

FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ESTOMATOLOGIA CLÍNICA

**Mariana Reuter Palmeiro**

**ANÁLISE *IN SITU* DA RESPOSTA IMUNE  
CELULAR DAS LESÕES DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA  
EM MUCOSA ORAL E NASAL**

Porto Alegre  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MARIANA REUTER PALMEIRO

**ANÁLISE *IN SITU* DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DAS  
LESÕES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA  
EM MUCOSA ORAL E NASAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de Doutor em Odontologia – área de concentração em Estomatologia Clínica.

Orientadoras: Dra. Fátima Conceição-Silva  
Dra. Salete Maria Pretto

Porto Alegre  
2008

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa obra a José Frederico e Terezinha Alcione, meus pais, Heloisa, minha irmã, pelo imenso amor, carinho, tolerância, por estarem sempre ao meu lado, em meus ideais e por tornarem esse momento possível. E *in memoriam*, a meus avós Luiz, Lenira, Ralph Omar e Isis.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Dr.<sup>as</sup> Fátima Conceição-Silva e Salete Maria Pretto. À Dr.<sup>a</sup> Fátima, por ter aceitado o desafio de ser minha orientadora, por todo seu conhecimento brilhante em Imunologia, Leishmaniose e Imuno-histoquímica e pela amizade, convivência diária e tolerância, por me ensinar tudo sobre o universo laboratorial e Imunologia, fundamentais para a realização desta obra. À Dr.<sup>a</sup> Salete, por todos os conhecimentos em Epidemiologia, pela amizade e pelo desafio de ter me aceitado como orientanda.

Ao Dr. Armando Oliveira Schubach, pela amizade, por ter me dado a oportunidade de estagiar no CrLeish, onde pude expandir meus horizontes em conhecimentos e contribuir com meu pequeno conhecimento a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e por ter me encorajado a fazer o Doutorado. Ao CrLeish, por todo apoio científico, clínico e diagnóstico, como também pela amizade, companheirismo nos momentos difíceis.

Ao Dr. João Moreira, por toda amizade, dedicação, por ser um grande mestre em Doenças Infecciosas e Otorrinolaringologia e por ter me preparado para a prova de seleção do Doutorado e ter acreditado sempre na minha capacidade.

Às Dr.<sup>as</sup> Cláudia Valette Rosalino e Ana Cristina Martins, pela amizade, por terem sido fundamentais no diagnóstico e na aquisição de biópsias de Leishmaniose mucosa e pelos momentos de discussão dos conhecimentos de Otorrinolaringologia e Estomatologia.

Ao Dr. Leonardo Pereira Quintella e toda equipe do Serviço de Anatomia Patológica do IPEC, pelos exames histopatológicos.

Aos vários Serviços que realizaram o diagnóstico laboratorial dos casos: meus agradecimentos.

Aos colegas do laboratório Fernanda, Priscila, Cláudia, Marcela, Thiago, Jheimson, Bruno, Dilceni, Júlia, Luciana e Patrícia por terem sido a minha família aqui no Rio de Janeiro, em 2006 e 2007, pela amizade, companheirismo, pelas constantes brincadeiras e momentos de descontração. Em especial, às amigas Priscila, pelas constantes tardes no

criostato, e a Fernanda, por todo o seu brilhante conhecimento em imunologia e imunohistoquímica, que, juntamente com a nossa orientadora, Dr.<sup>a</sup> Fátima, me ensinou que ciência não é possível sem trabalho em equipe. Sou muito grata a cada um de vocês, por tudo que me ensinaram e ter tornado esse sonho possível.

À Marli e Rosana, pela amizade e calma de organizar o fluxo de pacientes do Ambulatório de Leishmaniose.

Aos Srs. Genilton José Vieira, Rodrigo Mexas e Bruno Eschenazi, do Laboratório de Tratamento de Imagens-IOC, pelo auxílio na aquisição e formatação das fotografias e figuras.

Ao Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular, pela cessão do criostato para a realização dos cortes dos tecidos estudados.

Ao Serviço de Cirurgia Otorrinolaringologia do Hospital de Bonsucesso, composto pela equipe do Dr. Krishnamurti Matos de Araújo Sarmiento Jr. e seus residentes, pelo fornecimento de material de mucosa nasal sadia, o qual possibilitou o estudo imunohistoquímico comparativo entre as lesões de LTA e dos controles negativos.

Ao Serviço de Traumatologia e Cirurgia Buco-maxilo-facial do Hospital Clementino Fraga Filho UFRJ, composto pela equipe da Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Albuquerque Cavalcante e equipe de alunos de Pós-Graduação, pelo fornecimento de material de mucosa oral sadia, o qual possibilitou o estudo imunohistoquímico comparativo entre as lesões de LTA e dos controles negativos.

À Professora de Português Maria Conceição da Silva pela revisão ortográfica da tese.

À Rosa Velho, pela organização e formatação da tese.

Aos meus mestres da Estomatologia, Dr.<sup>a</sup> Liliane Soares Yurgel, Dr.<sup>a</sup> Maria. Antônia Zancanaro de Figueiredo, Dr.<sup>a</sup> Karen Cherubini, Dr.<sup>a</sup> Fernanda Salun, Dr.<sup>a</sup> Maria Antonieta Lopes de Souza, Dr.<sup>a</sup> Nilza Pereira Costa e Dr.<sup>a</sup> Elaine Veck, Dr. Abel Silveira Cardoso, Dr.<sup>a</sup> Elisa Janini, Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Torres, Dr.<sup>a</sup> Ellen Brilhante de Albuquerque, Dr. Wagner

Hespanhol, Dr. Valdir Meirelles Jr, Dr. Arley da Silva Jr, Dr.<sup>a</sup> Márcia Grillo Cabral, Dr. José Carlos Bertotto, Dr. Irani Zanettini, Dr. Gazzola, Dr.<sup>a</sup> Maria Éster, Dr.<sup>a</sup> Fabiana Moresco, pela amizade, por todo o conhecimento em Estomatologia, enfim, por terem feito eu me interessar tanto por essa especialidade e pelos exemplos de postura e ética profissional.

Aos demais professores do curso de Doutorado da PUC/RS, pelas brilhantes aulas e ensinamentos e convivência durante todo o curso de Pós-Graduação.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pela dedicação e competência.

Aos colegas da Pós-Graduação da Estomatologia e Cirurgia, pela convivência, amizade e constante troca de experiências profissionais.

Aos meus amigos do Sul e do Rio de Janeiro, pela amizade, pelo companheirismo, por me escutarem e apoiarem sempre nos momentos felizes e nos difíceis.

Todas as pessoas que, de alguma forma, passaram pela minha vida e transmitiram-me uma mensagem, um ensinamento que fez parte do meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional.

A todos os doentes, portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), em especial aos com a forma mucosa, que me despertaram toda a curiosidade científica com base na questão "Por que alguns doentes desenvolvem a forma mucosa e outros não?" e, desta forma, buscar a compreensão da resposta imune celular *in situ*.

Ao Dr. Paulo Ricardo Gonçalves *in memoriam*, pela grande amizade, por ter sido meu mestre inicial na Odontologia e eu poder ter feito parte da sua equipe de Anatomia Geral como monitora e estagiária, na Cirurgia Buco-Maxilo-facial do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre (HPS-PA).

A Deus, por estar sempre perto de mim, naqueles momentos em que me senti extremamente só nessa caminhada, dando-me coragem, fé e esperança para enfrentar tanto os momentos bons, quanto os difíceis, com força para superar todos os obstáculos.

Ao Mosteiro de São Bento do Rio de Janeiro, por ter sempre me acolhido e orientado nos momentos felizes e nos difíceis, em especial a Dom José Palmeiro Mendes e Dom Mauro.

À Sociedade Brasileira de Taoísmo do Rio de Janeiro, por ter me ensinado que o Tao (caminho) está em todos os seres, em todas as coisas e em todos os lugares. Cada ser consciente tem um caminho, basta encontrá-lo e seguir no fluxo, pois só assim, quando descobriremos nossa verdadeira missão nesse mundo e a realizarmos com imenso amor e dedicação, não medindo esforços para tal, poderemos superar todos os nossos limites e dificuldades, evoluir, nos tornar sábios e alcançar a liberdade.

*“Ninguém sai Doutor de uma biblioteca ou museu. Mas quem passar por ali, a sério, sai realmente Doutor naquilo que estudou”.*

**Roquette-Pinto**

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É transmitida pela picada de insetos do gênero *Lutzomyia*. Em regiões do Brasil, como no Rio de Janeiro, é causada pela *L. braziliensis*. Duas formas clínicas principais são descritas: leishmaniose cutânea e mucosa. A forma cutânea é a mais comum. Contudo, apesar da baixa frequência de lesões mucosas, a destruição tecidual e a resistência ao tratamento tornam difícil acompanhamento dos pacientes. Os tipos celulares que compõem o ambiente das lesões podem apresentar envolvimento determinante na infecção, como já descrito em outros modelos de compartimentalização da resposta imune. Estudos indicam a necessidade de detalhamento do microambiente para estabelecer o quadro imunopatológico das lesões. Assim, o estudo das lesões mucosas da LTA pode contribuir para a compreensão da dinâmica da infecção. Com o intuito de verificar a composição do infiltrado inflamatório presente nas lesões mucosas de LTA, nós examinamos biópsias de 20 pacientes de leishmaniose mucosa (12 com lesões nasais e 8 com lesões orais), assim como 20 doadores clinicamente sadios (10 biópsias de mucosa oral e 10 de mucosa nasal). Os fragmentos de mucosa foram analisados por imunohistoquímica, usando anticorpos monoclonais capazes de reconhecer: diferentes subpopulações celulares (CD3, CD4, CD8, CD22, CD68, elastase neutrofílica, CD1a) e marcadores de inflamação (CLA, Ki67, Bcl-2, NOS2, CD62E, Fas, FasL). As lesões apresentavam reação inflamatória constituída principalmente de células T e macrófagos. Também se observava uma associação entre expressão elevada de NOS2 e reduzido número de parasitas, indicando a importância da NOS2 na eliminação de parasitas. Os resultados demonstram que a reação inflamatória presente na leishmaniose mucosa é semelhante seja no sítio de lesão oral ou nasal, apesar da tendência de ser mais intensa nas lesões orais. A comparação das lesões com tecidos considerados sadios demonstrou o aumento significativo da concentração de células inflamatórias nas lesões. Células inflamatórias residuais estavam presentes nos tecidos considerados sadios. Este achado poderia ser o resultado da agressão contínua por agentes infecciosos e por microtraumatismos, já que a mucosa é considerada uma das barreiras do nosso organismo. Parasitas foram mais detectados nas lesões orais. Já que pacientes com lesão oral têm tendência ao diagnóstico precoce se comparado aos casos de lesão nasal, a maior presença de parasitas poderia ser consequência do tempo de evolução.

**Palavras-chave:** leishmaniose tegumentar americana. leishmaniose mucosa. imunidade celular. resposta *in situ*. Imunohistoquímica. *Leishmania*.

## ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a disease caused by protozoans of the genus *Leishmania*. It is transmitted through the bite of insects of the genus *Lutzomyia*. In most parts of Brazil, as the Rio de Janeiro State, the infection is caused by *L. braziliensis*. Two main clinical forms are described: cutaneous and mucosal leishmaniasis. Most of the human cases are in cutaneous lesions. However, despite the low frequency mucosal lesion, the magnitude of the tissue destruction and the resistance to the treatment result in a difficult following up of the patients. The nature of cells comprising the lesion environment may play a determinant role in this infection, as it has been described for other models of compartmentalization of the immune response. Studies have indicated the need for detailed investigation of the lesion microenvironment in order to establish the immunopathological picture of the infection. Thus, the study of ATL mucosal lesions might contribute to the understanding of the dynamics of the infection. In order to verify the composition of the inflammatory reaction present in mucosal lesions of ATL patients, we examined biopsies obtained from 20 patients suffering of mucosal leishmaniasis (12 with nose lesion and 8 with oral lesion), as well as 20 health donors (10 oral mucosa and 10 nasal mucosa). The mucosal tissues were analyzed by immunohistochemistry, using antibodies which recognize different subpopulations of cells (CD3, CD4, CD8, CD22, CD68, neutrophil elastase, CD1a) and inflammatory markers (CLA, Ki67, Bcl-2, NOS2, CD62E, Fas, FasL). The lesions presented an inflammatory reaction mainly consisting of T cells and macrophages. It was also observed an association between high NOS2 expression and reduced numbers of parasites, highlighting the importance of NOS2 in the elimination of parasites. The results demonstrated that the inflammatory reaction present in mucosal leishmaniasis is similar in nasal and oral mucosa, despite the tendency to be more intense in oral lesions. Moreover, the comparison of lesions and health tissue showed a significant increase of inflammatory cells in the first group. However, it was detected some inflammatory reaction in the named health tissues. These data could be the result of a continuous aggression by infectious agents and micro lesions, since mucosa is considered an immunological barrier to infections and trauma. In addition, parasites were more in oral tissues. Since the patients having oral leishmaniasis have the tendency to frequently be diagnosed earlier than those ones having nasal lesion, the presence of parasites could be the result of lesion evolution.

**Keywords:** American Tegumentary Leishmaniasis. Mucosal leishmaniasis. Cellular immune response *in-situ*. Immunohistochemical. *Leishmania*.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Marcadores para caracterização fenotípica e funcional .....	76
Quadro 2 - Resultados da histopatologia das lesões de LTA em mucosa nasal.....	85
Quadro 3 - Resultados da histopatologia das lesões de LTA em mucosa oral.....	85
Quadro 4 - Resultados da histopatologia das mucosas nasais clinicamente sadias.....	86
Quadro 5 - Resultados da histopatologia das mucosas orais clinicamente sadias.....	86
Quadro 6 - Lesão de LTA em mucosa nasal e oral: Contagem percentual e/ou por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados .....	93
Quadro 7 - Intensidade de NOS2 e E-selectina detectadas nas lesões de LTA mucosa nasal e oral .....	95
Quadro 8 - Mucosas clinicamente sadias nasal e oral: Contagem percentual e/ou por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados .....	107
Quadro 9 - Intensidade de NOS2 e E-selectina verificadas nas mucosas clinicamente sadias nasal e oral.....	109
Quadro 10 - Comparação entre a contagem percentual e/ou por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios de lesões de LTA em mucosa nasal e das mucosas nasais clinicamente sadias .....	115
Quadro 11 - Comparação entre a contagem percentual e/ou por mm <sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios de lesões de LTA em mucosa oral e das mucosas orais clinicamente sadias .....	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da casuística estudada em relação às características gerais do grupo de pacientes de LTA.....	80
Tabela 2 - Distribuição da casuística estudada em relação às características gerais do grupo de mucosas clinicamente sadias.....	83

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto macroscópico das lesões nasais de LTA: (a, b) lesão eritematosa, com presença de micro ulcerações, edema e crostas em nariz, (c) presença de rugosidades, ulcerações e crosta em fossa nasal esquerda, (d) lesão ulcerada, infiltrada com presença de crostas em fossa nasal esquerda, (e, f) perfuração septal anterior com presença de ulceração e crostas difusas..... 81
- Figura 2 - Aspecto macroscópico das lesões orais de LTA: (a) lesão ulcerada, com aspecto infiltrado em pele se estendendo para comissura labial direita, (b) lesão ulcerada em mucosa labial superior lado direito, (c) lesões com aspecto granulomatoso envolvendo palatos duro e mole e úvula, (d) lesão de aspecto granulomatoso envolvendo úvula, (e) lesão ulceradas em gengiva na região compreendida do 33 a 43 por vestibular, (f) lesões ulceradas em gengiva na região compreendida do 33 a 43 por lingual e em soalho bucal. .... 82
- Figura 3 - Mucosa nasal LTA: (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células T CD4<sup>+</sup>, (c) células T CD8<sup>+</sup>, (d) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (e) neutrófilos, (f) células Ki67<sup>+</sup>. Aumento original de 200x. .... 96
- Figura 4 - Mucosa nasal LTA: (a) células Ki67<sup>+</sup>, (b) células Bcl-2<sup>+</sup>, (c) neutrófilos, (d) células FasL<sup>+</sup>, (e) células CD22<sup>+</sup>, (f) Expressão de CD62E. Aumento originalde 200 x.. 97
- Figura 5 - Mucosa oral LTA: (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células CD4<sup>+</sup>, (c) células CD8<sup>+</sup>, (d) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (e) Neutrófilos, (f) células CD1a<sup>+</sup>. Aumento original de 200x. .... 98
- Figura 5 - Mucosa oral LTA: (g) células CLA<sup>+</sup>, (h) células Ki67<sup>+</sup>, (i) células Fas<sup>+</sup>, (j) células FasL<sup>+</sup>. Aumento original de 200x..... 99
- Figura 6 - Mucosa oral LTA: (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células CD22<sup>+</sup>, (c) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (d) neutrófilos, (e) células Ki67<sup>+</sup>, (f) células Fas<sup>+</sup>. Aumento original de 200x.... 100

Figura 7 - Mucosa oral LTA: (a) células T CD3 <sup>+</sup> , (b) células T CD8 <sup>+</sup> , (c) neutrófilos, (d) expressão de NOS2 <sup>+</sup> , (e) Células Bcl-2 <sup>+</sup> , (f) expressão de CD62E. Aumento original de 200x.....	101
Figura 8 - Mucosa nasal clinicamente sadia: (a) células T CD3 <sup>+</sup> , (b) células CD4 <sup>+</sup> , (c) células CD8 <sup>+</sup> , (d) macrófagos CD68 <sup>+</sup> , (e) Neutrófilos, (f) células CD22 <sup>+</sup> . Aumento original de 200x.....	110
Figura 8 - Mucosa nasal clinicamente sadia: (g) células CD1a <sup>+</sup> , (h) células CLA <sup>+</sup> , (i) células Ki67 <sup>+</sup> , (j) células Fas <sup>+</sup> . Aumento original de 200x.....	111
Figura 9- Mucosa oral clinicamente sadia: (a) células CD3 <sup>+</sup> , (b) células CD8 <sup>+</sup> , (c) macrófagos CD68 <sup>+</sup> , (d) neutrófilos, (e) células CD22 <sup>+</sup> , (f) expressão de CD62E. Aumento original de 200x.....	112
Figura 9 - Mucosa oral clinicamente sadia: (g) células CD1a <sup>+</sup> , (h) células CLA <sup>+</sup> , (j) células Bcl-2 <sup>+</sup> , (l) células Fas <sup>+</sup> , (m) expressão de NOS2 <sup>+</sup> . Aumento original de 200x.....	113
Figura 10 - Estudo comparativo entre lesão nasal e mucosa nasal clinicamente sadia: (a,b) células T CD4 <sup>+</sup> , (c,d) neutrófilos, (e,f) células CD68 <sup>+</sup> . Aumento original de 200x.....	117
Figura 11 - Estudo comparativo entre lesão oral e mucosa oral clinicamente sadia: (a, b) células T CD3 <sup>+</sup> , (c, d) células T CD8 <sup>+</sup> , (e, f) neutrófilos <sup>+</sup> . Aumento original de 200x.....	121
Figura 12 - Imuno-histoquímica para detecção de formas amastigostas em lesões de LTA na mucosa em atividade. ....	122

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição comparativa dos percentuais entre as células componentes do infiltrado inflamatório presente nas lesões orais e nasais de LTA .....	94
Gráfico 2 - Distribuição comparativa dos percentuais presente em mucosas orais e nasais clinicamente sadias .....	108
Gráfico 3 - Comparação de celularidade verificada nos tecidos nasais de pacientes portadores de LTA e indivíduos clinicamente sadios.....	116
Gráfico 4 - Comparação de celularidade verificada nos tecidos orais de pacientes portadores de LTA e indivíduos clinicamente sadios.....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC- *Aminoethyl Carbazine*

APC- *Antigen Present Cell*, “Célula apresentadora de antígeno”

BALB/C- Linhagem de camundongos susceptíveis à maioria das espécies de *Leishmania sp.* que desenvolvem infecção no modelo murino.

BHI- *Brain Heart Infusion*, “Infusão de cérebro e coração”

CD- *Cluster Differentiation* “Grupamento de diferenciação”

C57BL/6- Linhagem de camundongos 57 Black /6

CEP-IPEC- Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Con A- Concanavalina A

CTL- Linfócito T citotóxico

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DTH- Hipersensibilidade do tipo tardia

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, “Ensaio imunoenzimático”

HE- Hematoxilina-eosina

*Gld- Granulomatous lymphoproliferative disease*, “Doença linfoproliferativa granulomatosa”

ICAM-1- Molécula-1 de adesão molecular

IDRM- Intradermorreação de Montenegro

IFI- Imunofluorescência indireta

IgA- Imunoglobulina-A

IgE- Imunoglobulina-E

IgG- Imunoglobulina-G

Lb-Ag- Antígeno de *Leishmania braziliensis*

LCC- Leishmaniose cutânea crônica

LCD- Leishmaniose cutânea difusa

LCL- Leishmaniose cutânea localizada

LM- Leishmaniose mucosa

LCM- Leishmaniose mucocutânea

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

MALT- *Mucosal associated lymphoid tissues*, “Tecido linfóide associado às mucosas”

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

MN- Células mononucleares

MNGC- Células gigantes multinucleadas

MIP-1 $\beta$ - Proteína 1 beta inflamatório de macrófago

NEU- Neutrófilo

NNN- Meio de cultivo Novy, MacNeal, Nicolle

NO- Óxido nítrico

PA- Periodontite crônica ou Periodontite do adulto

*Pb- Paracoccidioides brasiliensis*

PBMC- *Peripheral blood mononuclear cells*; “Células mononucleares do sangue periférico”

PBS- *Phosphate buffered saline solution* “solução salina fosfato tamponada”

PCR- Reação em cadeia de polimerase

PCM- Paracoccidioidomicose

PEP- Periodontite agressiva ou fatores modificadores ou Periodontite de estabelecimento precoce

PMNn- Polimorfonucleares neutrófilos

RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro

RPL- Resposta proliferativa primária de linfócitos

SALT- *Skin associated lymphoid tissues* “Tecido linfóide associado à pele”

SEM- Erro padrão ou desvio mínimo

SLA- antígeno solúvel de *Leishmania* sp.

