxica que provoca a liberação dos parasitas através da lise de células hospedeiras infectadas que são incapazes de desencadear a morte intracelular do parasita. Esta liberação torna os parasitas disponíveis para serem fagocitados por células mais responsivas aos sinais de ativação, como os macrófagos (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Em cinetoplastídeos como *Leishmania*, *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma brucei*, a morte celular programada tem importante papel na regulação da complexa interação entre organismos multicelulares e unicelulares permitindo o estabelecimento e a persistência da relação hospedeiro/parasita. O fenômeno de apoptose pode reduzir o início da inflamação e favorecer a evasão do parasita do sistema imune do hospedeiro (SHAHA, 2006).

A apoptose em células T tem sido relatada na Leishmaniose visceral experimental. No estudo de GOTO & LINDOSO (2004) mais de 40% das células CD-4 dos ratos suscetíveis, mas não dos ratos resistentes, sofreram apoptose. Além disso, a apoptose foi detectada em células inflamatórias no fígado e baço de pacientes com infecção por *L. donovani*. Estes autores estudaram ainda a apoptose *in vivo* em hamsters com Leishmaniose visceral e observaram este fenômeno na fase inicial da infecção por *L. (L.) chagasi*. Entretanto, assim que a doença progrediu, a apoptose desapareceu de células do fígado e baço, sugerindo proteção dos

macrófagos contra a *Leishmania*. Segundo estes autores, deduz-se que com a evolução da infecção na Leishmaniose visceral a apoptose pode diminuir sua expressão, desaparecendo das células do sistema imune.

Em nosso estudo, a análise dos marcadores da apoptose em relação ao tempo de evolução da doença, mostrou que, após 2 anos, Bcl-2 e Bcl-x aumentaram seus valores e isto foi estatisticamente significativo. Para cada aumento de um dia, Bcl-2 aumentou 1,25 vez e o Bcl-x 0,14 vez em relação ao número de células. O Bcl-2 está presente na membrana mitocondrial externa, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático (face citosólica). A sua habilidade em regular a apoptose parece estar relacionada à presença de aminoácidos hidrofóbicos inseridos entre as membranas associados à estabilização do gradiente de cálcio entre o citoplasma e o retículo endoplasmático. Formam-se poros reguláveis que permite o controle iônico e assim, a supressão da apoptose pelo Bcl-2. A proteína pró-apoptótica Bcl-x tem semelhança estrutural com o Bcl-2 (BROWN, 1997) e devido a isto, pensa-se que o efeito observado em um pode ser o mesmo em outro. Supõe-se que, após 2 anos de doença não tratada, ocorra um desequilíbrio iônico que de algum modo favoreça a permanência do parasita no local da infecção ou de modo sistêmico e isto pode ser identificado por imunohistoquímica. Estes achados abrem perspectivas para que estudos sejam desenvolvidos no sentido de avaliar o papel deste complexo mecanismo da morte celular em organismos unicelulares.

A compreensão do processo de morte celular dos macrófagos pode oferecer novas possibilidades para o controle da infecção por LC. No presente trabalho, levantou-se a hipótese da participação da apoptose nos fenômenos necróticos da LC. A apoptose seria uma maneira do parasita ser eliminado do tecido com a eliminação das células do sistema imune. No entanto, não houve identificação significativa dos marcadores anti (Bcl-2, Bax) ou pro-apoptóticos (Bax, p53) nos padrões histológicos. Especula-se se realmente o mecanismo de morte celular programada não é um fenômeno significativo nos pacientes com LC ou se a morte das células estaria acontecendo por necrose e não por apoptose.

A p53 identifica a presença da lesão do DNA por mecanismos desconhecidos e ajuda no processo de reparação por produzir parada do

crescimento celular e indução dos genes de reparo. A célula cuja reparação é impossível é direcionada, deste modo, para a apoptose. Neste estudo, a marcação de p53, quando comparada com as dos demais marcadores de apoptose, embora presentes, não apresentou diferença estatisticamente significativa nas biópsias. Isto poderia levar à suposição de que o dano celular observado na LC poderia não acontecer por um mecanismo de apoptose. No futuro, a elucidação de eventos moleculares que regulam o processo de morte celular permitirá a identificação de como a apoptose influencia o sistema imune do hospedeiro e dos alvos mais suscetíveis à uma intervenção terapêutica mais eficaz.

8. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer uma relação positiva entre os padrões histopatológicos e a resposta imune associada à LC nestes pacientes.

A verificação, através da imunohistoquímica, do aumento de células T sobre as células B reforça a predominância da resposta imune celular sobre a humoral na patogenia da LC nestes pacientes.

O uso de marcadores de apoptose e imune tissulares podem ser úteis na elucidação de eventos que regulam o processo de morte celular na interação hospedeiro –parasita.

A influência do tempo de evolução da doença sobre os marcadores anti-apoptose abre a possibilidade de investigação de um desequilíbrio iônico que de algum modo favorece a permanência do parasita no local da infecção na patogenia da Leishmaniose Cutânea.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander J. *apud* Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG- **Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp.*** Infection and Immunity, 70(5): 2288-2296, 2002.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J-**Manual de imunohistoquímica.** São Paulo: Sociedades Brasileiras de Patologia, 1999.

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

Barral A, Jesus A, Almeida R P, Carvalho E M, Barral-Netto M, Costa J M L, Badaro R, Rocha H, Johnson W D- **Evaluation of T-cell subsets in the lesions infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Parasite Immunology, 9, 487-497, 1987.

Barral NM, Badaró R, Barral A, Carvalho EA – **Imunologia da Leishmaniose Tegumentar.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 19(3), 173-91, 1986.

Banchereau J, Steinman R M- **Dendritic cells and the control of immunity.** Nature, 39:245–252,1998.

Bellamy COC – **p53 and apoptosis.** British Medical Bulletin, 53(3):522-538, 1997.

Bertho A L, Santiago M A, Da Cruz A M, Coutinho S G -**Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis.** Brazilian Journal of Medical and Biology Research, (33): 317-325,2000.

Brown R – **The Bcl-2 family of proteins.** British Medical Bulletin, 53(3): 466-477 1997.

Cerio R -**Dermal dendrocytes and factor XIIIa in normal and pathological skin.** Annals Dermatology Venereology, (120): 53-57, 1993.

Couto MJAA – **Leishmaniose Tegumentar no Maranhão. Estudo histopatológico e imunohistoquímico da forma difusa da doença.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 113p. 2004.

Blank C *apud* Cutler WC, Jotwani R, Puledran B - **Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel?** Infection Immunology. 69(8): 4703–4708,2001.

Cutler WC, Jotwani R, Puledran B- **Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel?** Infection Immunology. 69(8): 4703–4708,2001.

- Debrabant A, Lee, N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi H- **Programmed cell death In trypanosomatids and other unicellular organisms REVIEW ARTICLE.** International Journal for Parasitology, 33(3): 2257-26,2002.
- Falqueto A, Sessa PA - **Leishmaniose Tegumentar Americana.**In: Veronesi - Tratado de Infectologia. 3. ed., São Paulo: Atheneu, V (1): 1543-1557,2005.
- Goto H, Lindoso JAL- **Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis Review**-Brazilian Journal of Medical and Biological Research (37): 615-623,2004.
- Gravrilesco CL, Denkers EY-**Apoptosis and the Balance of Homeostatic and Pathologic Response to Protozoan Infection.** *Infection Immunology*, 71(11): 6109-6115, 2003.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N – **Doenças da Imunidade.** Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças, 7 ed: 1592-1662,2005.
- Leão M L, Lopes D M U, Ferreira A C I, Michelena LF-(1975) **Estatística Para Alunos da atual “pesquisa operacional”.** (2): 154-164,1975.
- Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. [sítio da internet]. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. Brasília/DF, 2000. Disponível em: <http://www.saude.ms.gov.br/externo/downloads/LeishmanioseTegumentar.pdf>. Acessado em maio, 2005.
- Magalhães AV – **Comprehensive histopathological studies on tegumentary leishmaniasis.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 30 (Supl. I): 160-161 1997.
- Magalhães AV – **Histopatologia da leishmaniose tegumentar em Três Braços (BA).** Tese de Doutorado. Belo Horizonte, 212p, 1984.
- Magalhães AV, Chiarini LH & Raick AN – **Histopatologia da leishmaniose tegumentar.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 24 (5): 268-276, 1982.
- Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC & Marsden PD – **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (4): 253-262, 1986 a.
- Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC & Marsden PD – **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania***

***braziliensis braziliensis*. 2. Resposta humoral tissular.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (5): 293-299, 1986 b.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC & Marsden PD – **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Reação celular nos tecidos.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (5): 300-311, 1986 c.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC & Marsden PD – **Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Classificação histopatológica.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 28 (6): 421-430, 1986 d.