SI- Índice de estimulação

TCR- Receptor de célula T

Tc1- Célula T citotóxica tipo 1

Tc2- Célula T citotóxica tipo 2

Th- Célula T auxiliar

Th1- Células T auxiliar tipo 1

Th2- Células T auxiliar tipo 2

## LISTA DE MARCADORES

Bax- Molécula pertencente à família Bcl-2- proteína Pró-apoptótica

Bcl-2-Inibidor de apoptose

Bcl-XL- Molécula pertencente à família Bcl-2- proteína anti-apoptótica

CD1a- Célula de Langerhans

CD3- Linfócitos T totais

CD4- Subpopulação de linfócitos T auxiliares

CD8- Subpopulação de linfócitos T citotóxicos

CD15- Adesão de leucócitos e células endoteliais; ligante para CD62E e P (selectinas)

CD20- Linfócitos B

CD22- Linfócitos B

CD28- Receptor de linfócitos T para moléculas co-estimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2)

CD40- Receptor para CD154 (ligante CD40); papel na ativação de linfócitos B dependentes de linfócitos T, de macrófagos, de células dendríticas e células endoteliais.

CD45Ro- Linfócitos T de memória

CD56- Célula *Natural Killer* (célula matadora natural)

CD62E- Selectina -E

CD62L- Selectina-L

CD68- Macrófagos

CD69- Leucócitos ativados

CD95- Fas

CD95L- FasL

CLA- Antígeno associado ao linfócito cutâneo

DC- Célula dendrítica

Ki67- Marcador de proliferação nuclear

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

NOS2- Óxido nítrico sintase tipo 2

S100- Marcador para célula dendrítica

## LISTA DE CITOCINAS

GM-CSF- Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

IL-1 $\beta$ - Interleucina-1beta

IL-2- Interleucina-2

IL-4- Interleucina-4

IL-5- Interleucina-5

IL-10- Interleucina-10

IL-12- Interleucina-12

IL-15- Interleucina-15

IFN- $\gamma$ - Interferon-gama

TGF- $\beta$ - Fator de crescimento tumoral-beta

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral-alfa

TNF- $\beta$ - Fator de necrose tumoral-beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>26</b>
2.1 TÉCNICAS DE ESTUDO <i>IN SITU</i> : A IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	26
<b>2.1.1 Marcadores de caracterização fenotípica.....</b>	<b>27</b>
2.1.1.1 Linfócitos T e B.....	27
2.1.1.1.1 Linfócitos T (CD3) .....	28
2.1.1.1.2 Subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) .....	29
2.1.1.1.3 Linfócitos B (CD22).....	30
2.1.1.2 Macrófagos (CD68).....	30
2.1.1.3 Polimorfonuclear Neutrófilo (Elastase Neutrofílica) .....	31
2.1.1.4 Célula de Langerhans (CD1a) .....	32
<b>2.1.2 Marcadores de caracterização funcional.....</b>	<b>32</b>
2.1.2.1 Ki67 .....	32
2.1.2.2 CLA .....	34
2.1.2.3 CD62E .....	34
2.1.2.4 NOS2 .....	35
<b>2.1.3 Marcadores de Regulação de Morte Celular-Apoptose.....</b>	<b>35</b>
2.1.3.1 Fas (CD95) –FasL (CD95L).....	36
2.1.3.2 Bcl-2 .....	37
2.2 A LEISHMANIOSE E SEU AGENTE.....	38
<b>2.2.1 A LTA causada por <i>L. braziliensis</i> .....</b>	<b>40</b>
2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO .....	41
2.4 A ORGANIZAÇÃO DO TECIDO DA MUCOSA ORAL E NASAL.....	42
2.5 SALIVA E SEUS COMPONENTES.....	47
2.6 A ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ASSOCIADO À MUCOSA.....	49
2.7 A RESPOSTA IMUNE NA LTA.....	51
2.8 RESPOSTA IMUNE CELULAR <i>IN SITU</i> .....	58
<b>2.8.1 Estudos na pele .....</b>	<b>58</b>
<b>2.8.2 Estudos na mucosa .....</b>	<b>63</b>
2.9 ESTUDOS NO SANGUE PERIFÉRICO E <i>IN SITU</i> DA MUCOSA EM OUTRAS DOENÇAS INFECCIOSAS E INFLAMATÓRIAS .....	65
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>71</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>72</b>

4.1 OBJETIVO GERAL:.....	72
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	72
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
5.1 MATERIAL .....	73
5.2 MÉTODO .....	74
<b>5.2.1 Preparação dos Fragmentos Teciduais.....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.2 Histopatologia .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.3 Imuno-Histoquímica.....</b>	<b>75</b>
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>78</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS .....	78
<b>6.1.1 Lesões ativas de LTA mucosa nasal e oral .....</b>	<b>78</b>
<b>6.1.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias.....</b>	<b>83</b>
6.2 HISTOPATOLOGIA .....	84
<b>6.2.1 Lesões de LTA mucosa nasal e oral .....</b>	<b>84</b>
<b>6.2.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias.....</b>	<b>86</b>
6.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA – LESÕES ATIVAS DE LTA E TECIDO CLINICAMENTE SADIO EM MUCOSA NASAL E ORAL .....	87
<b>6.3.1 Lesões de LTA em mucosa nasal e oral .....</b>	<b>87</b>
6.3.1.1 Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Quadro 4 e Gráfico 1).....	87
6.3.1.2 Perfil quantitativo e qualitativo de células de Langerhans (Quadro 4 e Figura 5f).....	90
6.3.1.3 Marcadores de inflamação (Quadros 4 e 5, Figuras 3,4,5,6,7 e Gráfico 1).....	90
<b>6.3.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias.....</b>	<b>102</b>
6.3.2.1 Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Quadro 6 e Gráfico 2).....	102
6.3.2.2 Perfil quantitativo e qualitativo de células de Langerhans (Quadro 6) .....	104
6.3.2.3 Marcadores de inflamação (Quadros 6 e 7).....	104
<b>6.3.3 Comparação entre lesão e o tecido clinicamente sadio em mucosa nasal.....</b>	<b>114</b>
<b>6.3.4 Comparação entre lesão e o tecido clinicamente sadio em mucosa oral.....</b>	<b>118</b>
<b>6.3.5 Detecção de parasitas .....</b>	<b>122</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>133</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS.....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO B - OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA PUCRS .....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO D - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ .....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>150</b>
<b>ANEXO F - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE .....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE SADIO.....</b>	<b>156</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É transmitida pela picada de insetos da família *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, representado por várias espécies no Brasil. A infecção é prevalente em nosso país, e apresenta uma variedade de formas clínicas e tipos de evolução, que parecem ser resultantes da associação entre a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imune do indivíduo infectado.

Os pacientes infectados pela espécie *L. braziliensis* desenvolvem a forma cutânea, com lesões ulceradas na pele. Cerca de 3 a 5 % dos indivíduos infectados podem evoluir para uma forma secundária metastática, com lesões em mucosas nasal, oral, faríngea e laríngea. As lesões mucosas têm sido descritas como apresentando uma resposta imune específica exacerbada, detectada tanto pela Intradermorreação de Montenegro (IDRM), quanto por respostas *in vitro* de proliferação celular específica. Clinicamente, caracterizam-se por destruição tecidual intensa, associada à dificuldade de identificação de parasitas. No entanto, aspectos relacionados ao surgimento das lesões mucosas e aos mecanismos de resistência ao tratamento específico permanecem não esclarecidos. Parte disto ocorreu porque, devido à falta de um modelo experimental reproduzindo a doença humana, especialmente no tocante ao envolvimento mucoso, estudos mais profundos dos mecanismos imunopatológicos, envolvidos na leishmaniose mucosa, foram sempre um obstáculo. Além disso, com o menor número de casos humanos, o estudo sistemático, tanto sagital como longitudinal, fica prejudicado nessa forma de apresentação de LTA. Assim, a análise *in situ* das populações celulares resposta linfoproliferativa de células T no sangue periférico, e produção de linfocinas foram bem documentadas na leishmaniose cutânea. Entretanto poucos são os estudos *in situ*, envolvendo a leishmaniose mucosa. A maioria dos estudos baseados nos mecanismos patogênicos da leishmaniose mucosa em humanos foi realizado por culturas *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico, estimuladas com antígeno de *Leishmania* sp. Estes estudos foram principalmente focados em análises fenotípicas e na quantificação de citocinas. Alguns trabalhos usaram ainda a reação em cadeia de polimerase (PCR), para estudar o RNA desse material.

O conhecimento sobre a diversidade da localização e apresentação clínica nas lesões mucosas de LTA, a potencial gravidade dessa forma, além da escassez de dados referentes ao quadro apontam para a necessidade de maiores estudos, visando o esclarecimento da dinâmica da lesão de mucosa na LTA. Estes dados poderiam levar à organização de um painel das características imunopatológicas, proporcionando no futuro, novas abordagens para a modulação da resposta imune do paciente, em direção à cura das lesões e à prevenção de complicações precoces ou tardias.

A técnica de imuno-histoquímica é um método auxiliar no diagnóstico. Nos últimos anos, tornou-se uma ferramenta importante no entendimento da imunopatologia de uma grande variedade de doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, uma vez que permite a identificação *in situ* do agente infeccioso, do tipo de células, sua função e citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Pode, assim, demonstrar possíveis relações com o quadro clínico, buscando uma avaliação precisa da resposta imune ao hospedeiro.

O presente estudo utiliza a técnica de imuno-histoquímica para a identificação do parasita, caracterização fenotípica e funcional das células do infiltrado inflamatório, comparando a composição e distribuição do processo inflamatório *in situ* das lesões de Leishmaniose Tegumentar Americana em mucosa oral e nasal da, visando à identificação de semelhanças e diferenças entre os dois sítios de lesão mucosa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Em 1953, o patologista Robert Rich descrevia a presença de linfócitos em uma área inflamatória como: “... linfócitos podem ser vistos um ou dois dias após o início do processo inflamatório... mas não se tem a menor idéia do que eles estão fazendo lá... agregados na periferia da lesão, parecem expectadores passivos da intensa atividade dos macrófagos” (BAXTER, 2000). De lá para cá muita coisa mudou e hoje os linfócitos são considerados células centrais da resposta imune. Esta mudança se deveu basicamente ao desenvolvimento de técnicas que permitiram o estudo mais detalhado da resposta imune durante o processo inflamatório. Uma destas técnicas é a imunohistoquímica que tem sido usada com frequência em estudos de caracterização das reações teciduais às infecções e outras agressões.

### 2.1 TÉCNICAS DE ESTUDO *IN SITU*: A IMUNO-HISTOQUIMICA

Para estudar as células do processo inflamatório, pode-se lançar mão de vários métodos auxiliares de diagnóstico. A maioria deles utiliza, como forma de detecção, a marcação por anticorpos monoclonais ou policlonais, que evidenciam a presença de tipos celulares, moleculares de superfície e/ou secretórios (além de aspectos estruturais do tecido). Alguns destes marcadores estão diretamente relacionados com resposta imune celular *in situ*.

As técnicas de imuno-histoquímica estão disponíveis desde o início dos anos 70, mas somente a partir dos anos 80 passaram a ser amplamente utilizadas como um meio de diagnóstico em patologia (THOUSSAINT; KAMIRO, 1997). É uma técnica imunológica muito utilizada, nas ciências biológicas, para a detecção de proteínas, sendo indicada para localização destas em cortes teciduais, através da ligação dos antígenos aos seus respectivos anticorpos. A visualização do anticorpo marcado é obtida através da coloração produzida pelo sistema de revelação que produz cor. Esses métodos permitem identificar células ou componentes teciduais através da interação antígeno-anticorpo-complexo enzima-substrato. Um anticorpo ideal é altamente específico, possui elevado título, alta afinidade e avidéz. Tanto os anticorpos policlonais quanto os monoclonais podem ser usados na imuno-histoquímica. Sua escolha depende da performance de cada anticorpo durante o procedimento de marcação tecidual. Contudo, os anticorpos utilizados são, em geral, do

tipo monoclonal, ou seja, produzidos por um único clone de células, fato que determina maior especificidade na reação (MALISIUS *et al.*, 1997). Essa técnica é amplamente usada no diagnóstico de diversas doenças, como por exemplo, o câncer. Atualmente numerosos marcadores específicos para vários tipos de câncer estão disponíveis. Em adição, a técnica é também amplamente empregada na pesquisa básica, para o entendimento, distribuição e localização dos biomarcadores em diferentes partes do tecido.

A partir do primeiro *workshop* e da primeira conferência sobre antígenos de diferenciação leucocitários humanos (HDLA), realizada em Paris em 1982 (BERNARD; BOUMSELL, 1984) procedeu-se à classificação e definição de uma nomenclatura uniforme aos vários marcadores existentes. Procurou-se criar um sistema integrado de classificação, para codificar diferentes antígenos leucocitários. Foi utilizado como critério o agrupamento de diferenciação (*cluster of differentiation* - CD), sendo atribuído um número específico a marcadores celulares. Cada CD refere-se a uma determinada molécula de superfície celular caracterizada por um conjunto de anticorpos monoclonais padronizados pelos comitês internacionais (para detalhes acessar <http://www.hcdm.org/home/tabid/36/default.aspx>). Posteriormente, outras reuniões aconteceram (a última em 2006), visando sempre a uniformização de nomenclatura, já que o tipo e o número de marcadores têm aumentado de forma constante. Todas as decisões são aprovadas no “Human Cell Differentiation Molecules Council” cuja próxima reunião ocorrerá em 2009 na cidade de Barcelona. Isto também começou a ocorrer para marcadores funcionais, mas alguns anticorpos ainda são conhecidos pela nomenclatura original (BERNARD; BOUMSELL, 1984; FIEBIG *et al.*, 1984).

## **2.1.1 Marcadores de caracterização fenotípica**

### **2.1.1.1 Linfócitos T e B**

Os linfócitos têm diversas funções no organismo, todas elas de extrema importância para o sistema imunitário (ROITT *et al.*, 1992). Dividem-se em linfócitos T, B e NK, sendo o

linfócito T responsável, principalmente, pelo auxílio ao sistema imunitário e resposta imune celular, e o linfócito B responsável pela resposta imuno-humoral. Os linfócitos T e B produzem respostas imunes específicas, pois ambos são estimulados a partir de epítopos de antígenos específicos. Neste caso, formam populações monoclonais específicas para responder ao antígeno em questão (GOLDSBY *et al.*, 2004).

O grande número de monoclonais gerados contra moléculas presentes nos linfócitos T permite identificar, atualmente, subpopulações de células efetoras, assim como diferentes estágios de ativação de maturação. O melhor marcador para linfócitos T totais é o CD3, uma vez que se refere a um complexo molecular associado aos receptores específicos (TCRs). Além de exclusivo de linfócitos T, encontra-se presente em todas as subpopulações de células T maduras. A caracterização de linfócitos CD3<sup>+</sup> geralmente inclui a quantificação das subpopulações CD4<sup>+</sup>, comumente referida como auxiliar (Th = T helper) e CD8<sup>+</sup>, que apresenta, entre outras, propriedades citotóxicas (Tc).

#### 2.1.1.1.1 Linfócitos T (CD3)

O antígeno CD3 foi primeiramente detectado nos timócitos corticais, onde o antígeno é predominantemente presente como um constituinte intracitoplasmático. No estágio medular do timócito, ele aparece, subsequente, na superfície da célula. Acredita-se que o complexo homodímero CD3<sup>+</sup> transduz sinais de ativação provenientes do interior da célula sobre o antígeno e conhecido por TCR.

As duas maiores subpopulações de células CD3<sup>+</sup> apresentam os marcadores de superfície CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, os quais se agrupam com o CD3<sup>+</sup> no TCR, e servem como co-receptores para antígenos peptídicos, apresentados por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células apresentadoras de antígenos.

#### 2.1.1.1.2 Subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8)

O antígeno CD4<sup>+</sup> é uma glicoproteína de 59 Kda, presente na maioria das células T humanas do subtipo auxiliar. O antígeno CD4 serve como um receptor para as moléculas de MHC de classe II. É expresso como um monômero na superfície das células T periféricas e timócitos, presente também nos fagócitos mononucleares e em algumas células dendríticas. Tem quatro domínios extracelulares semelhantes à Ig, uma região transmembrana hidrofóbica, e uma cauda citoplasmática altamente básica, com 38 aminoácidos de comprimento. A proteína CD4, por meio dos seus dois domínios N-terminais semelhantes à Ig, liga-se ao domínio  $\beta 2$ , não polimórfico, da molécula do MHC de classe II (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

As células que expressam a molécula CD4 na superfície interagem através do complexo CD3-TCR-CD4 com macrófago, reconhecendo o antígeno que lhes é apresentado. Este reconhecimento é o sinal que inicia uma seqüência de eventos funcionais, incluindo a estimulação de outras células, a partir da seleção de mediadores químicos denominados citocinas. As citocinas vão agir sobre diferentes células, como linfócitos (T e B), macrófagos e outras APCs (células apresentadoras de antígenos), queratinócitos células endoteliais e células dendríticas, promovendo a sua ativação, função e proliferação, quando for o caso. Desta forma, as células com fenótipo CD4 são consideradas fundamentais para a resposta imune específica (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A proteína CD8 é uma molécula de 32 Kda, presente em linfócitos humanos denominados supressores e/ou citotóxicos. A maioria das moléculas CD8 existe sob a forma de heterodímeros ligados por dissulfetos, compostos de duas cadeias relacionadas, chamadas CD8 $\alpha$  e CD8 $\beta$ . Tanto a cadeia  $\alpha$  como  $\beta$  têm um único domínio extracelular Ig, uma região transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplasmática altamente básica, com cerca de 25 aminoácidos não polimórficos  $\alpha 3$  das moléculas do MHC classe I. Algumas células T expressam homodímeros CD8  $\alpha\alpha$ , funcionando, no entanto, do mesmo modo que os heterodímeros CD8 $\alpha\beta$  mais comuns. A molécula CD8 serve como um receptor de MHC classe I (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A função principal de CD4 e CD8 é a transdução de sinais no momento do reconhecimento dos antígenos. Podem também fortalecer a ligação das células T às APCs. Como o CD4 e CD8 operam em conjunto com o TCR no reconhecimento de moléculas do MHC e na ativação de células T, são chamados co-receptores (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

As células T CD4<sup>+</sup> auxiliares e CD8<sup>+</sup> citotóxicas têm também as funções de, respectivamente, ativar os fagócitos e linfócitos, principalmente através da ação das citocinas secretoras e lisar as células-alvo portadoras de antígenos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

#### 2.1.1.1.3 Linfócitos B (CD22)

O CD22 é uma glicoproteína de peso molecular de 135 Kda. É um receptor de antígeno para a célula B, expresso nos estágios celulares pró-B e pré-B do citoplasma, e na superfície da célula B madura com a superfície Ig. Ele é expresso tanto no citoplasma, como na membrana das células B, durante os estágios avançados de diferenciação. Sua função é a ativação das células B e age como uma molécula de adesão para linfócitos, neutrófilos, monócitos e eritrócitos. Sua expressão ocorre tanto nos linfócitos B normais, como nos neoplásicos, nas amostras de sangue periférico humano e de medula óssea (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

#### 2.1.1.2 Macrófagos (CD68)

O antígeno CD68 é uma proteína glicosilada transmembranária de peso molecular de 110 Kda, presente no citoplasma dos macrófagos, e é considerado um dos melhores marcadores teciduais de macrófagos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Os macrófagos integram o sistema fagocitário mononuclear, anteriormente conhecido como sistema retículo-endotelial. Originam-se na medula óssea e apresentam vida média de 24 horas, na corrente sanguínea (como monócitos), enquanto que, na forma tecidual, podem permanecer viáveis por vários meses (COTRAN *et al.*, 1996). Suas funções principais são

processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos, produção de citocinas e citotoxicidade. Quando migram do sangue periférico e fixam-se nos tecidos, estas células diferenciam-se em macrófagos ou células fagocitárias especializadas, como as células de Kupffer, no fígado, e as células de Langerhans, na pele (PEAKMAN e VERGANI, 1997). Quando ativados, os macrófagos tornam-se células grandes, com níveis elevados de enzimas lisossomais e capacidade de ingerir e fagocitar antígenos, além de secretar uma variedade de citocinas nas respostas inflamatórias e imunológicas (CONTRAN *et al.*, 1996).

Os macrófagos desempenham papel importante nas respostas imunes inata e adaptativa, sendo ativados por produtos microbianos, como as endotoxinas, e por citocinas das células T, como o IFN- $\gamma$ . Uma vez ativados, eles fagocitam e eliminam os microorganismos, produzem citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos às células T auxiliares (BRANDONISIO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2003).

#### 2.1.1.3 Polimorfonuclear Neutrófilo (Elastase Neutrofílica)

A neutrófilo elastase (NE) é uma serina protease neutra de aproximadamente 30 Kda, consistindo de 3 isoenzimas. A NE é sintetizada no promielócito e nos promonócitos e é predominantemente localizada nos grânulos primários de neutrófilo (azurófilos). Nos grânulos liberados do neutrófilo, a NE age como um proteolítico potente, capaz de degradar uma grande quantidade de proteínas, incluindo proteínas da matriz extracelular, fatores de coagulação, imunoglobulinas e complemento. O neutrófilo é um importante mediador na morte dos microorganismos e na injúria inicial do tecido inflamado. Ele também atua na destruição tecidual do enfisema pulmonar, glomeronefrite, artrite reumatóide e síndrome de angústia respiratória do adulto. As propriedades destrutivas teciduais da NE são neutralizadas por uma variedade de inibidores endógenos, incluindo  $\alpha$ -1 antitripsina, inibidor neutrófilo elastase humano (HEI) e elafina (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

#### 2.1.1.4 Célula de Langerhans (CD1a)

O antígeno CD1a é uma glicoproteína de peso molecular 49 Kda. O CD1a é um antígeno encontrado nos timócitos, certos timonas, nas células de Langerhans e células dendríticas dérmicas. Estas duas últimas células são componentes importantes do sistema imune da pele e da mucosa, que, juntamente com outras células, desempenham um papel importante nesse sistema, em condições normais e patológicas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

As células de Langerhans foram descritas, pela primeira vez, por Paul Langerhans, em 1868, como células dendríticas apresentadoras de antígeno. Elas se originam da medula óssea, sendo derivadas da linhagem dos monócitos. Essas células migram para a derme e para o epitélio e se localizam preferencialmente na camada suprabasal desses tecidos, onde sua função principal é aprisionar e transportar os antígenos protéicos aos linfonodos de drenagem (STINGEL *et al.*, 1980).

São células especializadas com funções imunológicas semelhantes àquelas dos macrófagos e de outras células apresentadoras de antígenos. Expressam, em sua superfície, MHC classe I e II, podendo interagir com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (LOMBARDI *et al.*, 1993).

### 2.1.2 Marcadores de caracterização funcional

#### 2.1.2.1 Ki67

Em situações fisiológicas, salvo raras exceções, as células humanas estão em constante proliferação para substituir perdas causadas por injúrias, apoptose ou alterações intrínsecas ao ciclo de vida de cada célula. São necessárias milhões de novas células, cada segundo, para a manutenção da vida do ser humano adulto. Pode-se avaliar a importância da proliferação

celular, quando todos os ciclos celulares de um indivíduo são interrompidos, como nos casos de altas doses de radiação ionizante. Na ausência dos processos que garantem a renovação celular, a sobrevivência do indivíduo pode ser calculada em poucos dias (ALBERTS *et al.*, 1994).

O ciclo celular - intervalo entre a mitose da célula-mãe e de uma ou ambas as células filhas - pode ser dividido em fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. As três primeiras fases compõem o período interfásico e a última, o período mitótico. A fase G<sub>1</sub> (*Gap1*), ou fase pré-síntese de DNA, e fase G<sub>2</sub> (*Gap2*), ou fase pós-replicação proporcionam segurança para células, pois permitem que a replicação seja verificada antes que haja a divisão celular na fase M, ou mitose propriamente dita. As fases G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> são importantes, não só devido aos processos reguladores a elas relacionados, mas também porque, se a interfase durasse somente o suficiente para a replicação do DNA, não haveria tempo para a duplicação da massa celular, antes da divisão (ALBERTS *et al.*, 1994).

As células que se encontram fora do ciclo proliferativo, ou em estado de quiescência, paralisadas em algum ponto da fase G<sub>1</sub> podem retornar ao ciclo a qualquer momento, desde que recebam os estímulos apropriados (ALBERTS *et al.*, 1994; CATANZARIO-GUIMARÃES, 1982). Fatores de crescimento produzidos por proto-oncogenes são considerados estímulos capazes de fazer estas células retornarem ao ciclo celular (ROLAND *et al.*, 1994).

A proteína Ki67 foi sintetizada, primeiramente, na 67<sup>a</sup> placa de cultura tecidual, num experimento realizado na cidade de Kiel (Ki), na Alemanha, passando a ser conhecida por esta denominação (GERDES *et al.*, 1983). Esse marcador reconhece um antígeno nuclear da linhagem celular L428 na doença de Hodgkin, estando também presente em todas as células em proliferação.

O Ki67 tem peso molecular entre 345-395 Kda, sendo uma proteína não-histona, localizada no braço curto do cromossomo 10, organizado em 15 éxons e 14 íntrons (DUCHROW *et al.*, 1996). Essa proteína passa por processos de fosforilação e desfosforilação durante a mitose e tem similaridade estrutural com outras proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Devido a esta particularidade, tornou-se um excelente marcador de proliferação.

A meia-vida do Ki-67 está estimada em 60 a 90 minutos (BRUNO e DARZYNKIEWIKZ, 1992). É expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto a G<sub>0</sub> (fase de repouso) e início da G<sub>1</sub>, caracterizando, portanto, células em proliferação. A quantidade de moléculas varia em todo o ciclo celular e atinge o máximo durante as fases G<sub>2</sub> e M. Essa proteína é estudada em muitas condições neoplásicas e não neoplásicas, constituindo um bom marcador quanto ao valor prognóstico, e resposta ao tratamento de neoplasias.

#### 2.1.2.2 CLA

O antígeno associado ao linfócito cutâneo (CLA) é uma molécula presente nos linfócitos da pele e em endotélios. Essa molécula é expressa em mais de 90% das células T presentes no infiltrado inflamatório cutâneo, entretanto, menos de 20% dessas células também podem ser localizados em sítios não cutâneos. Possui uma estrutura carboidratada similar aos antígenos sialyl lewis x (SLEX) e sialyl lewis a (SLEC). Além disso, serve como o ligante para selectina, incluindo CD62E (ELAM-1) e CD62L (LECAM-1). No sangue periférico, é expresso em um pequeno subtipo de linfócitos e em todos os monócitos e granulócitos. Sugere-se que o CLA tem um papel em apoiar a migração dos linfócitos para os tecidos extravasculares durante a inflamação (SANTAMARIA-BABI, 2004, TERAKEI *et al.*, 2004).

#### 2.1.2.3 CD62E

A Selectina-E (CD62E) é uma glicoproteína de aproximadamente 110 Kda, que é expressa através da ativação do endotélio dos vasos sanguíneos e apresenta funções, como a adesão molecular para leucócitos, na inflamação. Essa ativação ocorre por citocinas, como o TNF- $\alpha$  e interleucina -1 (IL-1). Foi inicialmente caracterizada como o maior sítio de ligação para a adesão de neutrófilos. Sabe-se hoje que subpopulações de selectina-E ligam-se também a linfócitos T de memória, bem como monócitos, eosinófilos e basófilos (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1996; ABBAS e LICHTMAN, 2005; ZAPH e SCOTT, 2003).

#### 2.1.2.4 NOS2

A enzima óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS2) foi originalmente descrita como uma enzima expressa pela ativação dos macrófagos, gerando óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina, contribuindo para o controle de replicação ou eliminação dos patógenos microbianos intracelulares (BOGDAN *et al.*, 2001).

O NOS existe em três isoformas diferentes, duas constitutivas da arquitetura dos tecidos, produzindo (NOS1 e NOS3) e uma forma induzida, NOS2. A forma constitutiva cNOS mantém a fisiologia normal, e a forma induzida NOS2 é envolvida, principalmente, no processo inflamatório e é identificada em tipos celulares, como macrófagos e neutrófilos.

Óxido nítrico (NO) é um radical que possui vida curta e que transmite sinais celulares envolvidos no vasorelaxamento, neurotransmissão e citotoxicidade, nos macrófagos e em outros tipos celulares. O (NO) é uma molécula vital no processo inflamatório em resposta imune, dependendo da forma e da sua quantidade produzida. É um radical livre de um elétron emparelhado que se descarrega molecularmente. Essa alta reatividade molecular, ainda que muito simples, é formada nos mamíferos pela oxidação do aminoácido L-arginina. NO é tanto prejudicial quanto benéfico para a patofisiologia geral dos tecidos. Até o final de 1980, o NO era considerado responsável pelo relaxamento vascular da musculatura lisa, contudo não era esperado que uma simples molécula pudesse ser tão significativa na fisiologia dos mamíferos. Atualmente, o NO é reconhecido como essencial para um vasto espectro de eventos intracelulares e extracelulares, em uma ampla variedade de tecidos, como, por exemplos, funções hemostáticas, incluindo vasodilatação, neurotransmissores, inibição da adesão e agregação plaquetária e defesa hospedeira contra agentes infecciosos (bactérias, parasitas e fungos) e morte de células tumorais.

#### 2.1.3 Marcadores de Regulação de Morte Celular-Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada da célula, é um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento normal e manutenção da homeostase celular. Esse processo

inclui condensação e segmentação do núcleo, condensação e fragmentação do citoplasma e quase sempre extensiva fragmentação do DNA cromossomal, nas unidades de nucleossoma (NAGATA e GOLSTEIN, 1995). A apoptose também está envolvida em diferentes condições patológicas, incluindo injúrias neurológicas, doenças neuro-vegetativas cardiovasculares, imunológicas, Aids e câncer (NAGATA e GOLSTEIN, 1995; ANTONSSON e MARTINOU, 2000).

Várias vias estão envolvidas na indução da apoptose, dependendo do estímulo inicial. As proteínas da família Bcl-2, juntamente com a mitocôndria, citocromo C e caspases constituem componentes essenciais nas vias de sinalização intracelular (ANTONSSON e MARTINOU, 2000), comprometidos com a sobrevivência ou morte das células. Uma das vias mais importantes é a que ocorre pela ligação Fas-FasL.

#### 2.1.3.1 Fas (CD95) –FasL (CD95L)

A via mais conhecida de apoptose, ou morte celular programada provém da ligação entre as moléculas Fas e FasL. A interação dessas moléculas tem papel importante na regulação nos linfócitos T e na modulação da resposta imune. Esse sistema tem um papel essencial na eliminação de linfócitos auto-reativos e na deleção de células T citotóxicas. O sistema Fas-FasL está envolvido na patogênese de uma grande quantidade de doenças, como câncer, doenças virais, desordens-imunes e neuro degenerativas. Sträter *et al.* (1999), em seu estudo em tecidos linfóides humanos normais, encontraram uma maior expressão de FasL em tecido linfóide associado à mucosa quando comparado com outros tecidos linfóides. Ambos, Fas e FasL, existem tanto na superfície da membrana, quanto na forma solúvel.

O Fas ou CD95 é uma proteína de membrana do tipo I de peso molecular de 45 Kda, que pertence à família dos receptores de necrose tumoral (TNFR) e crescimento nervoso (NGFR). O Fas é expresso na superfície das células T e em muitos outros tipos celulares, em quase todos os tecidos e órgãos do organismo humano (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O seu ligante FasL ou CD95L é uma proteína de membrana do tipo II de peso molecular 40 Kda, sendo também membro da família TNF. A ligação que ocorre entre as duas

moléculas, Fas e FasL, desencadeia a apoptose, gerando um sinal de transdução, que leva à cascata apoptótica (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

#### 2.1.3.2 Bcl-2

A proteína oncogênica Bcl-2 foi primeiramente identificada como um prótooncogene nos linfomas de células B (*B-cell lymphoma/leukemia 2 gene*), onde observaram a translocação entre os cromossomos 14 e 18. Essa translocação causa uma superexpressão de suas proteínas, podendo resultar na alteração da morte celular programada e, conseqüentemente, a permanência dessas células (ANTONSSON e MARTINOU, 2000; TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2000).

O Bcl-2 é uma proteína de membrana de massa molecular 26Kda, expressa no citoplasma das células. A proteína está associada com a mitocôndria, retículo endoplasmático liso, e a membrana perinuclear, e apresenta um papel central na inibição da apoptose (morte celular programada). Ela parece bloquear a via final da apoptose, possivelmente prevenindo dano ao DNA, agindo como um sinal para a inibição da morte celular programada. A família Bcl-2 exerce um papel importante na regulação da apoptose, na proliferação celular e na modulação de proteínas do ciclo celular. Essa família é dividida em 2 grupos: proteínas anti-apoptóticas, como o Bcl-2 e Bcl-XL e proteínas pró-apotóticas, como o Bax e Balk. É encontrada em linfócitos normais B e T, mas sua expressão encontra-se diminuída nos centros germinativos, quando eles são estimulados a proliferar (ANTOSSON e MARTINOU, 2000; TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2000).

Outros marcadores celulares ou funcionais podem ser empregados no estudo de processos inflamatórios. No entanto, os listados acima formam base para verificação de dinâmica de inflamação de um determinado tecido. Muitas infecções podem ser estudadas através da presença e caracterização do processo inflamatório das lesões. Entre elas está a leishmaniose tegumentar americana.

## 2.2 A LEISHMANIOSE E SEU AGENTE

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre através da picada do inseto vetor, pertencente ao gênero *Lutzomyia*, na qual as espécies envolvidas dependem da localização geográfica (REY, 1991; GENARO, 2002).

Durante a hematofagia, as formas promastigotas presentes nas glândulas salivares dos flebótomos são inoculadas na junção derme-epiderme do hospedeiro vertebrado. Nesse local ocorre a fagocitose dos parasitas, que irão se transformar em amastigotas no interior do vacúolo fagocítico dos macrófagos. A localização do parasita no interior de macrófagos, associada à resposta imune, estimulada pela presença do antígeno parasitário, produz uma reação inflamatória com predominância celular (processo inflamatório crônico do tipo granulomatoso). Com a continuidade da infecção, podem surgir lesões teciduais acometendo o tegumento cutâneo e ou mucoso (Leishmaniose Tegumentar), ou órgãos viscerais (Leishmaniose Visceral). Apesar de estar em expansão, a forma visceral permanece restrita a determinadas áreas do território brasileiro. Já a forma tegumentar pode ser encontrada em todo o país, tanto em área rural quanto urbana (GENARO, 2002; BRASIL, 2007).

A LTA é classificada em três formas clínicas básicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A forma cutânea localizada tem como principal manifestação uma lesão ulcerada que se desenvolve no local de inoculação do parasita. O indivíduo desenvolve úlcera de bordos elevados, fundo plano e de superfície granulomatosa, geralmente única e auto-limitada. A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é positiva, e é possível evidenciar resposta imune celular específica *in vitro* (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1990).

A leishmaniose mucosa geralmente apresenta destruição tecidual progressiva associada a intensa resposta inflamatória (AMATO *et al.*, 2003). Esta lesão geralmente surge semanas ou anos após o desaparecimento da lesão cutânea inicial, por provável disseminação hematogênica, a partir do foco primário. Trabalhos experimentais em *hamsters* parecem corroborar esta hipótese (KANAN e RYAN, 1975). Mais raramente, a lesão mucosa pode aparecer na vigência de úlcera cutânea em atividade sendo, então denominada leishmaniose

mucocutânea (LMC). Na LMC, a principal característica é o comprometimento da mucosa nasal e oral, que pode se estender por todo o trato respiratório superior. Em 42% dos pacientes de LM, ocorre perfuração do septo nasal (MARSDEN, 1986). Esses pacientes apresentam resposta positiva a IDRM e à resposta linfoproliferativa *in vitro* de células do sangue periférico, frente ao antígeno. A magnitude desta resposta é geralmente maior que aquela verificada na forma localizada (CARVALHO *et al.*, 1985; CASTES *et al.*, 1983). O mecanismo exato da formação da lesão mucosa, como e onde as leishmanias sobrevivem em latência no organismo humano durante anos e os fatores que desencadeiam a doença ainda permanecem desconhecidos (BRASIL, 2007). De um modo geral, qualquer região da mucosa nasal, oral ou faríngea pode apresentar lesões de LTA. No entanto, a maioria dos pacientes acometidos tem envolvimento nasal isolado ou em associação com outras áreas de mucosa. A boca geralmente tem lesões em associação com o acometimento nasal, mas é possível o encontro de uma ou mais lesões apenas na mucosa oral. Mais freqüentemente, essas lesões ocorrem no lábio e no palato, embora já tenham sido identificadas lesões de úvula, gengiva, tonsilas e língua. Quando ocorre o acometimento da laringe, este costuma ser bastante intenso, com a presença de granulações vegetantes, recobertas com uma tênue camada de fibrina envolvendo a mucosa da epiglote e estendendo-se para a mucosa do vestíbulo laríngeo e pregas vocais. Pode ocorrer disfonia, caracterizada por voz rouca (MOREIRA, 1994; LESSA *et al.*, 2007).

Freqüentemente, os pacientes com a forma mucosa referem lesões em pele compatíveis com a leishmaniose cutânea, no passado, e apresentam uma ou mais cicatrizes cutâneas sugestivas. Parte deles relata história de ausência de tratamento ou tratamento inadequado da lesão cutânea inicial, o que leva a concluir que as curas espontâneas e os tratamentos curtos e irregulares constituem um forte risco para o aparecimento da forma mucosa (BRASIL, 2007). Dados da freqüência da doença na forma mucosa são variáveis, de acordo com a região. A maior parte dos casos atendidos ocorre em hospitais, aos quais os portadores da LTA são atraídos pela extensão e cronicidade da doença.

Jones *et al.* (1987), em um estudo prospectivo de 5 anos sobre a *L. braziliensis* em uma área endêmica no Brasil, encontraram 369 pacientes com LTA e, dentre estes, 10 apresentavam a forma mucosa, sendo que 8 demonstravam lesões mucosas secundárias às lesões cutâneas e 2 tiveram lesões mucosas sem manifestar cicatrizes ou lesões ativas em pele. As lesões mucosas foram mais freqüentes nos homens (razão 2,3:1). As lesões secundárias

foram mais freqüentes nos pacientes que apresentavam lesões maiores ou múltiplas, e o tempo de evolução dessas lesões foi em média de seis anos. Todos os pacientes examinados com a forma mucosa da doença tiveram testes cutâneos e sorológicos positivos.

Motta *et al.* (2007), em um estudo posterior, descreveram as características clinicopatológicas em 11 pacientes com lesões orais, provocadas pela leishmaniose mucosa. Os mesmos pesquisadores, através da técnica de PCR, conseguiram identificar nas amostras dois casos provocados pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* e um caso pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Outra forma de apresentação da doença é a leishmaniose cutânea difusa (LCD), cujo quadro clássico é caracterizado por infiltrações, pápulas e tubérculos envolvendo extensas áreas cutâneas (BRASIL, 2007). Tem caráter progressivo e não responde ao tratamento antimonial, apresentando ciclos contínuos de remissão (após o tratamento) e atividade. Os pacientes com LCD não apresentam resposta imune celular específica para o antígeno do parasita, tanto *in vivo* (DTH, teste de hipersensibilidade tardia denominado intradermoreação de Montenegro (IDRM) negativa), quanto *in vitro* (resposta proliferativa) (CASTES *et al.*, 1983; CASTES *et al.*, 1984).

Em resumo, a LTA, com sua ampla distribuição, constitui uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença, com risco de ocorrência de deformidades, principalmente faciais, com conseqüente envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2007). As principais espécies envolvidas são *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### **2.2.1 A LTA causada por *L. braziliensis***

O Rio de Janeiro é tradicionalmente considerado uma área endêmica de LTA, e a espécie circulante tem sido identificada como *L. braziliensis* (SCHUBACH *et al.*, 1998), apesar de recentemente ter sido descrito um caso de LCD por *Leishmania amazonensis* no sul

do estado (AZEVEDO-COUTINHO *et al.*, 2007). A maioria dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresenta a forma cutânea localizada, com a presença de uma única ulceração cutânea com formação de um infiltrado granulomatoso crônico, evidenciado na histopatologia e localizações variadas. A úlcera leishmaniótica cutânea tende a ser auto-limitada e pode evoluir para regressão, mesmo sem tratamento. A cicatrização pode dar-se num prazo de seis meses a vários anos, curando-se, frequentemente, dentro de 12 a 15 meses (REY, 1991). As vezes essas úlceras são acompanhadas de linfadenopatia regional precoce. Podem ocorrer lesões múltiplas, e, em alguns pacientes, a doença manifesta-se como leishmaniose cutânea disseminada (GRIMALDI *et al.*, 1989; BITTENCOURT e BARRAL-NETO, 1991 e BITTENCOURT e BARRAL, 1995; BARRAL *et al.*, 1992 e 1995), caracterizada pela presença de incontáveis lesões cutâneas ulceradas, geralmente de tamanho inferior a 1 cm e que apresentam boa resposta ao tratamento antimonial.

Alguns pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* (1 a 10%) desenvolvem (LM). Neste caso, é uma forma destrutiva que compromete principalmente nariz, faringe, palato e lábio superior. É comum a observação de grande destruição tecidual acompanhada de dificuldade de identificação de parasitas (CARVALHO *et al.*, 1985).

### 2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da LTA compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais consistem na evidenciação do parasita e em provas imunológicas (GENARO, 2002).

Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico podem ser obtidos a partir de escarificação ou biópsia de lesão. Também pode ser feita a punção aspirativa, quando houver necessidade de investigação de comprometimento ganglionar primário. No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão por aposição ou material proveniente de escarificação e punção aspirativa, corados pela técnica de Giemsa ou Leishman. O exame parasitológico indireto visa ao isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, como, por exemplo, NNN, Schneider's ou BHI (*Brain and Heart infusion*). Outro método de diagnóstico indireto é a inoculação em

animais de laboratório, sendo o *hamster* o animal de escolha (BRASIL, 2007). No entanto, a inoculação em animais não é mais utilizada como rotina diagnóstica. A análise histopatológica dos fragmentos de biópsia também é de fundamental importância no diagnóstico da LTA, pois pode identificar as formas parasitárias e, ao mesmo tempo, contribuir para o diagnóstico diferencial. Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de implementação de outras metodologias auxiliares, como a imuno-histoquímica e o PCR, para o diagnóstico da LTA, através da detecção de parasitas nas lesões (KERNNER *et al.*, 1999).

A detecção de resposta imune específica pode ser feita através da IDRM, imunofluorescência indireta (IFI) e/ou ensaio imunoenzimático (ELISA), além de resposta proliferativa primária de linfócitos (RPL). Esta é pouco utilizada na prática (BRASIL, 2007).

Para o tratamento da LTA, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2007) preconiza a utilização do antimonial pentavalente (antimoniato-N-metil-glucamina) como droga de primeira escolha. A anfotericina B é considerada droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial, ou na impossibilidade de seu uso.

O tratamento dos casos de lesão mucosa é frequentemente mais difícil, com necessidade de repetições e controle mais estrito. No entanto, os fatores que determinam a maior gravidade ainda não são conhecidos. Por isto, é importante conhecer com maior profundidade o microambiente destas lesões.

#### 2.4 A ORGANIZAÇÃO DO TECIDO DA MUCOSA ORAL, NASAL

O estudo de lesões de LTA na forma mucosa tem sido modificado pela valorização da detecção de fatores envolvidos na resposta imune *in situ* ao parasito. Este fato vem sendo compreendido melhor a partir dos trabalhos que descrevem a resposta imune na mucosa. Como as lesões podem acometer sítios diferentes da mucosa oro-faríngea, é importante o conhecimento da arquitetura e organização das várias regiões.

As superfícies mucosas, assim como na pele, representam a primeira linha de defesa do corpo humano formada por uma barreira, entre os ambientes externos e internos, contra a

entrada de microorganismos como bactérias, vírus, fungos e protozoários (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

As cavidades nasais direita e esquerda, mais o septo nasal cartilagenoso compõem as estruturas que formam o nariz. O tecido mucoso que reveste essas superfícies internas do nariz é do tipo pseudo-estratificado ciliar, com numerosas células caliciformes, sendo ricamente vascularizado e contendo glândulas serosas e mucosas. A principal função dessa mucosa é aquecer e umidificar o ar que entra no sistema respiratório (YOUNG e HEALTH, 2000).

A cavidade oral é um meio complexo com duas funções superpostas – respiratória e digestiva – e é a única área do corpo onde tecidos mineralizados são expostos ao ambiente externo. Na boca, várias e intrincadas interações acontecem. Como exemplo, podemos citar tecidos, alimento, ar e microorganismos. Além disto, a saliva e seus componentes também fazem parte do ambiente e pode facilitar ou dificultar estas interações (GREABU *et al*, 2007).