Muller I, Kropf P, Etges RJ, Louis JA- **Gamma interferon Response in Secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+T cells.** Infection and Immunity, 9:3730-3738, 1993.

Name R Q, Borges KT, Nogueira L S C, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR- **Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil.** Anais. Brasileiro de Dermatologia, 80 (3): 249-250,2005.

Nimri L, Soubani R, Gramiccia M. - ***Leishmania* species and zymodemes isolated from endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Jordan.** Kinetoplastid Biologic and Disease.1: 7, 2002.

Ouaissi Ali- **Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved.** Kinetoplastid Biology and Disease, 71 (11) 6109-15, 2003.

Pinheiro R - **Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia.** Infarma, 16 (7-8), 79-82,2004.

Porto C -**Autoctonia da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal: estudo em seres humanos e cães na cidade de São Sebastião [tese].** Brasília: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2004.

Ridley DS – **A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 74:515-521, 1980.

Ridley DS – **The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 73:150-160, 1979.

Ridley DS & Ridley MJ – **Late stage cutaneous leishmaniasis: immunopathology of tuberculoid lesions in skin and lymph nodes.** The British Journal of Experimental Pathology, 65:337-346, 1984.

- Ridley DS & Ridley MJ – **The evaluation of the lesion in cutaneous leishmaniasis.** Journal of Pathology, 141:83-96, 1983.
- Ridley DS, Magalhães AV & Marsden PD – **Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis.** Journal of Pathology, 159:293-299, 1989.
- Ridley DS, Marsden PD, Cuba CC & Barreto AC – **A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 74:508-514, 1980.
- Ridley MJ & Ridley DS – **Cutaneous Leishmaniasis: immunocomplex formation and necrosis in the acute phase.** The British Journal of Experimental Pathology, 65:327-336, 1984.
- Roberts LJ, Handman E, Foote SJ -**Leishmaniasis clinical.** British Medical Journal Review, 321: 801-804, 2000.
- Roberts CW, Walker W, Alexander J - **Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites.** Clinical Microbiology Reviews 476-488, 2001.
- Sacks D, Noben-Trauth N - **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania Major* in mice** Nature Reviews (2): 845-858, 2002.
- Shaha C– **Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis.** Indian Journal Medicine Research Reviews (123): 233-244, 2006.
- Silveira FT, Lainson R e colaboradores - **Leishmaniose tegumentar americana** Doenças Infecciosas e parasitárias: Enfoque amazônico 619-629,1997.
- Tornberg NA– **The caspase family of cysteine proteases.** British Medical Bulletin,53(3):478-490, 1997.
- Vieira MGS, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AAJr, Barral-Netto M, Barral A- **B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97(7): 979-983, 2002.
- Wyllie AH – **Apoptosis: An overview.** British Medical Bulletin, 53(3):451-465, 1997.
- Wyllie AH, Sci.Ed. – **Apoptosis.** British Medical Bulletin, 53(3), 1997.

Bishop PW- An immunohistochemical vade mecum [sítio da internet] 2006. Disponível em <http://www.e-immunohistochemistry.info> Acessado em junho,2006.

Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG- **Gender Is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp.** Infection and Immunity, 70(5): 2288-2296, 2002.

Terabe M, Kuramochi T, Ito M, Hatabu T, Sanjoba C, Chang K-P, Onodera T, Matsumoto Y- **CD-4 + cells are indispensable for ulcer developmente in murine cutaneous leishmaniasis.** Infection and Immunity, 68 (8): 4574-4577, 2000.