A boca é composta por dois “espaços virtuais”, ambos delimitados pelos arcos dentários. Um anterior e menor é denominado de vestíbulo bucal, revestido pelas mucosas labiais, jugais, alveolares e gengivais. O segundo espaço é maior e reveste a cavidade oral propriamente dita. É composto, anteriormente, pelas gengivas e dentes; superiormente, pela mucosa palatina; inferiormente, pela língua e pelo soalho bucal e posteriormente, pela mucosa que recobre o istmo das fauces e tonsilas. A mucosa oral continua-se com a pele dos lábios e com a mucosa da faringe para o restante do tubo digestivo (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

De forma resumida e geral o epitélio que reveste a mucosa oral é do tipo pavimentoso estratificado. Nas superfícies de epitélio queratinizado, ele pode ser orto ou paraqueratinizado. É composto por quatro estratos denominados basal, espinhoso, granular e córneo. O epitélio possui vários tipos celulares, como queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merckel. Entre os queratinócitos, podem estar presente, em pequenas quantidades, células sanguíneas, como linfócitos, neutrófilos e mastócitos (KATCHBURIAN e ARANA, 1999). Em toda a mucosa oral, existem numerosas glândulas salivares acessórias pequenas, que podem ser do tipo serosas e/ou mucosas (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; YOUNG e HEALTH, 2000).

A lâmina própria é composta por duas camadas: 1- papilar, composta por tecido conjuntivo frouxo e 2- reticular, formada por tecido conjuntivo mais denso. As células mais numerosas na lâmina própria são os fibroblastos, entretanto macrófagos e mastócitos, além de células sanguíneas e do sistema imune, também estão presentes, bem como as células indiferenciadas (KATCHBURIAN e ARANA, 1999). A mucosa oral apresenta funções de proteção contra os microorganismos e de revestimento dos tecidos mais profundos da cavidade oral (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

Existem três tipos de mucosa recobrendo a cavidade oral: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada. A mucosa de revestimento sem epitélio queratinizado é encontrada no palato mole, labial, jugal, no soalho bucal e ventre lingual. Já a mucosa mastigatória possui epitélio queratinizado e reveste palato duro e gengivas. A mucosa especializada é aquela que reveste o dorso da língua e o vermelhão dos lábios (KATCHBURIAN e ARANA, 1999). De forma geral, essas mucosas são constituídas por um epitélio e uma lâmina própria, assim como o tecido que compõe a pele, e geralmente essas mucosas são desprovidas de anexos. No entanto, várias particularidades podem ser observadas de região para região, dentro da cavidade bucal (TEN CATE, 2001, <http://www.foar.unesp.br/atlas/indice.html>). Como exemplo, podemos citar (adaptado de TEN CATE, 2001):

1- mucosa de revestimento do palato mole – constituída de epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado delgado, com corpúsculos gustativos; lâmina própria espessa com numerosas papilas curtas, fibras elásticas, altamente vascular e com leito capilar bem formado; submucosa com tecido difuso contendo numerosas glândulas salivares menores;

2- mucosa de revestimento do ventre lingual - constituída de epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado delgado sem corpúsculos gustativos; lâmina própria delgada com numerosas papilas curtas e algumas fibras elásticas; poucas glândulas salivares menores; leito capilar na zona subpapilar; camada reticular relativamente avascular; submucosa delgada e irregular com pequenos vasos e gordura; em algumas áreas pode se ligar diretamente à musculatura;

3- mucosa de revestimento do assoalho da boca - apresenta epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado muito delgado; lâmina própria com papilas curtas, poucas fibras elásticas, rico suprimento sanguíneo com alças capilares de anastomose; submucosa constituída de tecido conjuntivo frouxo com gordura e glândulas salivares menores;

4- mucosa de revestimento alveolar - constituída de epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado delgado; lâmina própria com papilas curtas, muitas fibras elásticas, alças capilares próximas à superfície supridas de vasos que correm paralelos ao periósteo; submucosa tecido conjuntivo frouxo com fibras elásticas espessas ligando-se ao periósteo, presença de glândulas salivares menores;

5- mucosa de revestimento labial e bucal – presença de epitélio pavimentoso estratificado, não queratinizado muito espesso; lâmina própria apresentando papilas altas, tecido conjuntivo denso fibroso com algumas fibras elásticas, rico suprimento vascular propiciando anastomoses por alças capilares nas papilas; região abaixo da mucosa é formada por feixes de colágeno e elastina que se aderem firmemente ao músculo, tecido conjuntivo denso com gorduras e glândulas salivares menores;

6- mucosa de revestimento dos lábios na zona vermelha – epitélio pavimentoso estratificado, ortoqueratinizado e delgado; na lâmina própria com numerosas papilas delgadas e alças capilares próximas da superfície; a mucosa se adere firmemente à musculatura com presença nesta região de glândulas salivares menores e glândulas sebáceas, de permeio a tecido adiposo;

7- mucosa de revestimento dos lábios na zona intermediária – epitélio pavimentoso estratificado, ortoqueratinizado e delgado; lâmina própria com papilas longas e irregulares, fibras elásticas e colágenas;

8- mucosa mastigatória da gengiva – constituída de epitélio pavimentoso estratificado orto ou paraqueratinizado, superfície em casca de laranja; lâmina própria com papilas estreitas e longas, colágeno denso, irrigação sanguínea baixa, mas com alças capilares longas e com presença de anastomoses; submucosa pouco nítida, com aderência firme da mucosa no periósteo;

9- mucosa mastigatória do palato duro – epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado na maior parte, mas com áreas de paraqueratinização, forma rugas transversais palatinas; lâmina própria com papilas longas, tecido conjuntivo denso, especialmente sob as rugas, suprimento vascular moderado, com curtas alças capilares; submucosa constituída de tecido conjuntivo denso ligando a mucosa ao perióstio, gordura e glândulas salivares menores nas laterais, onde a mucosa reveste os feixes neurovasculares;

10- mucosa especializada do dorso da língua – presença de epitélio estratificado queratinizado formando diferentes profundidades de papilas epiteliais, algumas com corpúsculos gustativos; lâmina própria com papilas longas, presença de glândulas salivares menores, inervação principalmente nos corpúsculos gustativos, plexos capilares com vasos de maior calibre nas regiões mais profundas; difícil distinção de submucosa, pois a mucosa liga-se ao tecido conjuntivo que reveste a musculatura.

Apesar de pouco pronunciadas, algumas modificações relacionadas à idade têm sido descritas. As alterações mais comuns seriam o adelgaçamento do epitélio e uma planificação da estrutura, com perda de papilas conjuntivas. Pode ocorrer também uma diminuição marcante do número de papilas gustativas. No entanto, estudos da atividade no epitélio e a renovação dos tecidos têm sido inconclusivos, não sendo possível evidenciar uma relação direta entre idade e perda da renovação celular da mucosa oral. Por outro lado, é possível verificar em alguns indivíduos uma modificação dos vasos com formação de nevos e pequenas varizes, sem, contudo ter se estabelecido uma relação de causa e efeito entre alterações vasculares e alterações da função da mucosa bucal (TEN CATE, 2001). As glândulas salivares têm seu tecido parcialmente substituído por tecido adiposo e pode haver modificação da saliva de repouso, mas estudos têm demonstrado que a saliva pos estímulo é semelhante a indivíduos mais jovens (NAVAZESH *et al.*, 1992; PERCIVAL *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 2008). Em particular, a saliva pelo seu volume e constituição é um dos principais componentes da cavidade bucal.

## 2.5 SALIVA E SEUS COMPONENTES

A cavidade bucal é constantemente umidificada por um fluido complexo, denominado fluido bucal, constituído da transudação de fluidos através da mucosa oral, nasal e da faringe, da flora bacteriana não aderente, restos alimentares, células epiteliais descamadas, leucócitos, imunoglobulinas, traços de medicamentos e produtos químicos, além do produto secretório das glândulas localizadas na região e denominadas glândulas salivares (ALMEIDA *et al.*, 2008).

As glândulas salivares se espalham por toda a cavidade bucal e podem ser divididas em maiores (parótida, submandibular e sublingual) e menores (labiais, linguais, bucais, glossopalatinas e retromolares) (TEN CATE, 2001). A secreção produzida por estas glândulas é denominada saliva e é composta por 99% de água. Além da água, uma variedade de componentes se mistura e são produzidos de forma contínua. No entanto, o volume produzido não é constante e normalmente aumenta após o estímulo, principalmente alimentar (gustativo e mastigatório), podendo também responder a estímulos visuais e olfativos. A fluidez da saliva também pode ser modificada e diferentes glândulas podem produzir saliva com composição e fluidez variada de serosa a mucóide (TEN CATE, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2008).

A saliva propriamente dita, além de água é composta por proteínas, glicoproteínas, eletrólitos, pequenas moléculas orgânicas e recebem a adição de produtos oriundos do sangue como leucócitos e imunoglobulinas. Age como solução de limpeza, reservatório iônico, lubrificante e tampão na manutenção do pH, além de mais recentemente terem sido descritos antioxidantes (como ácido úrico e ascórbico) e pequenos peptídios com atividade antibiótica natural (AMERONGEN e VEERMAN, 2002; BATTINO *et al.*, 2002, LISKMANN *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008). Com estas características a saliva é essencial para prevenir e manter a saúde da cavidade bucal. Nos últimos anos, vários estudos vêm surgindo no sentido de usar a saliva no diagnóstico não invasivo de várias doenças metabólicas, eliminação de drogas e detecção de imunoglobulinas específicas para patógenos (MALAMUD, 2006).

De forma didática, as funções da saliva podem ser divididas em: 1 auxiliar os processos gustativos facilitando o contato das substâncias com as papilas gustativas; 2-

estimular o crescimento e manutenção das papilas gustativas através da gustina (proteína presente na saliva); 3- proteger a cavidade bucal de agentes irritantes (principalmente devido à ação das mucinas); 4- lubrificar e proteger a cavidade bucal contra a desidratação e a adesão de agentes patogênicos; 5- facilitar a diluição e a limpeza da cavidade durante a alimentação.; 6- manter o pH da cavidade bucal prevenindo a colonização bacteriana e a ação de ácidos produzidos por microorganismos; 7- ação na integridade dos dentes por modulação de desmineralização e remineralização; 8- auxiliar o processo digestivo com ação de enzimas como amilase; 9- auxiliar nos processos de reparação tissular, principalmente facilitando a coagulação e proliferação epitelial (já foi verificada a presença de fator de crescimento de epiderme no produto das glândulas salivares submandibulares); 10- participação na formação do biofilme e na prevenção da formação de cálculos (por diminuir a precipitação de cálcio e íons fosfatos) e, 11- propriedades antimicrobianas (através de vários componentes) (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Dentre todas as funções descritas acima, as funções antioxidante e antimicrobiana têm sido foco de estudos recentes, o que vem possibilitando a melhor compreensão destas funções. Por exemplo, Liskmann *et al.* (2007) verificaram uma redução significativa de antioxidantes na saliva de pacientes com doença peri-implante e sugeriram a suplementação com antioxidantes nestes casos. Já no tocante à ação antibacteriana vários autores vêm descrevendo a função de componentes imunológicos (como IgA, leucócitos e antibióticos naturais como defensinas) e não imunológicos, como enzimas com capacidade lítica, bactericida, bacteriostática e ações sobre bactérias, fungos e outros patógenos. Como exemplo deste último grupo podemos citar: a lisozina, lactoferrina e a peroxidase, além de glutinina, histatinas, citastinas, proteínas ricas em prolina etc (ALMEIDA *et al.*, 2008).

As ações diretas sobre patógenos como a lise, neutralização e ação catalisadora tem sido descrita em vários grupos de microorganismos como exemplo podemos citar o *Streptococcus* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2008); *Porphyromonas gingivalis* (MURAKAMI *et al.*, 1992) e *Cândida albicans* (XU *et al.*, 1991).

Devido às importantes ações citadas acima os pesquisadores tem se debruçado sobre os fatores que influenciam a composição e a secreção da saliva. Assim, indicadores tão variados como o grau de hidratação individual, ciclo circadiano, estímulos visuais, olfativos e gustativos, uso de medicamentos, uso de estimulantes contínuos (como os chiclets); a postura corporal, a incidência de luz, o habito de fumar e o tamanho das glândulas pode contribuir

para seu funcionamento. Outros fatores como exercícios físicos, ingestão de alcoólicos, doenças sistêmicas, grau de nutrição, sexo e idade também tem sido apontados como capazes de influenciar a função das glândulas salivares. No entanto, não há consenso sobre a ação destes agentes e vários trabalhos com resultados conflitantes têm sido publicados (ALMEIDA *et al.*, 2008). Notadamente em relação à idade, apesar de vários estudos, não existe uma definição de composição de saliva nos extremos da vida. Sabe-se que, com o envelhecimento, parte do parênquima das glândulas salivares vai sendo substituído por tecido adiposo e tecido fibrovascular, levando à diminuição do tamanho dos acinos. Mas não foi provado se estas alterações levam à mudança na composição da saliva (TEN CATE, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2008). Alguns autores sugerem que a composição em condição de repouso é diferente nos indivíduos idosos mas, que em condição de estímulo não foram evidenciadas diferenças (NAVAZESH *et al.*, 1992; PERCIVAL *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 2008). Desta forma, a capacidade de atuação da saliva de idosos em condições patológicas de cavidade bucal pode estar preservada, apesar das pequenas alterações fisiológicas na função basal das glândulas salivares. Assim sendo, à luz do conhecimento atual a ação antimicrobiana e imunomoduladora da saliva não será significativamente modificada no homem, não importando sua idade ou sexo.

Saliva, componentes da mucosa oral e nasal e células do sistema imune compõem uma barreira física, química e imunológica à implantação de agentes patogênicos na região. No local o sistema imune se organiza de maneira particular e, nos últimos anos, têm sido descrito a organização do sistema imune associado às mucosas.

## 2.6 A ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ASSOCIADO À MUCOSA

O tecido linfóide associado à mucosa (MALT) corresponde aos órgãos linfóides secundários ou periféricos, encontrados na lâmina própria, e na submucosa de diversos órgãos dos trato digestivo, respiratório, geniturinário, além dos nódulos linfóides e do tecido linfóide difuso, formando arranjos mais complexos como as placas de Peyer do ílio, o apêndice vermiforme e as tonsilas (palatinas, linguais e faríngea) (SIQUEIRA e DANTAS, 2000).

O conhecimento do MALT é baseado principalmente em estudos na mucosa do trato gastrointestinal. Muito pouco se sabe da resposta imunológica da mucosa respiratória e oral, apesar de ela ser uma porta de entrada para antígenos. Mesmo existindo pequenas diferenças entre as várias regiões revestidas por tecido mucoso, é possível que as características gerais das respostas imunológicas sejam semelhantes em todos os tecidos linfóides associados às mucosas. Nas camadas superficiais das mucosas, ocorre o acúmulo de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APCs- principalmente macrófagos), responsáveis por iniciar a resposta imunológica local do sistema imune, frente à agressão. Os linfócitos, as APCs e outras células acessórias podem ser encontrados nos órgãos linfóides secundários ou periféricos, que se espalham ao longo das superfícies mucosas, formando áreas organizadas ou difusas (SIQUEIRA e DANTAS, 2000). Os linfócitos estão presentes em grande quantidade, na camada epitelial, espalhados na lâmina própria e nas placas de Peyer.

As células de cada região apresentam propriedades fenotípicas e funcionais distintas. A maioria dos linfócitos intra-epiteliais é constituída de células T. Nos seres humanos, a grande parte deles é CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos com receptor do tipo  $\gamma\delta$  correspondem a cerca de 10% do total de linfócitos intra-epiteliais. Esta concentração, apesar de ser aparentemente pequena, é pelo menos o dobro daquela observada na circulação periférica. A segunda área de acúmulo de células do sistema imune é denominada lâmina própria intestinal e contém uma população mista de células que incluem linfócitos T, na maioria CD4<sup>+</sup>, com fenótipo de células ativadas. Ela também contém grande quantidade de outros linfócitos e plasmócitos ativados, assim como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos. As placas de Peyer são semelhantes aos folículos linfóides do baço e linfonodos, e a região central desses folículos apresenta uma área rica em células B, e um número pequeno de células CD4<sup>+</sup> na região interfolicular. As amígdalas faríngeas são folículos linfóides da mucosa, semelhantes às placas de Peyer. As amígdalas ou tonsilas são órgãos que representam uma associação de tecido linfóide com o epitélio tonsilar. Este pode ser estratificado pavimentoso ou pseudo-estratificado cilíndrico ciliado, com células caliciformes. O tecido linfóide é formado por nódulos linfóides e tecido linfóide difuso timo-dependente. Os nódulos das tonsilas mostram centros germinativos bem desenvolvidos, devido ao contato destes órgãos linfóides com o meio externo, o que os mantém em constante atividade. Existem três tipos de tonsilas: as palatinas, as linguais e as faríngeas. Em conjunto, elas formam o chamado anel de Waldeyer (SIQUEIRA e DANTAS, 2000).

Apesar da organização geral semelhante, resposta imunológica aos antígenos orais difere, em alguns aspectos fundamentais, da resposta a antígenos que ocorrem em outros locais, devido à produção de altos níveis de IgA associados ao tecido mucoso, que servem para neutralizar microorganismos e toxinas (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A IgA é o principal anticorpo encontrado na lágrima, no leite, na saliva, nas secreções nasais, bronqueal, intestino delgado, próstata e no líquido que umedece a vagina. Na boca, está presente na saliva e é resistente à digestão enzimática, constituindo um mecanismo de defesa imunológica contra patógenos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Como um dos sítios de infecção da LTA é a região das mucosas oral e nasal, torna-se de importância a compreensão não apenas do sistema imune das mucosas mas também a resposta imune estimulada pela infecção por este protozoário.

## 2.7 A RESPOSTA IMUNE NA LTA

Os primeiros estudos imunológicos para caracterizar a resposta imune celular nas manifestações clínicas da LTA, foram desenvolvidos através da análise do sangue periférico dos pacientes com doença ativa. Esses estudos avaliaram a resposta imuno-humoral e celular nas células T e B circulantes no sangue (CASTES *et al.*, 1983; CASTES *et al.*, 1984; CARVALHO *et al.*, 1985; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1990).

Castes *et al.* (1983), Carvalho *et al.* (1985) e Conceição-Silva *et al.* (1990) observaram que as respostas linfoproliferativas aos antígenos *Leishmania* eram significativamente maiores nos pacientes com a forma mucosa, quando comparada às dos pacientes portadores da forma cutânea. Entretanto, no estudo realizado por Carvalho *et al.* (1985), não houve diferença significativa entre os pacientes com a forma cutânea e os com a forma mucosa em relação às respostas linfoproliferativas aos mitógenos (fitohemaglutinina, concavalina-A e *pockewed* mitógeno) e subpopulações de linfócitos no sangue periférico (T, B, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Estes resultados, aparentemente contraditórios, podem ser devido à associação entre fatores dos parasitas e dos indivíduos estudados.

Conceição-Silva *et al.* (1990), analisando a resposta imune celular no sangue periférico e nas lesões dos pacientes portadores de leishmaniose cutânea e mucosa, observaram que a frequência de células respondedoras específicas para antígenos de *Leishmania braziliensis* (T *Lbb*) no sangue periférico, variou de 1:107.300 a 1:3.587, não sendo significativamente diferente nos pacientes com leishmaniose mucosa ou leishmaniose cutânea. No entanto, os autores detectaram uma diferença significativa entre a frequência de células T nas lesões cutâneas (1:748 a 1:45), quando comparadas às lesões mucosas (1:152 a 1:13). Uma correlação positiva foi observada entre a frequência de células respondedoras nas lesões e à: 1- magnitude de hipersensibilidade-tardia (DTH), 2- presença de necrose fibrinóide, associada à reação granulomatosa nos sítios das lesões e 3-severidade da doença. Essa associação observada entre a severidade da doença na leishmaniose mucosa e o exagerado número de células T *Lb*, nas lesões, acompanhado pela escassez de parasitas, sugere um efeito deletério do aumento do número de células T na lesão. Com a melhoria das técnicas de avaliação da resposta imune, assim como o melhor conhecimento dos mecanismos efetores desta resposta, outros dados puderam ser adicionados, no sentido de ampliar o conhecimento da imunopatologia da LTA.

A resposta do hospedeiro às infecções parece ser regulada por padrões específicos de produção local de citocinas. Estudos em camundongos, referentes à resistência a infecção por *Leishmania sp*, demonstram que resistência e proteção estão associadas às citocinas do tipo 1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), ao passo que a suscetibilidade à infecção está associada com a produção de citocinas do Tipo-2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Esse padrão tem sido correlacionado com o resultado da infecção por *Leishmania*, nos modelos murinos, com resistência versus suscetibilidade regulada pelas populações Th1 e Th2, respectivamente. É conhecido também que tanto os macrófagos de camundongos quanto os de humanos são capazes de matar leishmanias, na presença de sobrenadantes de linfócitos ativados por IFN- $\gamma$ . Esta citocina é considerada a linfocina que medeia a morte dos parasitas (PIRMEZ *et al.*, 1993). Estudos imunológicos em humanos demonstram uma combinação de citocinas Th1 e Th2, com predominância de Th1 na leishmaniose mucosa (TAPIA *et al.*, 1993; CASTES *et al.*, 1988; CARCERES e DITTMAR *et al.*, 1999).

As células T que produzem IL-2 e IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , denominadas células Th1 medeiam a resposta imune celular, pela ativação dos macrófagos, para matar ou inibir o crescimento de

patógenos. De maneira geral, a resposta Th1 resulta em uma doença leve ou de cura espontânea. Em contraste, a produção de IL-4, IL-5 e IL-10, que caracterizam a resposta Th2, estimula a resposta imuno-humoral e inibe algumas células que medeiam a resposta imune. Estas características facilitam a disseminação da infecção, por não haver ativação efetora de macrófagos para função parasiticida (DA-CRUZ *et al.*, 2002). No entanto, já foi descrito que, nas lesões mucosas, citocinas tipo 1 e tipo 2 coexistem em grandes concentrações, o que poderia levar ao desequilíbrio e lesão (PIRMEZ *et al.*, 1993).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pro-inflamatória secretada pelos macrófagos e linfócitos, cuja produção pode ser regulada por IFN- $\gamma$ . O papel do TNF- $\alpha$ , na patogênese da leishmaniose e de outras doenças inflamatórias crônicas parasitárias ou bacterianas, é fortemente sugerido pelo aumento dos seus níveis no soro e em sobrenadantes de cultura de linfócitos (DA-CRUZ *et al.*, 2002).

Por outro lado, a IL-10 é considerada a maior citocina modulatória da resposta imune nos pacientes com leishmaniose mucosa (DA-CRUZ *et al.*, 2002). Dentro desse contexto, Bacelar *et al.* (2002), avaliaram 21 pacientes com leishmaniose mucosa, para detectar o perfil de citocinas produzidas pelas células do sangue periférico, em resposta aos antígenos *Leishmania*, assim como à habilidade da IL-10 e do TGF- $\beta$  para modular a resposta imune. Esse estudo sugeriu que a leishmaniose mucosa é caracterizada pelo aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e diminuição de IL-10. O CD4<sup>+</sup> é a principal fonte de produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , nos pacientes com leishmaniose mucosa. O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são produtos necessários para matar a *Leishmania*, mas sua presença implica em inflamação, causando dano tecidual. No entanto, apesar de o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  representarem um importante mecanismo de defesa contra esses parasitas, estudos prévios tem mostrado que o controle e a cura da doença não são seguidos de esterilização. Essas conclusões sustentam o fato de que a adição endógena de IFN- $\gamma$  ou de produtos das células T de pacientes com leishmaniose mucosa, em culturas de macrófagos humanos infectados com *Leishmania*, não elimina os microorganismos. Em adição, nos pacientes com leishmaniose mucosa a presença de IL-10 mesmo em concentração não elevada pode diminuir a habilidade de resposta aos antígenos *Leishmania*.

Faria *et al.* (2005), sugeriram que a intensa destruição tecidual observada na LM é consequência de uma resposta imune inflamatória exarcebada, não controlada, e com atividade citotóxica. Os autores primeiramente identificaram as fontes celulares da citotoxicidade inflamatória e anti-inflamatórias, além da expressão das moléculas efetoras, e a expressão do receptor de IL-10 nas lesões de LM e LC, através da microscopia confocal. As lesões de LM apresentaram maior quantidade de IFN- $\gamma$  comparadas com as lesões de LC. Em ambas LM e LC, o IFN- $\gamma$  era produzido em maior quantidade nas células CD4<sup>+</sup>, seguidas pelas células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. O número de células produzindo TNF- $\alpha$ , bem como IL-10, foram similares, tanto na LM e como na LC. O estudo da molécula Granzima A mostrou maior expressão nas lesões LM que nas LC, enquanto em NOS2 não foi diferente. Finalmente, a expressão do receptor de IL-10 era menor nas lesões LM que nas LC. Deste modo, os autores identificaram padrões de citocinas distintas e populações celulares para LC e LM, e sugeriram um mecanismo possível para o desenvolvimento da doença mucosa, através da demonstração de que a baixa expressão de receptores IL-10 está presente em conjunto com um padrão citotóxico e inflamatório na LM.

Da Cruz *et al.* (2002), investigando a resposta imune celular mediada pelas células T de sangue periférico em pacientes com leishmaniose mucosa, encontraram similaridade entre estes e os resultados dos pacientes com leishmaniose cutânea, pelas elevadas proporções de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, reativas à *L. braziliensis*. Além disso, pacientes com leishmaniose mucosa, durante a doença ativa, apresentavam produção elevada de IFN- $\gamma$  e outras citocinas do tipo 1, mas também apresentavam citocinas do tipo 2 (IL-4 e IL-5) em quantidade apreciável, fato que não era observado nos pacientes com a forma cutânea.

Gaze *et al.* (2006), estudaram as células mononucleares no sangue periférico de 17 pacientes com LC e, em 9 pacientes, com LM, tanto *ex vivo* quanto após cultura com o antígeno *Leishmania* solúvel (SLA). Os pacientes com LM apresentaram elevadas frequências de células T ativadas *ex vivo* com fenótipo CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> quando comparadas com os com LC. Além disso, ao estímulo com SLA, os pacientes com LM apresentavam maior frequência na produção de TNF- $\alpha$ , nas células CD4<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>, quando comparados aos indivíduos LC. Em adição, os pacientes LC apresentaram uma correlação positiva entre a frequência de IL-10 e TNF- $\alpha$ , fato não observado nos pacientes com LM. Essa falta de correlação positiva na produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  (produzidos por monócitos na

LM) poderia levar a um menor controle na resposta inflamatória *in vivo*. Esses resultados corroboram o modelo de uma resposta imune exarcebada e não regulada, nos pacientes com LM, e é o ponto chave que poderia levar ao desenvolvimento da imunopatologia nos pacientes LM.

Carvalho *et al.* (2007), investigaram fatores imunológicos que poderiam explicar alguns mecanismos imunes regulatórios entre os pacientes com LM e LC, comparando a frequência de moléculas co-estimulatórias, marcadores apoptóticos, marcadores de ativação de células T, assim como a habilidade dos anticorpos para aneutralização das interleucinas IL-2, IL-12, IL-15, para diminuir a produção de IFN- $\gamma$  nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC), estimuladas com antígenos *Leishmania*. Na LC, anti IL-12 e IL-15, suprimem significativamente a produção do antígeno IFN- $\gamma$ , enquanto na LM, apenas o IL-12 suprime a produção de IFN- $\gamma$ . Observou-se na LM maior frequência de células T CD4<sup>+</sup>, expressando CD28<sup>-</sup>, CD69<sup>+</sup> e CD62L<sub>Low</sub>, quando comparada a LC. Esses dados indicam que uma resposta exarcebada do tipo 1 na LM, é diferencialmente regulada e não apropriadamente inibida, com o aumento da frequência de células T efetoras ativadas, mantendo a resposta inflamatória persistente e o dano tecidual observado na LM.

Pirmez *et al.* (1993), sugeriram que o curso clínico da infecção por *Leishmania braziliensis* no homem estaria associado com o padrão local específico de produção de citocinas, pois observaram predominância relativa de RNAm de citocinas do tipo 1, como a IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotoxinas, em lesões cutâneas localizadas e em reações de hipersensibilidade tardia provocadas pela IDR. Nas lesões provenientes de formas crônicas e mucocutâneas destrutivas da leishmaniose, havia a presença simultânea de RNAs de citocinas do tipo 1 e 2, porém, com marcante abundância de IL-4 e, em menor quantidade, IL-5 e IL-10. Outras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e GM-CSF, IL-2 e IFN- $\gamma$  e linfocinas apresentaram proporções semelhantes, tanto na leishmaniose cutânea como na leishmaniose mucocutânea.

Além dos linfócitos T e citocinas, outros tipos celulares podem estar diretamente envolvidos na organização da resposta imune nas leishmanioses. Blank *et al.* (1993), estudaram as células de Langerhans no curso das leishmanioses, em culturas celulares. Sustentaram o conceito de que, na inoculação de *L. major* na pele, os organismos viáveis seriam não apenas fagocitados por macrófagos, mas também pelas células de Langerhans. Os

pesquisadores propuseram que a função principal das células de Langerhans contendo *L.major* fosse apresentá-las às células T. Elas poderiam expressar essa atividade após migração para os linfonodos drenantes e iniciar respostas celulares específicas para *L.major*, por estímulo quiescente nas células T. Além disso, elas poderiam ser cruciais para a regulação da resposta imune local no infiltrado das lesões cutâneas, pela apresentação do antígeno parasita para as células efectoras.

Moll *et al.* (1993), em estudo posterior, enfatizaram o papel crítico das células de Langerhans na leishmaniose, documentado por imunofluorescência *in vivo*: as células de Langerhans teriam a habilidade para transportar *L.major* da pele para os linfonodos regionais para iniciar uma resposta celular imune.

Já o papel das selectinas-E (CD62E) tem sido pouco documentado na literatura. São escassos estudos referentes à leishmaniose cutânea, e os existentes foram realizados em cultivos celulares, citometria de fluxo e análise de citocinas (SUNDRKÖTTER *et al.*, 1996; ZAPH e SCOTT 2003). Segundo Sundrkötter *et al.* (1996), as células T murinas ativadas *in vivo* são capazes de induzir expressão de selectina-E *in vitro*. Posteriormente, foram estudados camundongos BALB/C eutímicos (normais) e camundongos BALB/C atímicos (nude-deficiente na função das células T), para avaliar se linfócitos T também regulam selectina-E. A avaliação foi realizada em modelos de inflamação cutânea crônica (leishmaniose) e aguda (dermatite de contato alérgica e dermatite de contato irritante). Na última, não haveria um papel decisivo para as células T. Os pesquisadores constataram que os camundongos atímicos apresentaram uma expressão deficiente de selectina-E, nos modelos de imunidade mediada por células que, poderia sugerir dominação para reconstituição com antígenos específicos para as células T. Em adição, Zaph e Scott (2003), avaliando o papel das selectinas endoteliais P e E no desenvolvimento da imunidade e patologia, durante a resposta imune contra o patógeno intracelular *L. major*, verificaram que ambas não são necessárias para a expressão da resposta imune protetora contra a leishmaniose cutânea.

Outras células têm sido objetivo de estudos na leishmaniose, entre elas podem-se citar os neutrófilos. O estudo dessas células no modelo murino de infecção por *L. major* sugere que elas estão envolvidas na resistência à infecção na leishmaniose cutânea. Evidências mostram que essas células predominam nas fases iniciais de infecção e seus números decrescem com a progressão da infecção. A detecção de neutrófilos em áreas de destruição de parasitas, a

visualização deste tipo celular contendo parasitas intracelulares e a sua redução em número com o decorrer da doença, sugerem uma importante função parasiticida durante a fase aguda de infecção (POMPEU *et al.*, 1991).

Lima *et al.* (1998), verificaram um intenso infiltrado de polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, na derme de camundongos BALB/C e C57BL/6, nas primeiras horas após a infecção por *L. major*. Esses neutrófilos apresentaram um ou mais parasitas no interior de seus vacúolos citoplasmáticos. Com a evolução, o quadro histopatológico mudava completamente, e os polimorfonucleares passavam a ser raros gerando predominância de monócitos e macrófagos. A observação de significativo número de parasitas com diversos graus de degeneração, no interior dos neutrófilos, sugeriu que este tipo celular atuava de forma ativa na destruição de parasitas. A depleção de neutrófilos levou ao desenvolvimento de lesões mais severas e aumento da carga parasitária no linfonodo drenante. Esses dados mostram a importância da imunidade inata no controle da população parasitária, nos primeiros momentos de infecção pela *Leishmania* sp.

Conforme Venuprasad *et al.* (2002), o controle da infecção por neutrófilos é mediado por alterações na função de células T. A ativação da molécula CD28 em neutrófilos, após interação com a molécula B7 de macrófagos, resultou na liberação de IFN- $\gamma$ . Como efeito da presença dessa citocina, houve a restrição do crescimento parasitário e a modulação da secreção de citocinas por células TCD4<sup>+</sup>, levando a alta liberação de IFN- $\gamma$  e menor expressão de IL-4. Assim, os neutrófilos foram capazes de direcionar a resposta de células T para tipo 1, com conseqüente aumento da atividade leishmanicida e controle da carga parasitária. Ribeiro-Gomes *et al.* (2004), evidenciaram que interações entre macrófagos e neutrófilos mortos influenciavam, de forma importante, a resposta do hospedeiro à infecção, podendo ser pró-inflamatória ou anti-inflamatória, dependendo da cepa de camundongo utilizada. Cepas suscetíveis (BALB/C) apresentavam produção de TGF- $\beta$  por macrófagos e alta carga parasitária. Camundongos resistentes (C57BL/6) apresentaram produção de TNF- $\alpha$  e destruição parasitária. Tacchini-Cottier *et al.* (2000), observaram que a depleção de neutrófilos de camundongos BALB/C prevenia o pico recente de RNAm para IL-4 e era capaz de inibir o desenvolvimento de células Th2. Em paralelo, havia resolução de lesão e este efeito protetor mostrava-se dependente de IL-12.

Alguns dados demonstraram o envolvimento de neutrófilos em doença humana. Van Zandbergen *et al.* (2004), observaram que neutrófilos humanos obtidos de sangue periférico fagocitavam, porém não eram capazes de eliminar o parasita. Estas células infectadas secretavam altos níveis de quimiocinas MIP-1 $\beta$  que atraíam os macrófagos. Os macrófagos rapidamente fagocitavam os polimorfonucleares apoptóticos e infectados, o que resultava na liberação de TGF- $\beta$  (citocina anti-inflamatória). Assim, os parasitas internalizados eram capazes de sobreviver e se multiplicar nos macrófagos, utilizando os neutrófilos como um meio para entrar silenciosamente em sua célula hospedeira final.

Mesmo com todo o conhecimento já produzido, ainda não foi possível correlacionar, de forma direta, a evolução das leishmanioses e alguns fatores envolvidos no estímulo da resposta imune. Os estudos *in situ*, poderiam contribuir para o esclarecimento destas questões. Assim, principalmente nos últimos anos, as técnicas de estudo *in situ* como a hibridização e a imuno-histoquímica, tornaram-se ferramentas importantes para o entendimento da imunopatologia de uma grande variedade de doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, pois permitem a identificação *in situ* do agente infeccioso e do tipo de células e citocinas envolvidas na resposta inflamatória (AMATO *et al.*, 2003). Entretanto, a maioria desses estudos são realizados em lesões cutâneas. Os dados referentes às lesões mucosas são bastante escassos, não permitindo conclusões consistentes. Neste sentido precisamos associar o conhecimento da resposta imune das leishmanioses com os achados *in situ* nas lesões.

## 2.8 RESPOSTA IMUNE CELULAR *IN SITU*

### 2.8.1 Estudos na pele

A técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpos monoclonais (mAb) contra antígenos de superfície de células inflamatórias permite investigação da resposta imune celular no sítio das lesões de pele. A caracterização das células T na leishmaniose e em outras doenças granulomatosas tem demonstrado que a densidade de linfócitos no tecido pode ser significativamente diferente. Por essa razão, é importante que se realize uma caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório dos pacientes com LTA (MODLIN *et al.*,

1985; BARRAL *et al.*, 1987; ESTERRE *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 1994; ISAZA *et al.*, 1996; DIAZ *et al.*, 2002).

Barral *et al.* (1987), caracterizaram os linfócitos T em 10 pacientes com leishmaniose cutânea e com leishmaniose mucosa pela técnica de imuno-histoquímica. Houve uma predominância de células T CD4<sup>+</sup> sobre as CD8<sup>+</sup> em ambos os grupos. A razão entre essas duas subpopulações no sangue periférico era similar às das lesões. Com base nos resultados, os autores concluíram que a imunopatogênese das lesões de pele seriam semelhantes às das lesões nasais da leishmaniose mucosa.

Castes *et al.* (1988), encontraram maior proporção de células T CD4<sup>+</sup> sobre as células CD8<sup>+</sup>, tanto nas lesões de leishmaniose cutânea quanto nas de mucosa.

Em estudo posterior, Esterre *et al.* (1992), caracterizaram a resposta imune celular na leishmaniose cutânea localizada e observaram que o infiltrado inflamatório era composto, em sua maior parte, por linfócitos T, macrófagos e uma pequena porção de células B, *natural killer* e granulócitos. Além disso, as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentavam-se em quantidades iguais.

Lima *et al.* (1994), encontraram resultados semelhantes quanto à proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células B e, quando relacionaram o tempo de lesão e o fenótipo celular, notaram também que a porcentagem das células positivas se mantinha fixa para todos os tipos celulares, com exceção das células T  $\gamma\delta$ , que se reduziram com o tempo. A partir desses resultados, esses pesquisadores concluíram que, provavelmente, estas células seriam importantes na fase inicial da resposta imune na doença granulomatosa.

Xavier *et al.* (2005), conduziram um estudo *in situ* quantitativo da densidade de células de Langerhans CD1a<sup>+</sup>, em biópsias obtidas de pacientes com lesões de LTA, sem tratamento prévio, assim como em indivíduos controles saudáveis. A densidade de células de Langerhans foi significativamente maior entre pacientes infectados, quando comparados com os controles. A quantidade de parasitas foi proporcionalmente inversa e diminuiu nos pacientes crônicos. A leishmaniose cutânea localizada apresentava um aumento nas populações celulares, quando comparada com a leishmaniose difusa. Uma tendência no aumento da densidade de parasitas foi observada nas células de Langerhans dos pacientes

infectados por *Leishmania (L) amazonensis*, quando comparados com os pacientes com *Leishmania (V) braziliensis* sp.

Díaz *et al.* (2002), realizaram a caracterização fenotípica de leucócitos e moléculas associadas à ativação nos sítios de lesões cutâneas de pacientes com diferentes formas clínicas (leishmaniose cutânea difusa - LCD, leishmaniose cutânea localizada - LCL e leishmaniose cutânea crônica - LCC). Foi observado que o número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi semelhante nas lesões dos pacientes de LCL e LCC, e significativamente diferente nas lesões dos pacientes de LCD. Além disso, as lesões de LCL apresentaram cerca da metade do número de células CD69<sup>+</sup> recentemente ativadas, quando comparado às lesões de LCC. Porém a maioria era CLA<sup>+</sup>, (antígeno leucócito cutâneo) enquanto LCC apresentaram números mais altos de células CD69<sup>+</sup>, somente um terço expressando CLA<sup>+</sup>. Segundo os autores, isso sugere que o granuloma de pacientes LCC contém muitas células T ativadas que não são “marcadas/primadas” com o antígeno cutâneo, contribuindo assim para uma resposta imune aberrante. Por outro lado, o granuloma dos pacientes LCD apresenta os menores números de células CLA<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>, o que poderia ser associado ao estado tolerogênico característico destes pacientes.

A enzima NOS2 foi detectada nas lesões de pele de pacientes com psoríase, tuberculose, hanseníase. Em monócitos e macrófagos, de pacientes tratados com hepatite C e monócitos de crianças com malária cerebral. Em dois relatos através da imuno-histoquímica, foi demonstrado que a presença de NOS2 ocorre, também, durante a resposta imune no baço e na medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral ocasionada pela *Leishmania donovani* e *chagasi*. Essa enzima é um dos mecanismos-chave da defesa da fagocitose em mamíferos (STENGER *et al.*, 1994; BOGDAN, 2001, BRANDONISIO *et al.*, 2001). Estudos realizados em roedores demonstram que o controle de muitos patógenos, em diferentes infecções (incluindo viroses, bactérias, protozoários, fungos e helmintos), é estritamente dependente da expressão da atividade de NOS2. A maioria do conhecimento neste sentido foi obtido através da análise *in vivo* de camundongos tratados com inibidores de NOS2, ou portanto uma deleção no gene NOS2. Esta enzima é responsável pela produção do NO, a partir do substrato L-arginina (LIEW *et al.*, 1990). Vários relatos demonstram que o radical NO ou derivados dele não apenas agem diretamente como molécula efetora antimicrobiana, mas também exercem efeito imunorregulatório protetor para o hospedeiro. Os macrófagos são as principais células produtoras de NO (FACCHETTI *et al.*, 1999), porém outros tipos

celulares podem produzi-lo, como, por exemplo, os linfócitos T, fibroblastos, células dendríticas e células NK (BOGDAN, 2001; QADOUMI *et al.*, 2002).

A NOS2 apresenta um papel importante na eliminação das leishmanias, pela ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$  que leva à morte dos parasitas via NO, ao passo que IL-4 inibe a produção de NO nos macrófagos murinos. Recentemente, a NOS2 foi demonstrada nas lesões de leishmaniose cutânea em humanos (DÍAZ *et al.*, 2005). As citocinas do tipo 1 estão envolvidas na produção de NO, especialmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que poderiam agir em sinergia.

Qadoumi *et al.* (2002), sugerem que tanto as citocinas quanto a NOS2 são indispensáveis para a resolução das lesões em camundongos infectados pela *L. major* e *L. donovani*. Esses autores também relataram o primeiro estudo que sugeriu uma função anti-leishmanicida do NOS2 nas infecções por *Leishmania* em humanos. Ao analisar biópsias de pele realizadas em pacientes com LCL e LCD ocasionadas por *Leishmania mexicana*, encontraram que a expressão de NOS2 era mais proeminente nas lesões de LCL com a presença de poucos parasitas, ao passo que, nas lesões altamente parasitadas de LCD, apenas poucas células NOS2 positivas foram detectadas.

Díaz *et al.* (2005) avaliaram pela imuno-histoquímica, a presença de citocinas e NOS2 nas lesões de leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea intermediária (LCI) e leishmaniose cutânea difusa (LCD), podendo ser verificada nos granulomas da LCL uma predominância de IFN- $\gamma$  e IL-12, ao passo que, nos granulomas da LCI, predominavam IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ 1 nas células. Observaram também a expressão de NOS2, nos queratinócitos das lesões de LCL e LCI e nas células dendríticas epidérmicas das lesões de LCI. Na LCL e LCI, a maioria dos queratinócitos expressavam IL-12, e uma porção IFN- $\gamma$ . As células dendríticas, IL-12 e IFN- $\gamma$  eram esparsas ou ausentes na epiderme da LCL e LCI. Os resultados mostraram a importância do NOS2, IL-12 e IFN- $\gamma$  nas lesões de LCL e LCI, enfatizando a existência de uma mistura no padrão de citocinas na LCI, diferente da resposta Th1 e Th2 estabelecidas nas lesões de LCL e LCD.

Além da atividade inflamatória, os fenômenos da morte celular também têm sido importantes na regulação da resposta imune. Existem descritos na literatura alguns estudos

experimentais *in vitro* e *in vivo* relatando a importância do sistema Fas/FasL no desencadeamento da apoptose. Um destes estudos foi publicado por Conceição-Silva *et al.* (1998), que utilizaram o modelo murino de infecção por *L.major* e observaram que camundongos infectados por *L.major*, deficientes de sistema Fas, não apresentavam cicatrização de suas lesões. Também evidenciaram que a administração de FasL recombinante aos camundongos deficientes deste indutor resultava na resolução das lesões cutâneas, demonstrando a importância desta via na eliminação de parasitas e modulação da resposta imune. Ainda observaram que os macrófagos infectados *in vitro* aumentavam a expressão de Fas em resposta ao IFN- $\gamma$ , tornando-se suscetíveis a apoptose induzida por células T CD4.

El-Kowrany *et al.* (2001), analisaram lesões cutâneas e amostras de soro de camundongos suíços albinos e também de pacientes com leishmaniose, para investigar o sistema Fas/FasL como indutor de apoptose e citocinas leishmanicidas no desenvolvimento das lesões cutâneas. Os resultados mostraram um aumento significativo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO e Fas solúvel, tanto em camundongos como em humanos infectados. O Fas presente nas lesões teciduais foi maior nas amostras humanas que nas murinas. A expressão de Fas era reduzida nos camundongos infectados cronicamente, quando comparada com as com lesões agudas tardias.