10. ANEXOS

ANEXO 1. ACHADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS EM 46 PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA. NÚMERO DE CÉLULAS POR MM3

Caso / Biópsia	CD1a	CD8	CD15	CD20	CD45	CD68	BCL-2	BCL-X	BAX	p53	CD4
1 - 3697	92,33	854,10	0	507,84	877,19	484,76	115,42	0	0	0	92,33
2 - 3699	46,16	138,50	0	230,84	1708,21	900,27	554,01	0	0	0	738,68
3 - 3700	323,17	1985,22	0	831,02	4916,89	1015,69	1408,12	0	0	46,16	969,52
4 - 3701	46,16	1084,94	115,42	253,92	2585,41	1223,45	646,35	0	0	1015,69	761,77
5-3704	438,59	1800,55	161,58	854,10	877,19	46,16	277,00	0	0	23,08	277,00
6-3706	346,26	761,77	69,25	138,50	1008,31	1108,03	4339,79	0	23,08	530,93	1108,03
7-3708	69,25	1061,86	300,09	0	277,00	1408,12	969,52	92,33	0	23,08	715,60
8-3709	253,92	2008,31	115,42	715,60	3762,69	1592,79	2031,39	46,16	0	554,01	946,44
9-3710	300,09	1615,88	92,336	1431,20	1939,05	1108,03	369,34	69,25	0	530,93	761,77
10-3711	161,58	1754,38	161,58	207,75	2585,41	1662,04	738,68	0	0	484,76	300,09
11-3712	138,50	207,75	0	138,50	761,77	230,84	Ausente	Ausente	184,67	300,09	484,76
12-3714	184,67	1915,97	92,336	530,93	1315,78	1569,71	854,10	0	0	46,16	507,84
13-8076	161,58	253,92	438,59	1015,69	877,19	900,27	207,75	23,08	0	230,84	900,27
14-3716	230,84	1546,62	0	530,93	2816,25	2031,39	1592,79	461,68	23,08	92,33	507,84
15-3718	253,92	2100,64	115,42	323,17	1131,11	1084,94	600,18	23,08	23,08	484,76	253,92
16-3720	0	1315,78	0	761,77	2308,40	1131,11	1754,38	92,33	0	1061,86	1477,37
17-3721	69,25	1454,29	415,51	530,93	2169,89	1177,28	1708,21	69,25	0	277,00	807,94
18-3722	69,25	115,42	300,09	369,34	1546,62	1061,86	392,42	69,25	0	115,42	877,19
19-3723	69,25	2446,90	23,08	923,36	1638,96	1638,96	1246,53	0	0	692,52	969,52
20-3724	92,33	1731,30	0	669,43	2446,90	1431,20	1131,11	0	0	1223,45	1708,21
21-3725	184,67	2562,32	0	507,84	2331,48	1985,22	253,92	69,25	0	1131,11	1892,89
22-3726	161,58	1154,20	0	346,26	1523,54	1500,46	738,68	0	0	46,16	1777,46
23-3727	0	1315,78	461,68	207,75	2723,91	2008,31	392,42	0	0	1246,53	Ausente
24-3728	138,50	92,33	0	115,42	2285,31	277,00	507,84	46,16	0	1338,87	600,18
25-3729	161,58	1800,55	530,93	877,19	2216,06	992,61	1131,11	161,58	0	46,16	1754,38
26-3730	0	877,19	207,75	0	1477,37	1315,78	807,94	0	0	715,60	1523,54
27-3731	0	2516,15	0	854,10	2146,81	1177,28	715,60	0	0	207,75	1061,86
28-3732	530,93	0	0	115,42	854,10	1154,20	46,16	0	230,84	0	Ausente

Continua na página
seguinte

**ANEXO 1. ACHADOS MUNOHISTOQUÍMICOS EM 46 PACIENTES PORTADORES DE
LEISHAMNIOSE CUTÂNEA. NÚMERO DE CÉLULAS POR MM3 (CONTINUAÇÃO)**