Chakour *et al.* (2003), investigaram a contribuição do TNF e FasL no controle da replicação e desenvolvimento de lesões após infecção com *L. major*. Camundongos deficientes B6gld XB6 (TNF<sup>-/-</sup>) gld TNF<sup>-/-</sup> e camundongos resistentes C57BL/6 foram analisados quanto ao curso da doença, a resposta primária no sítio de inoculação do parasita e o desenvolvimento da resposta celular T CD4<sup>+</sup>. Os resultados obtidos sugeriram que o controle da replicação parasitária dentro do sítio de inoculação não requer apenas NOS2 e IFN- $\gamma$ , mas também FasL funcional, enquanto a contribuição de TNF é mínima.

Morgado *et al.* (2008), estudando lesões cutâneas de LTA, mostrou uma reação inflamatória produzida principalmente por linfócitos T e macrófagos. Em adição, uma correlação negativa entre NOS2 e detecção de parasitas foi observada, sugerindo um papel direto de NOS2 no controle parasitário. Para avaliar o curso da cura clínica em cicatrizes, foi avaliada também a composição de células e marcadores de inflamação nas cicatrizes das lesões. Foi possível detectar pequenas áreas de agrupamentos celulares por todo o tecido

fibroso, bem como próximo aos vasos e glândulas cutâneas. A análise dos tecidos cicatriciais mostrou uma redução importante na expressão de NOS2, E-Selectina, Ki67, Bcl-2 e Fas, quando comparados com as lesões. Em adição, cicatrizes com 3 anos de duração também apresentaram uma redução de CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como de célula de Langerhans. Em conjunto, os resultados nas células sugeriram que 1- A reação inflamatória mostra um padrão de celularidade durante a fase ativa das lesões de LTA o qual modifica-se lentamente, equilibrando-se de forma gradativa e lenta, após a cicatrização clínica das lesões. 2- As análises de 3 anos de cura clínica apresentam uma importante redução da reação inflamatória, demonstrada pela diminuição da celularidade e da expressão dos marcadores de atividade. Os dados sugerem que, após esse período, o equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita é obtido no lugar.

Em resumo, os resultados até agora obtidos nos estudos *in situ* de lesões cutâneas sugerem um processo inflamatório intenso, principalmente nas lesões recentes, composto principalmente por linfócitos T e macrófagos, com sinais de ativação. A intensidade do infiltrado inflamatório tende a diminuir quando começa haver o controle do número de parasitas no local, dando exemplo aos processos de cicatrização. Neste particular, a cicatrização na LTA parece ser um fenômeno dinâmico e lento, com manutenção de atividade inflamatória residual sob o tecido aparentemente cicatrizado.

### 2.8.2 Estudos na mucosa

Poucos estudos na literatura descrevem a resposta imune *in situ* na leishmaniose mucosa. Desta forma, muitos mecanismos imunológicos e etiopatogênicos ainda permanecem obscuros. As publicações existentes analisaram a caracterização fenotípica das células presentes no infiltrado inflamatório (MARTINS-ARENDEZ *et al.*, 1991; ESTERRE *et al.*, 1994; AMATO *et al.*, 2003). Até o presente momento, não foi identificado nenhum estudo com marcadores de atividade funcional.

Martinez-Arendes *et al.* (1991), estudaram lesões de seis pacientes com leishmaniose mucosa nasal e encontraram a razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de  $1.24 \pm 0.09$ , indicando uma proporção importante de células T CD8<sup>+</sup>. Por outro lado, a elevada proporção de células T auxiliares

CD4<sup>+</sup> observadas nas lesões mucosas poderia ter correlação direta com a diminuição do número dessa subpopulação de células, encontrado no sangue periférico, como verificado por outros investigadores (CARVALHO *et al.*, 1985; CASTES *et al.*, 1988). Outro dado relevante nesse estudo foi a não detecção de células de Langerhans (CD1a<sup>+</sup>) na mucosa nasal. Como as células de Langerhans também podem ser infectadas por *Leishmania sp. in vitro* (DOMPMARTIM *et al.*, 1998), a escassez de células de Langerhans no epitélio das lesões mucosas poderia refletir a migração seletiva de células de Langerhans, contendo Ag capturados do epitélio para os linfonodos regionais. A ausência de células de Langerhans no epitélio já foi também identificada em outras lesões mucosas, como as virais (DRIJKONINGEN *et al.*, 1988).

Esterre *et al.* (1994), estudaram 57 pacientes com lesões de leishmaniose mucosa e encontraram linfócitos T (sendo a maioria CD4<sup>+</sup>) predominantes sobre os linfócitos B. Os macrófagos infectados eram encontrados raramente, embora tenha sido possível observar algumas amastigotas intra-celulares. Não foram observadas amastigotas, extra-celulares. Os autores também sugerem que a topografia dos vasos na LM poderia induzir uma maior angiogênese na mesma, quando comparada com a LCL.

Amato *et al.* (2003), ao estudarem a caracterização *in situ* da resposta inflamatória na LM, antes e ao final do tratamento, demonstraram a redução/desaparecimento das lesões inflamatórias e o desaparecimento de formas amastigotas, após o tratamento específico. Apesar disso, o infiltrado de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ou antígenos de *Leishmania* persistiram nas lesões tratadas, sugerindo manutenção do estímulo ao processo inflamatório.

Palmeiro *et al.* (2007), relataram um caso de LTA acometendo cavidade oral, cujo primeiro diagnóstico tinha sido paracoccidiodomicose. O estudo imuno-histoquímico da lesão gengival demonstrou intenso infiltrado inflamatório, composto principalmente por linfócitos T CD3 e macrófagos. As células CD8 foram predominantes sobre as células CD4. E em adição, uma alta concentração de neutrófilos pode também ser observada.

Não foram encontradas referências na literatura de estudos com os marcadores funcionais de superfície celular e nuclear, respectivamente, NOS2, Sistema Fas-FasL, Bcl-2, CLA CD62E e Ki67, em lesões de leishmaniose mucosa em atividade. Os poucos relatos da atividade dos marcadores funcionais mencionados anteriormente são de trabalhos realizados

em mucosa referentes a outras doenças infecciosas, como a paracoccidiodomicose (PCM) e doença periodontal, doenças inflamatórias como o líquen plano e lúpus eritematoso. As displasias, câncer, hanseníase, sinusites crônicas não alérgicas, rinites também.

Em resumo, indícios de correlação positiva entre o processo inflamatório e a evolução das lesões de LTA, associada à escassez de dados sobre as lesões mucosas, apontam para a necessidade de estudos nesta área.

## 2.9 ESTUDOS NO SANGUE PERIFÉRICO E *IN SITU* DA MUCOSA EM OUTRAS DOENÇAS INFECCIOSAS E INFLAMATÓRIAS

Estudos no sangue periférico e *in situ* para avaliar resposta imune celular, nas lesões de mucosas em outras doenças infecciosas, como a doença periodontal e a paracoccidiodomicose, hanseníase, sinusites crônicas não alérgicas, rinites alérgicas e não alérgicas foram relatados na literatura (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1989; YAMAZAKI *et al.*, 1995; FOKKENS *et al.*, 1989; FOKKENS *et al.*, 1990, FOKKENS, 1998; LAPPIN *et al.*, 1999 e 2000; GREVERS *et al.*, 2000; PETIT *et al.*, 2001; BATISTA *et al.*, 2002; CAMPAINELLI *et al.*, 2003; NEWORAL *et al.*, 2003; KAMINAGAKURA *et al.*, 2006).

Petit *et al.* (2001), analisaram o fenótipo e função das células T, em amostras do sangue periférico na doença periodontal. O estudo foi composto por dois grupos: um, de pacientes com periodontite e outro de pacientes com gengivite. Os resultados mostraram que o número de células T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como a razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e capacidade proliferativa das células T, não foi diferente entre os dois grupos. Além disso, proporções de células T virgens e de memória de ambas subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não foram diferentes. A atividade funcional dos compartimentos celulares T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi determinada pela análise intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-4. Com base nas análises posteriores entre as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, função Th1 e Th2 e citotoxicidade das células T (Tc1) ou a função (Tc2). Nenhuma diferença significativa nas proporções das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> para IFN- $\gamma$  e IL-4 intercelular foi observada nos pacientes com periodontite e gengivites controles. Entretanto, níveis elevados de IL-4 intercelular nas células T CD8<sup>+</sup> foram vistos nos pacientes com periodontite. Isso poderia indicar uma alteração em direção à função Tc2 dentro das subpopulações de

células T CD8<sup>+</sup>. Como estes resultados foram obtidos em células isoladas do sangue periférico, seria necessário o exame *in situ* das lesões, para confirmar estes achados.

Lappin *et al.* (1999), estudaram a proporção relativa das células no infiltrado inflamatório mononuclear, em amostras de tecidos periodontais de pacientes com periodontite de adulto (PA) e periodontite de estabelecimento precoce (PEP), assim como em casos de gengivite. Um número significativo de células T foi observado nas amostras de PEP e gengivites, quando comparadas às amostras de periodontite de adulto. Em adição, um elevado número de células B foi observado nos tecidos de periodontite de adulto, quando comparado aos das gengivites. Não houve diferença significativa em relação aos macrófagos nos tecidos analisados. Os autores concluíram que essas diferenças nas proporções relativas de células B, células T e macrófagos poderiam refletir uma diferença na imunopatologia da periodontite de adulto e da periodontite de estabelecimento precoce.

O NO é um importante mediador pró-inflamatório na doença periodontal, a partir da enzima NOS2, que é secretada numa variedade de células, com ação direcionada para a lise dos patógenos. Além disto, NO está envolvido na regulação da função dos tecidos mineralizados e na manutenção do ligamento periodontal (MATEJKA *et al.*, 1998).

Moscardi-Bacchi *et al.* (1989), através da técnica de imuno-histoquímica, caracterizaram os granulomas causados pelo *Paracoccidioides braziliensis*. Biópsias de pele ou mucosa e linfonodos com paracoccidioidomicose disseminada foram estudadas. Os linfócitos T eram distribuídos em um padrão localizado, formando os granulomas epitelióides, ou em arranjos difusos, predominantemente ao redor dos vasos. Nos granulomas, as células T formavam um manto periférico ao redor dos agregados centrais dos macrófagos. A maioria dos linfócitos era de células T CD4, com poucas células CD8. Em contraste, pacientes apresentavam-se com uma diminuição no número de linfócitos CD4 periféricos e uma correspondente diminuição na razão CD4/CD8. Não houve nítida relação entre razão CD4/CD8 e o nível de imunodepressão celular desses pacientes. Baixos títulos de anticorpos *Paracoccidioidis braziliensis* foram detectados nos pacientes com a maior razão CD4/CD8 nos tecidos. Em conclusão, os autores sugeriram que o padrão de distribuição de linfócitos T nos granulomas *P. braziliensis*, com uma predominância de fenótipo auxiliar, poderiam indicar que essas células estão ativamente envolvidas no processo da doença.

O papel do NO na infecção de *P. braziliensis* ainda não foi bem esclarecido. Gonzáles *et al.* (2000), mostraram que a produção de citocinas e NO pelos macrófagos inibe a transformação de conídio para levedura, passo crucial para o estabelecimento da infecção. É sabido que a expressão de NOS2 nos macrófagos é fundamental na morte do fungo. O NO pode ser protetor, agindo como uma molécula efetora na citotoxicidade dos macrófagos e como um regulador na resposta inflamatória, mas poderia apresentar efeito secundário, causando imunossupressão (NEWORAL *et al.*, 2003). Nascimento *et al.* (2002), demonstraram que o NO é essencial para resistência à micose, pois a deficiência de NOS2 em ratos tornaram-nos extremamente suscetíveis à infecção por *Paracoccidioides braziliensis*.

O balanço entre a resposta das células T e conseqüente ativação dos macrófagos tem um papel regulatório importante na determinação do curso da inflamação por *Paracoccidioides braziliensis* em humanos. Dependendo do seu estado de ativação, os macrófagos podem ou não ser tóxicos para os parasitas. O mecanismo das citocinas, induzindo atividade fungicida nos macrófagos humanos, parece envolver a participação do NO, o qual exerce um poderoso efeito citostático e citotóxico contra o *Paracoccidioides braziliensis*. Uma falha da resposta celular T específica, para ativar os macrófagos na PCM, pode permitir a multiplicação e a disseminação do fungo, incluindo as manifestações mucocutâneas. Os macrófagos, provavelmente, quando adequadamente estimulados, são fortemente positivos para NOS2, nos tecidos contendo granulomas causados por *Micobacterium tuberculosis*, *Leishmania* sp, *Toxoplasma gondi* e *Cryptococcus neoformans* (BATISTA *et al.*, 2002).

Neworal *et al.* (2003), propuseram-se a examinar o padrão de citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e a expressão de NOS2 nas lesões de paracoccidioidomicose dos pacientes com paracoccidioidomicose juvenil e paracoccidioidomicose adulta, para caracterizar a dinâmica da resposta imune no sítio de inflamação. A maioria das células nos linfonodos era CD68, enquanto uma mistura de macrófagos, neutrófilos e células plasmáticas foram detectadas na mucosa oral. O TNF- $\alpha$ , bem como a expressão de NOS2 foi similar nos linfonodos, onde numerosas células fúngicas foram visualizadas. A maior expressão de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , nas lesões de paracoccidioidomicose juvenil de PCM, poderia representar um mecanismo pelo qual o fungo evade a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para uma doença mais severa e a forma disseminada da doença.

Neworal *et al.* (2003), identificaram uma resposta imune Th2 nos pacientes com paracoccidiodomicose juvenil da PCM, caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 e IL-5 e elevados níveis de anticorpos anti-*P. braziliensis* IgG4 e IgE, além de uma marcada eosinofilia. Esses mediadores, associados com baixo IFN- $\gamma$  e níveis de proliferação de linfócitos, foram correlacionados por análise estatística com uma doença mais severa. Em contraste, indivíduos sadios que moram em áreas endêmicas e são positivos ao teste paracoccidiodina mostraram um típico padrão Th1, com níveis substanciais de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, mas menor quantidade ou ausência de IL-4, IL-5, IL-10. Como resultado, esses indivíduos provavelmente desenvolveram uma resposta imune eficiente, capaz de prevenir o mecanismo da doença. A resposta imune intermediária foi observada na PCM de pacientes adultos, nos quais a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 não difere daquela observada no grupo PCM juvenil, apesar de os níveis de IL-4 e IL-5 serem significativamente baixos para citocinas inflamatórias e apresentarem um papel importante na gênese e controle da PCM.

Estudos *in vitro* têm demonstrado uma correlação direta entre a produção de NO e atividade microbicida de macrófagos, na presença de microorganismos intracelulares, como *Leishmania major*, *Mycobacterium bovis* e *Trypanosoma cruzi* (FACCETTI *et al.*, 1999). Em modelos murinos com PCM, foi demonstrado que NO está envolvido na proteção bem como na resposta imunossupressora aos fungos.

As citocinas inibidoras são mediadores importantes no controle da resposta inflamatória. Altos níveis de TGF- $\beta$  e IL-10 foram detectados nos linfonodos de pacientes com paracoccidiodomicose juvenil de PCM. Em estudos prévios, foi demonstrado que a resistência do *P. braziliensis* observada em moradores de áreas endêmicas estava associada com a resposta Th1 e pouca ou nenhuma produção de IL-10. As grandes quantidades de IL-10 e TGF- $\beta$  encontradas nas lesões inflamatórias de PCM adulta e juvenil estavam relacionadas com as formas severa e disseminada da doença. O TGF- $\beta$  tem sido implicado como tendo um efeito inibitório na expressão de NOS2 em macrófagos murinos. Todavia, é possível que a baixa expressão de NOS2 nas lesões de PCM possa representar um mecanismo evasivo na indução de parasitas, permitindo a sobrevivência dentro dos tecidos hospedeiros (BATISTA *et al.*, 2002; NEWORAL *et al.*, 2003; PARISE-FORTES *et al.*, 2006).

Batista *et al.* (2002), apresentaram um estudo imuno-histoquímico do NOS2, células T de memória (CD45RO), células T totais (CD3), células B (CD20), macrófagos (CD68) e células M. As amostras foram distribuídas em grupos, de acordo com o grau de expressão de NOS2 nas células gigantes multinucleadas e células mononucleares. A proporção de NOS2 nas células mononucleares (MN) e nas células gigantes multinucleadas (MNGC) na paracoccidiodomicose oral foi comparada com os controles (tecidos clinicamente saudáveis). As análises revelaram uma baixa expressão de NOS2 e diminuição nas células T CD4 na paracoccidiodomicose oral, o que poderia representar possíveis mecanismos que permitiram a multiplicação local do fungo e a manutenção da atividade das lesões orais. Ambos, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , aparentemente conferiam resistência ao *Pb*, estimulando formação de granulomas e produção de NO pelo macrófago. Em contraste, TGF $\beta$  e IL-10 inibem a síntese de NO pelo macrófago. Assim, a expressão da enzima NOS2 seria uma resposta aos estímulos inflamatórios e resultaria em grandes quantidades de NO, o qual parece inibir a transformação do *Pb* conídio para levedura.

Kaminagakura *et al.* (2006), avaliaram a distribuição das células inflamatórias na paracoccidiodomicose oral. Quinze casos de PCM oral foram estudados pela imuno-histoquímica quanto à presença de macrófagos, linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> e células S100<sup>+</sup>. Os macrófagos foram as principais células encontradas nas áreas granulomatosas bem organizadas, como também naquelas não granulomatosas. As células dendríticas S100<sup>+</sup> foram encontradas principalmente no epitélio, tecido conjuntivo subepitelial e na periferia dos granulomas organizados. As células CD15<sup>+</sup> estavam concentradas principalmente em áreas de ulceração e microabcessos intra-epiteliais. Os granulomas bem organizados continham poucas partículas fúngicas, indicando uma resposta imune hospedeira mais efetiva.

Campanelli *et al.* (2003), examinaram o envolvimento da via CD95-CD95L na modulação da apoptose nos pacientes com *Pb*. A primeira indicação de que o via Fas-FasL poderia estar envolvido na regulação da apoptose, durante a paracoccidiodomicose, veio da observação de que a expressão de CD95L era maior nas células dos pacientes com doença do que nas dos controles. A possibilidade de que o Fas-FasL estaria envolvido na apoptose confirmou-se pelo achado de que a neutralização do FasL levaria a uma significativa redução na produção dos níveis da apoptose em culturas de PBMC com antígenos de *Pb*.

Também na hanseníase, estudos *in situ* têm sido realizados, Fokkens (1998), estudou 40 mucosas nasais de pacientes hansenicos com diferentes classificações (lepra tuberculóide, lepra lepromatosa e lepra *bordeline*) e a duração de doença. Foi avaliada a distribuição de linfócitos T, macrófagos e neutrófilos, tanto em epitélio quanto em lâmina própria. No grupo de paciente com lepra lepromatosa, foi verificada maior quantidade de macrófagos, comparado aos outros grupos e ao grupo controle negativo. Uma maior proporção de células T CD4<sup>+</sup> em relação às CD8<sup>+</sup> também foi encontrada nos pacientes com as formas lepromatosa e *bordeline*, em comparação aos controles negativos. Os neutrófilos não estavam aumentados em nenhuma das formas da doença ativa. Em comparação com os controles negativos, Grevers *et al.* (2000), avaliaram a localização e a diferenciação do infiltrado inflamatório no epitélio, lâmina própria e glândulas seromucosas da mucosa nasal, em 14 pacientes com sinusite crônica não alérgica e 10 pacientes controles não alérgicos. Foram utilizados anticorpos monoclonais CD3, CD4, CD8, CD22, CD68, CD56, neutrófilo elastase e eosinófilos. Os autores encontraram um aumento significativo de CD3, CD4, CD8 e células B na mucosa nasal dos pacientes com sinusite crônica. Entretanto, macrófagos e eosinófilos não mostraram nenhum aumento significativo.

Desta formas os processos inflamatórios envolvendo mucosas apresentam características comuns aliadas à algumas particularidades predominantes em tipos específicos de infecção. Sendo assim, o estudo comparativo destes processos inflamatórios poderia auxiliar na comparação de resposta imune localizada.

### **3 HIPÓTESE**

Existe diferença na constituição e na organização do infiltrado inflamatório das lesões de LTA em mucosa oral e nasal.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL:

Comparar, através do método de imuno-histoquímica, a composição e distribuição do processo inflamatório *in situ* das lesões da Leishmaniose Tegumentar Americana, em mucosa oral e nasal.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) analisar qualitativa e quantitativamente, o infiltrado inflamatório nas lesões orais e nasais de LTA;
- b) comparar qualitativa e quantitativamente o infiltrado inflamatório nas lesões orais e nasais de LTA com as mucosas orais e nasais saudáveis;
- c) relacionar os achados inflamatórios com os dados clínicos e de resposta ao tratamento;
- d) Detectar a presença de *L.braziliensis*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

A amostra foi composta por pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na forma mucosa, confirmados por pelo menos dois métodos de diagnóstico laboratorial para a leishmaniose, entre eles: IDR (positiva quando a área de endurecimento for maior ou igual a 5 mm), anatomopatológico, ELISA, Imunofluorescência Indireta e cultura. A mucosa dos indivíduos controle era oriunda de cirurgias otorrinolaringológicas (septoplastia e/ou turbinectomia) e bucomaxilo-faciais (extração de terceiros molares inclusos) e não apresentavam sinais macroscópicos relacionados a qualquer tipo de processo inflamatório. Os 4 grupos de estudo foram:

- 1) 8 pacientes com lesão em cavidade oral;
- 2) 12 pacientes com lesão em cavidade nasal;
- 3) 10 pacientes doadores de mucosas nasais não relacionadas a doenças infecciosas ou parasitárias e sem sinais macroscópicos de inflamação;
- 4) 10 pacientes doadores de mucosas orais não relacionadas a doenças infecciosas ou parasitárias e sem sinais macroscópicos de inflamação.

Foi adotado como critério de exclusão os extremos de idade (pacientes com menos de 9 anos e com mais de 80 anos), a concomitância de patologias (pacientes que apresentavam outras patologias como HIV+, Doença de Chagas, paracoccidiodomicose, tuberculose, hanseníase, sífilis e outras), tratamentos imunossupressores e alteração/ausência de níveis de compreensão, necessários à assinatura do termo de consentimento.