Caso / Biópsia	CD1a	CD8	CD15	CD20	CD45	CD68	BCL-2	BCL-X	BAX	p53	CD4
29-3733	46,16	1246,53	0	207,75	1823,63	1108,03	923,36	0	0	207,75	1523,54
30-3734	23,08	1777,46	0	346,26	4016,62	1638,96	1177,28	0	0	92,33	1431,20
31-3735	207,75	1615,88	23,08	253,92	3739,61	1800,55	807,94	0	0	1731,30	2262,23
32-3737	69,25	392,42	92,33	184,67	2123,73	600,18	831,02	0	0	69,25	1685,13
33-3739	161,58	115,42	0	300,09	600,18	438,59	Ausente	0	0	Ausente	923,36
34-3740	69,25	1477,37	831,04	738,68	3578,02	1546,62	1200,36	0	207,75	438,59	Ausente
35-3741	46,16	2054,47	230,84	1061,86	3901,20	2562,32	1892,89	207,75	992,61	946,44	2631,57
36-3744	346,26	1731,30	115,42	115,42	Ausente	1338,87	992,61	46,16	0	161,58	854,10
37-3745	346,26	1477,37	46,16	207,75	2077,56	1223,45	Ausente	92,33	184,67	669,43	Ausente
38-3746	507,84	992,61	0	161,58	2008,31	831,02	1361,95	0	0	0	1108,03
39-3747	0	1038,78	2377,65	1038,78	3416,43	2354,57	1962,14	0	0	1731,30	242,30
40-3748	392,42	1500,46	0	992,61	2493,07	923,36	207,75,	0	0	392,42	2516,15
41-3749	115,42	115,42	138,50	92,43	1385,04	577,10	392,42	0	92,33	392,42	1408,12
42-5108	161,58	1061,86	69,25	415,51	3208,67	761,77	530,09	0	161,58	0	1892,89
43-4629	184,67	877,19	69,25	715,60	1708,21	969,52	23,08	0	0	0	1361,95
44-3273	369,34	2146,80	23,08	1269,62	3554,93	1084,94	115,42	69,25	115,42	253,92	1800,55
45-3277	300,09	2423,82	23,08	177,28	4247,46	1246,53	2262,230	0	0	0	900,27
46-5200	207,75	807,94	46,16	323,17	1523,54	1200,36	161,58	0	0	0	807,94

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento visa assegurar os direitos do participante da pesquisa em consentir sua inclusão no projeto **“Imunofenotipagem em Leishmaniose”**.

O objetivo desta pesquisa é realizar o estudo das lesões da Leishmaniose Cutânea a fim de determinar fatores relacionados com a patogenia da doença.

Para isto, será realizada biópsia em todos os pacientes que apresentem lesões cutâneas cujos aspectos são sugestivos da infecção por Leishmania. Este material será submetido a estudo com marcadores imunoistoquímicos para estabelecimento de uma possível relação destes com as diferentes formas de apresentação da doença e diferentes respostas terapêuticas.

Os pesquisadores do projeto acima identificado assumem o compromisso de:

1. preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados;
2. que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
3. que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

A participação nesta pesquisa tem caráter voluntário, isenta de qualquer forma de remuneração ou custo para o paciente.

É importante a assinatura do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO pelo participante como evidência de ele estar suficientemente esclarecido de todos os possíveis riscos e benefícios bem como de todas as informações pertinentes à pesquisa.

Ressalta-se que o participante da pesquisa pode desistir dela a qualquer momento, sem prejuízo ao tratamento a que será submetido, momento a partir do qual este documento passa a ser desconsiderado.

O participante tem ainda o direito de recusar a sua inclusão neste projeto.

Esta pesquisa será conduzida no ambulatório de Dermatologia do HUB e no laboratório de Anatomia Patológica da UnB, sob orientação do Prof.Dr. Albino Verçosa de Magalhães e a pesquisadora Verônica Maria Gonçalves Furtado, com a colaboração da equipe de dermatologistas e residentes do Hospital Universitário de Brasília, tendo a duração de no máximo um ano, a partir da data de aprovação pelo Comitê de Ética Médica.

Dados do pesquisador:

Verônica Maria Gonçalves Furtado

SQN 305 Bloco C Apto 104

Brasília-DF

(061) 3037-6265 / (061) 9267-6265

Brasília, junho de 2005.

(participante da pesquisa)