Os dados clínicos foram obtidos do prontuário de atendimento e discutidos com o médico responsável, mantendo-se a cláusula de sigilo (anexos 1 e 2). Os principais parâmetros usados na análise foram: sexo, idade, tempo de lesão, localização da lesão, aspecto clínico e histopatológico das lesões, além de dados laboratoriais para detecção de parasitas. Todos os pacientes e os indivíduos dos grupos controles foram informados do estudo, receberam explicações sobre o procedimento e apenas aqueles que assinaram o termo de consentimento

livre e esclarecido tiveram suas amostras recolhidas de acordo com os protocolos 014/2002, coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Fátima da Conceição-Silva e 158/2003, coordenado pelo Dr. Armando Schubach e aprovados pelo CEP-IOC-FIOCRUZ. Não houve mudança de método ou questionamento que pudesse caracterizar uso de amostra para outros fins que os aprovados no projeto 014/2002. Este trabalho, no presente formato, foi revalidado com o nº 0017.0.11.009-06 pelo CEP-IPEC-FIOCRUZ e com o nº 014/2006 pelo CEP-PUCRS.

As biópsias das lesões foram coletadas no momento do diagnóstico dos pacientes atendidos no ambulatório de Leishmaniose Tegumentar Americana, coordenado pelo Dr. Armando Schubach, localizado no IPEC/FIOCRUZ, e armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunoparasitologia, IOC - FIOCRUZ. As biópsias controles foram obtidas em procedimento cirúrgico otorrinolaringológicos (Hospital Geral de Bonsucesso - RJ) pela equipe do Dr. Krishnamurti Matos de Araújo Sarmiento Júnior e em procedimentos cirúrgicos odontológicos (Hospital Clementino Fraga Filho-UFRJ) pela equipe da Dra. Maria Aparecida Albuquerque Cavalcante. As amostras de biópsias foram armazenadas como descrito abaixo.

## 5.2 MÉTODO

### 5.2.1 Preparação dos Fragmentos Teciduais

Biópsias com tamanho variável (fragmentos obtidos por incisão com bisturi, punch de 3 mm, ou usando-se a pinça de otorrinolaringologia) foram obtidas pelo médico responsável, após assepsia, antissepsia e anestesia local com lidocaína 2%. Parte deste material foi destinado aos testes diagnósticos (culturas e histopatologia), e um fragmento foi utilizado para o estudo.

O tecido para estudo foi mergulhado em resina OCT (Tissue-Tek, Sakura), congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  e imediatamente armazenado em botijões contendo nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para análise do material, foram realizados cortes com 3  $\mu\text{m}$  de espessura, utilizando-se aparelho de criostato (Leika, Alemanha). Dois a três cortes foram apostos em cada lâmina de microscopia previamente silanizadas (Silanized Slides, Dakocytomation, Carpinteria Clostrup, Dinamarca)

e fixados em acetona PA (Merck KgA, Darmstadt, Alemanha). As lâminas fixadas foram utilizadas imediatamente, ou então armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso.

Os fragmentos destinados à histopatologia foram mergulhados em solução salina com formol a 10% tamponado e processados para realização de cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE).

### **5.2.2 Histopatologia**

Fragmentos fixados em formalina tamponada 10% foram corados com HE e examinados por microscopia óptica (Zeiss, Alemanha). Além da descrição topográfica, foram consideradas as alterações em epitélio (hiperplasia escamosa e hiperplasia pseudoepiteliomatosa), e lâmina própria (formação de granulomas). A análise de infiltrado inflamatório foi analisada, variando do discreto (pelo menos 1 a 29% do campo) ao moderado (30 a 59% do campo) e ao intenso (mais de 60% do campo). Os resultados foram obtidos pelo médico patologista Leonardo Pereira Quintella (IPEC-FIOCRUZ).

### **5.2.3 Imuno-Histoquímica**

Os cortes fixados, quando congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram previamente descongelados por 1 hora à temperatura ambiente. Após este procedimento, tanto os cortes recém-fixados quanto aqueles descongelados eram processados da mesma forma. A primeira etapa consistiu na hidratação com solução salina tamponada fosfatada (PBS phosphate buffered solution) pH 7,4 – 7,6 por 10 minutos, à temperatura ambiente. A partir deste ponto, todas as lâminas foram mantidas em câmara úmida, até o momento da contra-coloração. Os cortes hidratados foram submetidos a várias etapas, visando ao bloqueio de ligações inespecíficas, a saber: 1- bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase Blocking reagent ready-to-use, Dako), em incubação por 10 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente; 2- soro de cabra 20% em PBS (Zymed Laboratories ICN, San Francisco, USA) para bloqueio, de receptores Fc (Fração constante) Entre as etapas de bloqueio, os cortes foram lavados em PBS, por 10 minutos, à

temperatura ambiente. Após 20 minutos de incubação com o soro de cabra, o excesso foi retirado e os diferentes anticorpos monoclonais primários, ou apenas PBS (controle negativo) foram adicionados nas concentrações pré-estabelecida (Quadro 1). Os anticorpos utilizados foram obtidos comercialmente e usados como: 1- marcadores para caracterização fenotípica: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD22, anti-CD1a, anti-CD68 e a elastase neutrofílica (Dako-Cytomation); 2- para a caracterização funcional, foram utilizados anti-NOS2 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-CD62E, anti-Bcl-2, anti-Ki67 (Dako-Cytomation), anti-CLA, anti-Fas e anti-FasL (BD Biosciences Pharmingen, San Francisco USA); 3- para a detecção de parasitas, foi utilizado soro policlonal de coelho anti-*Leishmania*, gentilmente cedido pela Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Madeira (IPEC-FIOCRUZ). Detalhes das especificidades de cada anticorpo estão descritos na Tabela 1. Apesar da variação de diluição de acordo com o AC (anticorpo) (Quadro 1), as condições de incubação foram as mesmas, ou seja, em câmara úmida, à temperatura de 4°C e por aproximadamente 18h.

**Quadro 1 - Marcadores para caracterização fenotípica e funcional**

<b>Marcador</b>	<b>Função</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>
Anti-CD3 (Clone-UCHT1)	Reconhecimento de população de linfócitos T totais.	Dako	1:200
Anti-CD4 (Clone-MT310)	Reconhecimento de subpopulações de linfócitos T- auxiliares e indutores.	Dako	1:200
Anti-CD8 (Clone-DK25)	Reconhecimento de subpopulações de linfócitos T – citotóxicas e supressores.	Dako	1:200
Anti-CD22 (Clone-1KB1281)	Reconhecimento de linfócitos B	Dako	1:150
Anti-CD68 (Clone-KP1)	Reconhecimento de macrófagos teciduais.	Dako	1:300
Anti-Elastase neutrofílica (Clone-NP57)	Reconhecimento de neutrófilos teciduais	Dako	1:200
Anti-CD1a (Clone-NA1/34)	Reconhecimento de células de Langerhans.	Dako	1:150
Anti-Ki67 (Clone-KiS5)	Reconhecimento da proteína nuclear Ki67 presentes nas células em proliferação.	Dako	1:140
Anti-CD62e (Clone-12CB6)	Reconhecimento de E-selectina expressa em célula endotelial ativada.	Dako	1:100
Anti-CLA (Clone-HECA-452)	Reconhecimento do antígeno associado linfócito cutâneo.	BD - Pharmingen	1:200
Anti-NOS2 (Clone-6)	Reconhecimento da enzima óxido nítrico sintase induzida.	BD - Transduction	1:100
Anti-Fas (Clone-DX2)	Reconhecimento da molécula de superfície celular CD95, expressa em grande variedade de células normais e neoplásicas.	BD -Pharmingen	1:100
Anti-FasL (Clone-G247-4)	Reconhecimento do ligante para Fas, expresso em células T ativadas, células NK e sítios imunologicamente privilegiados.	BD -Pharmingen	1:100
Anti-Bcl-2 (Clone-124)	Reconhecimento da oncoproteína Bcl-2.	Dako	1:100
Anti- <i>Leishmania</i> sp.	Policlonal produzido por imunização de coelhos com Ag de <i>Leishmania braziliensis</i> .	Gentilmente cedido por Maria de Fátima Madeira IPEC- FIOCRUZ.	1:500

Fonte: o autor, modificado de Morgado, (2007).

Ao término deste período, foram realizadas duas lavagens, de 5 minutos cada, em PBS. A seguir, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Zymed Laboratories INC., San Francisco, CA, USA) anti-IgG de camundongo, na diluição 1:100, em temperatura ambiente, em câmara úmida, por 30 minutos. Após lavagem do material, como descrito anteriormente, foi adicionado o reagente comercial contendo streptavidina-peroxidase (kit ABC Dakocytomation). As lâminas foram incubadas como anteriormente e finalmente, foram realizadas mais 2 lavagens, por 5 minutos, em PBS. A etapa de revelação consistiu da utilização do reagente comercial (Zymed Laboratories INC.,) contendo peróxido de hidrogênio e o cromógeno *aminoethyl carbazole* (AEC). Como o tempo de revelação dependeu do tecido e anticorpo monoclonal usado, o procedimento foi acompanhado através da visualização ao microscópio óptico, com luz baixa (Zeiss, Alemanha), e a reação foi interrompida pela lavagem das lâminas em água destilada. Por último, as lâminas foram submetidas à contra-coloração, com hematoxilina de Mayer (Dako-cytomation, Dako), e cobertas com solução de montagem (Faramount, Dako-cytomation) e lamínula. A leitura das lâminas em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha) se deu pela contagem percentual das células marcadas, utilizando-se como padrão a contagem de 500 células ou 5 campos, e pela contagem por mm<sup>2</sup> de tecido com grade milimetrada posicionada logo abaixo a camada basal do epitélio na lâmina própria papilar A intensidade das marcações de NOS2 foi determinada da seguinte forma: discreto (1 sítio positivo por campo 200x), moderada (2 a 3 sítios positivos por campo), intenso (3 a 4 sítios positivos por campo) e muito intensa (5 ou mais sítios positivos por campo), e de E-selectina (CD62E) se deu pela contagem no mm<sup>2</sup> de vasos ativados e não ativados em 1 mm<sup>2</sup>. Todo o material foi fotografado para catalogação e arquivo, usando-se o sistema IMAGE-PRO.

#### 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa SPSS para Windows versão 11 (SPSS Inc.Chicago, IL, USA). Foram realizados os testes não-paramétricos de Mean-Whitney. Os dados são apresentados em distribuição com média  $\pm$  SEM. Os resultados não numéricos foram analisados em tabelas de contingência 2 X 2, através do teste exato de Fisher do programa INSTAT 2 (Graphpad Software V2-04 Graphpad Instad TM, San Diego, CA, USA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

#### 6.1.1 Lesões de LTA mucosa nasal e oral

Foram analisados 20 pacientes com lesões de LTA (Tabela 1). Dentre eles, 12 (60%) apresentavam lesões em mucosas nasais localizadas nas fossas nasais direita e/ou esquerda e septo nasal (Figura 1), e 8 (40%) apresentavam lesões em mucosas orais localizadas em palato duro, palato mole, úvula, mucosa labial, mucosa jugal e gengiva (Figura 2). Entre o grupo de pacientes com lesões nasais, 10 eram do sexo masculino (83,3%) e 2 do sexo feminino (16,7%); no grupo de pacientes com lesões orais, 5 eram do sexo masculino (62,5%) e 3 do sexo feminino (37,5%). Alguns pacientes apresentavam lesões em 1 ou mais sítios anatômicos das cavidades nasais ou orais, sendo que dois pacientes manifestavam acometimento de lesões nasais e orais, concomitantemente. A idade entre os portadores de LTA mucosa variou de 27 e 80 anos (média  $52,4 \pm 3,72$  anos) e entre os dois grupos estudados (mucosa nasal e oral) não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,847$ ). A IDRМ foi positiva em 18 casos, sendo que apenas 1 paciente de cada grupo era negativo ao teste. A área de endureção variou de 3 a 62 mm (média  $26,14 \pm 15,01$ -Tabela 2), não apresentando diferença estatística entre os dois grupos avaliados ( $p = 0,675$ ). No grupo de pacientes com lesões nasais, dois (16,7%) tinham, no momento do diagnóstico clínico, concomitância de lesões em pele e mucosa nasal, e 6 pacientes (50%) relataram ter tido história prévia de LTA, com presença de cicatrizes em tegumento. Nos pacientes do grupo de lesões orais, 2 (25%) apresentavam, no momento do diagnóstico, tanto lesões em pele quanto na mucosa, e 5 pacientes (62,5%) disseram ter tido leishmaniose no passado, e apresentando evidências clínicas de cicatriz em tegumento. Apenas 1 paciente lembrava ter recebido tratamento prévio com antimônio. O tempo referido de evolução das lesões, até o momento do diagnóstico clínico no Centro de Referência em LTA do Instituto de Pesquisas Clínicas do Hospital Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ), variou nas lesões ativas de mucosa nasal, de 3 a 96 meses (média 29 meses  $\pm 10,01$ ) e, nos pacientes com forma mucosa oral, variou de 2 a 60 meses (média 15 meses  $\pm 6,94$  - Tabela 1). Nove pacientes do grupo de lesões ativas em mucosa nasal souberam relatar o tempo

aproximadamente decorrido da cura da manifestação primária da lesão em tegumento, até a evolução para acometimento secundário em mucosa, que, segundo eles, variou de 24 a 486 meses (média 148,67 meses  $\pm$  47,54). Já no grupo com lesões orais, apenas dois pacientes souberam relatar esse tempo, que foi de 24 meses em um e, no outro, de 60 meses (média 42 meses  $\pm$  18). O diagnóstico de evidenciação dos parasitas (histopatologia, cultura e *imprint*), foi realizado em todos os pacientes. As lesões nasais foram positivas em 6 pacientes (50%), sendo que 1 paciente apresentava positividade tanto por histopatologia, *imprint* e cultura. Seis pacientes da forma oral foram positivos (75%), sendo que dois eram positivos para os três métodos de diagnóstico, e um positivo, tanto na histopatologia quanto no *imprint*. De acordo com o método empregado, a evidenciação do parasita ocorreu com a seguinte distribuição: A- lesões nasais: na histopatologia, 2 casos (16,6%); 1 caso (8,3%) por *imprint* e 5 casos (41,7%) por cultura. B- lesões orais: 6 casos (75%) foram positivos na histopatologia; 3 casos (37,5%) por *imprint* e 2 casos (25%) por cultura. Quanto aos testes sorológicos nos casos de lesão nasal, 9 pacientes foram positivos ao RIFI e 9 foram reatores ao ELISA, com coincidência de resultados positivos entre todos os pacientes nos dois métodos de diagnóstico. As titulações variaram entre 1:40 a 1:320. Três pacientes não reagiram ao teste ELISA e ao RIFI. Quanto aos pacientes com lesões em mucosa oral todos foram positivos ao RIFI e reatores ao ELISA. As titulações variaram entre 1:40 a 1:320. Nenhum paciente, tanto no grupo de mucosa nasal quanto oral apresentou reativação das lesões, durante o acompanhamento pós-tratamento, que variou de 6 meses a 3 anos, pós-cura clínica.

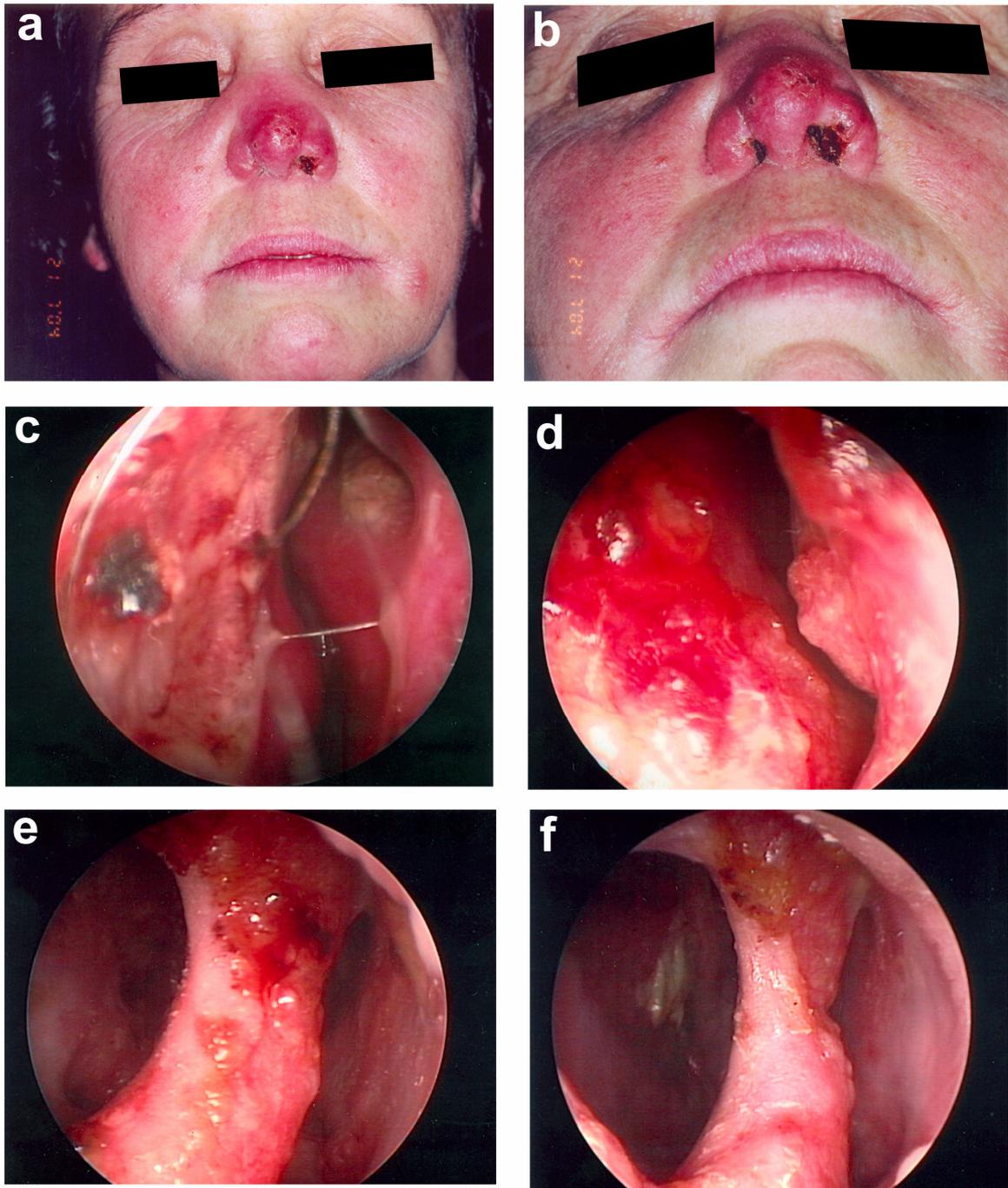
**Tabela 1 - Distribuição da casuística estudada em relação às características gerais do grupo de pacientes de LTA**

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Evo Atual (meses)	Evo Passada* (meses)	Cicatriz Pele	IDRM (mm)	Histop	<i>Imprint</i>	Cultura	ELISA	RIFI
1 Nasal	M	75	4	24	Neg	17	Neg	Neg	Neg	Pos	1:160
2 Nasal	M	29	24	60	Pos	36	Neg	Neg	Neg	Pos	1:160
3 Nasal	F	45	36	60	Neg	44	Neg	Neg	Pos	Neg	NR
4 Nasal	M	68	96	SI	Neg	15	Neg	Neg	Neg	Neg	NR
5 Nasal	M	49	SI	SI	Pos	32	Neg	Neg	Neg	Pos	1:40
6 Nasal	M	38	72	240	Pos	5	Neg	Neg	Neg	Pos	1:320
7 Nasal	M	53	6	180	Pos	32	Pos	Pos	Pos	Pos	1:80
8 Nasal	M	42	3	96	Pos	21	Neg	Neg	Pos	Pos	1:160
9 Nasal	M	80	30	96	Neg	15	Neg	Neg	Pos	Pos	1:40
10 Nasal	M	54	SI	486	Neg	28	Neg	Neg	Neg	Neg	NR
11 Nasal	M	69	12	SI	Neg	62	Pos	Neg	Neg	Pos	1:40
12 Nasal	M	34	7	96	Pos	20	Neg	Neg	Pos	Pos	1:80
13 Oral	M	75	4	24	Neg	17	Pos	Neg	Neg	Pos	1:160
14 Oral	M	29	24	60	Pos	36	Pos	Neg	Neg	Pos	1:160
15 Oral	M	75	18	SI	Pos	35	Pos	Neg	Neg	Pos	1:320
16 Oral	M	53	2	SI	Pos	48	Pos	Pos	Pos	Pos	1:160
17 Oral	F	50	4	SI	Neg	17	Neg	Neg	Neg	Pos	1:40
18 Oral	F	52	8	SI	Neg	17	Neg	Neg	Neg	Pos	1:160
19 Oral	F	73	60	SI	Pos	41	Pos	Pos	Neg	Pos	1:80
20 Oral	M	27	4	SI	Pos	3	Pos	Pos	Pos	Pos	1:160

SI-Sem informação; NR-Não reator; M-masculino; F- feminino; Evo-Evolução; Pos-positivo; Neg- negativo; Histop-histopatologia.

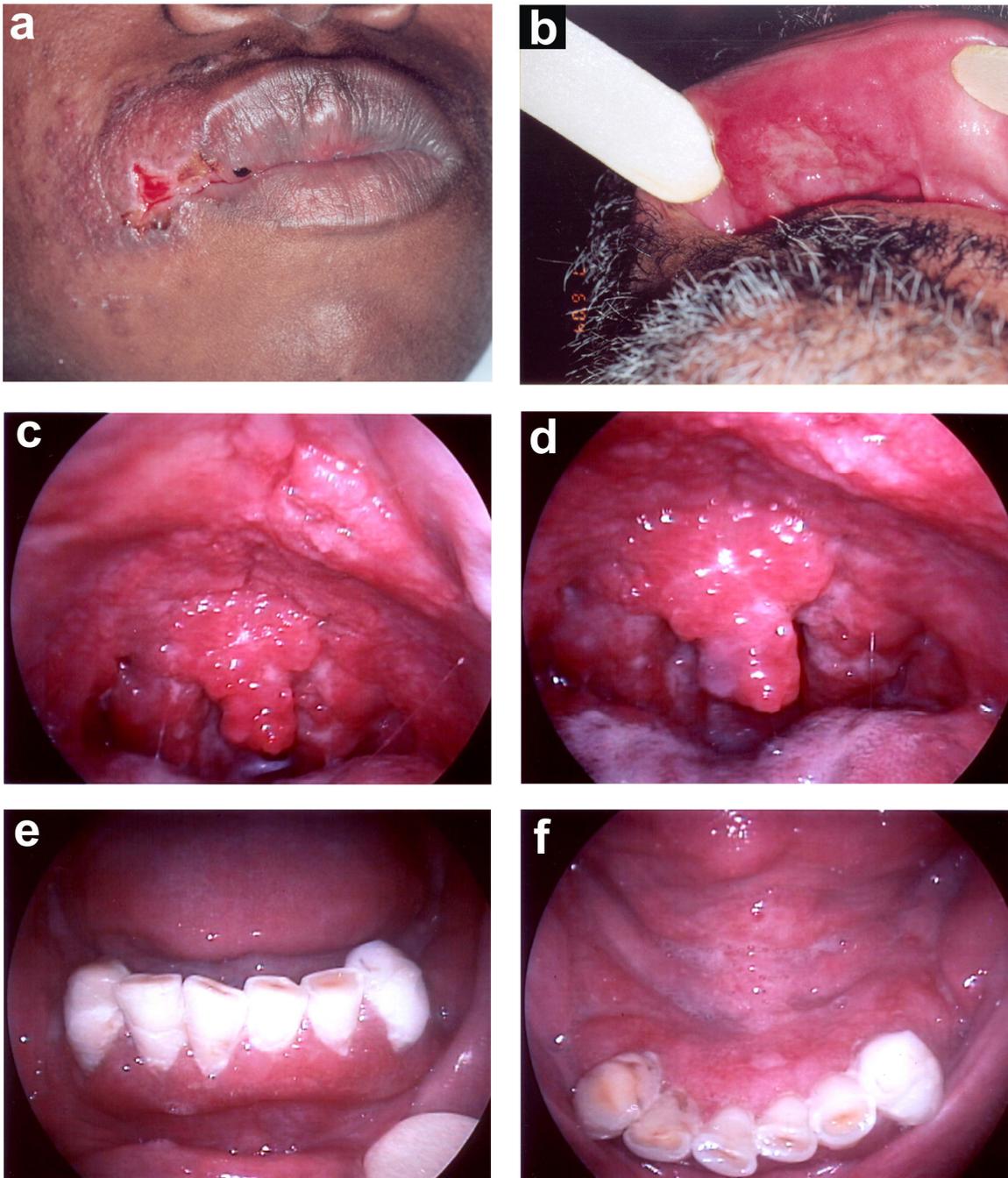
\*Estimado/relatado pelo paciente.

Fonte: o autor, (2008).



**Figura 1 - Aspecto macroscópico das lesões nasais de LTA:** (a, b) lesão eritematosa, com presença de micro ulcerações, edema e crostas em nariz, (c) presença de rugosidades, ulcerações e crosta em fossa nasal esquerda, (d) lesão ulcerada, infiltrada com presença de crostas em fossa nasal esquerda, (e, f) perfuração septal anterior com presença de ulcerações e crostas.

Fonte: CrLeish-IPEC-FIOCRUZ (Dr. Armando O. Schubach e Dra. Claudia M. V. Rosalino), (2007).



**Figura 2 - Aspecto macroscópico das lesões orais de LTA:** (a) lesão ulcerada, com aspecto infiltrado em pele se estendendo para comissura labial direita, (b) lesão ulcerada em mucosa labial superior lado direito, (c) lesão com aspecto granulomatoso envolvendo palatos duro e mole e úvula, (d) lesão de aspecto granulomatoso envolvendo úvula, (e) lesões ulceradas em gengiva na região compreendida do 33 a 43 por vestibular, (f) lesões ulceradas em gengiva na região compreendida do 33 a 43 por lingual e em soalho bucal.

Fonte: CrLeish-IPEC-FIOCRUZ (Dr. Armando O. Schubach e Dra. Claudia M. V. Rosalino), (2007).

### 6.1.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias

Foram analisadas 20 amostras de mucosas sadias (Tabela 2). Dentre elas, 10 (50%) eram provenientes de pacientes que realizaram cirurgia de septo nasal e/ou turbinectomia, e 10 (50%) oriundas da mucosa oral de cirurgia em mucosa labial, freio labial ou mucosa gengival, esta última provenientes de extração de terceiros molares inclusos. Entre o grupo de amostras com mucosa nasal clinicamente sadia, 6 eram do sexo masculino (60%) e 4 do sexo feminino (40%); e no grupo de amostras com mucosa oral clinicamente sadia, 5 eram do sexo masculino (50%) e 5 do sexo feminino (50%). A idade entre os controles de mucosa nasal clinicamente sadios variou de 14 a 56 anos (média  $35,9 \pm 15,22$  anos), a idade entre os controles de mucosa oral clinicamente sadios variou de 9 e 37 anos (média  $22,8 \pm 7,80$  anos). Entre os dois grupos controle estudados (mucosa nasal e oral), não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,112$ ). No momento da obtenção do espécime para estudo nenhum dos pacientes apresentava alterações de saúde que impedisse o procedimento e, conseqüentemente a realização do estudo.

**Tabela 2 - Distribuição da casuística estudada em relação às características gerais do grupo de mucosas clinicamente sadias**

<i>Pacientes</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Local</i>
1 Nasal	F	31	Mucosa do septo nasal
2 Nasal	M	16	Mucosa da concha nasal inferior
3 Nasal	F	54	Mucosa da concha nasal inferior
4 Nasal	M	46	Mucosa da concha nasal inferior
5 Nasal	F	14	Mucosa da concha nasal inferior
6 Nasal	F	17	Mucosa da concha nasal inferior
7 Nasal	F	34	Mucosa da concha nasal média
8 Nasal	M	56	Mucosa da concha nasal inferior
9 Nasal	M	50	Mucosa da concha nasal inferior
10 Nasal	M	41	Mucosa da concha nasal inferior
11 Oral	F	31	Mucosa labial
12 Oral	M	37	Mucosa gengival
13 Oral	F	9	Mucosa do freio labial
14 Oral	M	22	Mucosa gengival
15 Oral	M	20	Mucosa gengival
16 Oral	M	30	Mucosa gengival
17 Oral	F	17	Mucosa gengival
18 Oral	F	26	Mucosa gengival
19 Oral	F	18	Mucosa gengival
<b>20 Oral</b>	M	18	Mucosa gengival

F- feminino M- masculino. Fonte: o autor, (2008).

## 6.2 HISTOPATOLOGIA

### 6.2.1 Lesões de LTA mucosa nasal e oral

O estudo histológico das lesões em atividade foi realizado nas 20 amostras de lesões ativas de LTA (mucosa nasal e oral) (Quadros 2 e 3). No exame microscópico, constatou-se presença de infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares. O infiltrado inflamatório mostrou-se intenso em 14 casos, sendo 9 de mucosa nasal e 5 de mucosa oral; discreto a moderado, em 6 (3 nasais e 3 orais). Quanto à formação de granulomas, 9 pacientes apresentaram formação de esboços de granulomas (5 nasais e 4 orais), 8 apresentavam granulomas bem formados (5 nasais e 3 orais) e apenas 3 pacientes, sendo 2 de mucosa nasal e 1 de mucosa oral, respectivamente, apresentavam infiltrado inflamatório difuso e multifocal. Assim sendo, houve a predominância de lesões com formação de granulomas, notadamente nas lesões orais onde o percentual de casos foi de 87,5% do total. Já nas lesões nasais a formação de granulomas estava presente em 41,7% dos casos. No epitélio observou-se presença de hiperplasia escamosa em 6 casos (2 nasais e 4 orais), e hiperplasia pseudoepiteliomatosa em outros 6 casos (2 nasal e 4 oral). Seis biópsias não puderam ser avaliadas pois apresentavam ausência de epitélio. Doze pacientes apresentavam ulceração (9 nasais e 3 orais). Em outros 8 pacientes (3 nasais e 5 orais) não se verificou a presença de ulceração no fragmento estudado.

**Quadro 2 - Resultados da histopatologia das lesões de LTA em mucosa nasal**

	<i>Infiltrado inflamatório</i>		
Nº Pacientes	Discreto 1	Moderado 2	Intenso 9
	<i>Organização do infiltrado inflamatório</i>		
	Difuso 2	Granulomas mal formados 5	Granulomas bem formados 5
	<i>Reações epitélio</i>		
Nº Pacientes	Ausente 8	Hiperplasia Escamosa 2	Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa 2
	<i>Ulceração</i>		
Nº Pacientes	Ausente 3		Presente 9

Fonte: o autor, (2008).

**Quadro 3 - Resultados da histopatologia das lesões de LTA em mucosa oral**

	<i>Infiltrado inflamatório</i>		
Nº Pacientes	Discreto 1	Moderado 2	Intenso 5
	<i>Organização do infiltrado inflamatório</i>		
	Difuso 1	Granulomas mal formados 4	Granulomas bem formados 3
	<i>Reações epitélio</i>		
Nº Pacientes	Ausente 0	Hiperplasia Escamosa 4	Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa 4
	<i>Ulceração</i>		
Nº Pacientes	Ausente 5		Presente 3

Fonte: o autor, (2008).

### 6.2.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias

O estudo histológico das mucosas nasais e orais clinicamente sadias foi realizado nas 20 amostras (Quadros 4 e 5). Dentre elas, apenas 3 de mucosa oral apresentavam infiltrado inflamatório discreto e difuso na lâmina própria. Esses casos eram provenientes de extração de terceiros molares inclusos. Em nenhum dos casos de biópsia clinicamente sadia examinado foi verificado a presença de formação de granuloma em qualquer grau. Da mesma forma não havia sinais de ulceração ou alterações importantes no epitélio. Pode-se observar a presença de hiperplasia escamosa de 2 pacientes na mucosa oral.

**Quadro 4 - Resultados da histopatologia das mucosas nasais clinicamente sadias**

	<i>Infiltrado inflamatório</i>			
Nº Pacientes	Ausente 10	Discreto 0	Moderado 0	Intenso 0
	<i>Organização do infiltrado inflamatório</i>			
	Ausente 10	Difuso 0	Granulomas mal formados 0	Granulomas bem formados 0
	<i>Reações epitélio</i>			
Nº Pacientes	Ausente 10	Hiperplasia Escamosa 0	Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa 0	
	<i>Ulceração</i>			
Nº Pacientes	Ausente 10		Presente 0	

Fonte: o autor, (2008).

**Quadro 5 - Resultados da histopatologia das mucosas orais clinicamente sadias**

	<i>Infiltrado inflamatório</i>			
	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso
Nº Pacientes	7	3	0	0
	<i>Organização do infiltrado inflamatório</i>			
	Ausente	Difuso	Granulomas mal formados	Granulomas bem formados
	7	3	0	0
	<i>Reações epitélio</i>			
	Ausente	Hiperplasia Escamosa	Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa	
Nº Pacientes	8	2	0	
	<i>Ulceração</i>			
Nº Pacientes	Ausente		Presente	
	10		0	

Fonte: o autor, (2008).

### 6.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA – LESÕES DE LTA E TECIDO CLINICAMENTE SADIO EM MUCOSA NASAL E ORAL

#### 6.3.1 Lesões de LTA em mucosa nasal e oral

##### 6.3.1.1 Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Quadro 6 e Gráfico 1)

As células CD68<sup>+</sup> (macrófagos) foram evidenciadas tanto em epitélio como em lâmina própria nos dois tipos de mucosa. Na lâmina própria, eram muito frequentes e apresentavam distribuição homogênea, difusa e intensa por todo o infiltrado inflamatório. Observaram-se também células positivas próximas e/ou justapostas ao endotélio dos vasos, bem como em torno de ductos glandulares. Na mucosa nasal, o percentual de macrófagos variou de 21,4 a 47

(média  $\pm$  SEM 34,4  $\pm$  2,07%), e a quantidade de células CD68<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> variou de 160 a 1000 (média  $\pm$  SEM 351,16  $\pm$  66,71) (Figura 3d). Já na mucosa oral, o percentual de células CD68<sup>+</sup> variou de 26,8 a 41,26% (média  $\pm$  SEM 33,33  $\pm$  1,67%), e a quantidade de células/mm<sup>2</sup> variou de 218 a 630 (média  $\pm$  SEM 382,12  $\pm$  44,66) (Figura 5d, 6c). Não houve diferença significativa quando comparados os dados obtidos em lesões ativas em mucosa nasal e oral, tanto para o percentual de células CD68<sup>+</sup> (p = 0,217), quanto para a distribuição de células CD68<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,671).

A população de células CD3 (linfócitos T total) era a mais freqüente no infiltrado inflamatório e a distribuição de células CD3<sup>+</sup> podia ser encontrada tanto no epitélio como na lâmina própria dos dois tipos de mucosa. Na lâmina própria, ocorria de forma difusa e intensa. Essas células eram ainda observadas no interior de vasos e/ou justapostas ao endotélio e próximas à região de glândulas. Na mucosa nasal, o percentual de células CD3<sup>+</sup> variou de 31,25 a 54,4% (média  $\pm$  SEM 45,36  $\pm$  2,41%), e a quantidade de células/mm<sup>2</sup> variou de 244 a 1300 (média  $\pm$  SEM 767,16  $\pm$  106,56) (Figura 3a). Na mucosa oral, o percentual de CD3<sup>+</sup> variou de 37,5 a 55% (média  $\pm$  SEM 49,49  $\pm$  2,13%), e a quantidade de células/mm<sup>2</sup> variou de 390 a 1000 (média  $\pm$  SEM 677,62  $\pm$  78,28) (Figuras 5a, 6a, 7a). Não houve diferença significativa entre as duas mucosas analisadas, tanto na contagem percentual sobre as células totais (p = 0,19), quanto em relação à distribuição por mm<sup>2</sup> (p = 0,562).

A distribuição das células CD4<sup>+</sup> (subpopulação de linfócitos T com fenótipo auxiliar) ocorria de forma homogênea por toda a lâmina própria das duas mucosas estudadas. Ainda estavam presentes no epitélio, próximas aos vasos e ductos glandulares. Na mucosa nasal, o percentual de células CD4<sup>+</sup> variou de 14 a 43% (média  $\pm$  SEM 33,04  $\pm$  2,44%), e a quantidade de CD4<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 103 a 900 (média 497,24  $\pm$  72,41) (Figura 3b). Já na mucosa oral, o percentual variou de 28 a 37% (média 32,20  $\pm$  1,06%), e a quantidade de células/mm<sup>2</sup> variou de 304 a 664 (média  $\pm$  SEM 483,75  $\pm$  48,77) (Figura 5b). Não foram observadas diferenças significativas quando comparados o percentual de CD4<sup>+</sup> (p = 0,512) e a quantidade de CD4<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,817) em mucosa oral e nasal.

As células CD8<sup>+</sup> (subpopulação de linfócitos T com fenótipo citotóxico) eram observadas em lâmina própria, distribuídas de forma homogênea tanto na mucosa oral quanto nasal. Embora não tenha sido observada diferença significativa, as células CD8<sup>+</sup> apresentavam distribuição menos intensa e difusa do que as células CD4<sup>+</sup>. Assim como as

células CD4<sup>+</sup>, as células CD8<sup>+</sup> apresentavam-se no epitélio e também próximas à região de vasos e ductos glandulares. Na mucosa nasal, o percentual de células CD8<sup>+</sup> variou de 19,2 a 36,6% (média  $\pm$  SEM 26,93  $\pm$  1,34%), e a distribuição por mm<sup>2</sup> de tecido variou de 112 a 849 (média  $\pm$  SEM 452,6  $\pm$  67,9) (Figura 3c). Na mucosa oral, o percentual de células CD8<sup>+</sup> variou de 12 a 30% (média  $\pm$  SEM 24,74  $\pm$  2,16%), e a quantidade de CD8<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> variou de 151 a 540 (média  $\pm$  SEM 364,25  $\pm$  52,14) (Figura 5c, 7b). Não foi observada diferença significativa quando comparados os dois grupos, tanto para percentual de CD8<sup>+</sup> (p = 0,817), quanto para CD8<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,51). A razão CD4/CD8 variou de 0,53 a 1,160 (média  $\pm$  SEM 1,23  $\pm$  0,08) na mucosa nasal, e de 0,93 a 1,89 (média  $\pm$  SEM 1,33  $\pm$  0,11) na mucosa oral. Não houve diferença significativa entre as razões CD4/CD8 (p = 0,757), quando comparados os dois grupos.

O padrão de distribuição de células B CD22<sup>+</sup> era heterogêneo, formando grupos de células positivas, em meio ao infiltrado inflamatório, na lâmina própria das duas mucosas. Na mucosa nasal, o percentual de linfócitos B CD22<sup>+</sup> variou de 7 a 21% (média  $\pm$  SEM 14,8  $\pm$  1,25%), e a quantidade de CD22<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 16 a 207 (média  $\pm$  SEM 93,16  $\pm$  15,22) (Figura 4e). Na mucosa oral, o percentual de células B variou de 7,6 a 20% (média  $\pm$  SEM 12,42  $\pm$  1,99). A quantidade de CD22<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 3 a 151 (média 84,71  $\pm$  18,4) (Figura 6b). Não foram observadas diferenças significativas quando comparados o percentual de CD22<sup>+</sup> (p = 0,217) e a quantidade CD22<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,833), em mucosa oral e nasal.

Nos dois tipos de mucosa, os neutrófilos apresentavam uma distribuição heterogênea no infiltrado inflamatório presente em lâmina própria, concentrando-se em áreas de necrose e em meio a depósitos fibrinóides. Nas demais áreas, os neutrófilos apresentavam-se isolados em meio ao infiltrado, e algumas vezes apenas no interior dos vasos. Na mucosa nasal, o percentual de neutrófilos variou de 4,6 a 37,6% (média  $\pm$  SEM 14,03  $\pm$  2,92%), e a quantidade de neutrófilos/mm<sup>2</sup> variou de 30 a 580 (média  $\pm$  SEM 18,79  $\pm$  4,03) (Figuras 3e, 4c). Já na mucosa oral, a porcentagem variou de 3,8 a 37,6% (média  $\pm$  SEM 18,79  $\pm$  4,03%), e a quantidade de neutrófilos/mm<sup>2</sup> variou de 34 a 430 (média  $\pm$  SEM 190,12  $\pm$  43,73) (Figuras 5e, 6d, 7c). Não foram evidenciadas diferenças significativas quando comparados o percentual (p = 0,263) e a quantidade de neutrófilos/mm<sup>2</sup> (p = 0,563), em mucosas nasal e oral.

### 6.3.1.2 Perfil quantitativo e qualitativo de células de Langerhans (Quadro 6 e Figura 5f)

Tanto na mucosa oral quanto nasal as células de Langerhans CD1a<sup>+</sup> estavam presentes tanto no epitélio, como na lâmina própria, porém em menor quantidade nesta última, onde apresentavam-se isoladas em meio ao infiltrado inflamatório. No epitélio, apresentavam-se lado a lado, formando uma rede com suas projeções. Em algumas lesões, foi possível visualizar, também, células positivas entre as células endoteliais e no interior dos vasos. No epitélio de mucosa nasal, a quantidade de células por mm<sup>2</sup> variou de 7 a 84 (média  $\pm$  SEM 26,83  $\pm$  8,3) e na lâmina própria variou de 1 a 12 (média  $\pm$  SEM 5,3  $\pm$  1,3); na mucosa oral, variou de 9 a 82 (média  $\pm$  SEM 32,14  $\pm$  12,70), e na lâmina própria variou de 2 a 11 (média  $\pm$  SEM 5,8  $\pm$  1,59). Não houve diferença significativa, quando se comparou a quantidade de células CD1a<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> tanto no epitélio (p = 0,865), quanto na lâmina própria (p = 0,865) nas duas mucosas estudadas.

### 6.3.1.3 Marcadores de inflamação (Quadros 6 e 7, Figuras 3,4,5,6,7 e Gráfico 1)

As células CLA<sup>+</sup> (marcador para linfócitos cutâneos) (Figura 5g) apresentavam distribuição heterogênea pelo infiltrado inflamatório presente na lâmina própria dos dois tipos de mucosa. A marcação era mais intensa na lâmina própria papilar, comparada à reticular. No entanto, pôde-se freqüentemente observar células CLA<sup>+</sup> próximas ou na luz de vasos, e próximas aos ductos glandulares. O percentual de células CLA<sup>+</sup> na mucosa nasal variou de 12 a 52,8% (média  $\pm$  SEM 28,41  $\pm$  3,6%), e a quantidade de células CLA<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 90 a 552 (média  $\pm$  SEM 283,91  $\pm$  41,99). Na mucosa oral, o percentual variou de 16 a 37,2% (média  $\pm$  SEM 25,54  $\pm$  2,64), e no mm<sup>2</sup> variou de 86 a 390 (média  $\pm$  SEM 232,71  $\pm$  42,53). Não houve diferença significativa entre os percentuais (p = 0,642) e a quantidade de células CLA<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>, (p = 0,398) obtidos em mucosa nasal e oral.

Tanto na mucosa oral quanto na nasal, as células Ki67<sup>+</sup> (marcador de proliferação celular) (Quadro 6 e gráfico 1) estavam distribuídas de forma homogênea por todo o infiltrado

inflamatório na lâmina própria. A membrana basal demonstrou-se positiva em todas as lesões que apresentavam epitélio. Na mucosa nasal, foram encontradas 5,2 a 18% (média  $\pm$  SEM 9,6  $\pm$  1,85%) de células Ki67<sup>+</sup>, e a quantidade de células Ki67<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 12 a 230 (média  $\pm$  SEM 84,33  $\pm$  17,55) (Figuras 3f, 4a). Na mucosa oral, essas células variaram de 9 a 20% (média  $\pm$  SEM 14,62  $\pm$  1,76%), e a quantidade de células Ki67<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> variou de 39 a 115 (média  $\pm$  SEM 74,42  $\pm$  11,25) (Figuras 5h, 6e). Foi observada diferença significativa quando se comparou o percentual de células Ki67<sup>+</sup> (p = 0,038) em mucosas nasal e oral, estando esse marcador mais presente na mucosa oral. Entretanto, quando se comparou a quantidade de células Ki67<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido, não houve diferença significativa (p = 0,398).

Foi possível detectar a presença de NOS2 (enzima óxido nítrico sintase induzida tipo 2) (Quadro 7 e Figura 7d) em todas as lesões, com intensidade e distribuição variáveis, desde pequenos grupos de células (discretos), até distribuição difusa abrangendo todo ou grande parte do tecido (muito intenso). Apesar de tendência a ocorrência de dispersão de NOS2 na mucosa nasal em relação à mucosa oral, cujo maior grupo situava-se no grau moderado de detecção. Não houve diferença significativa quando se comparou a expressão da enzima NOS2 entre as lesões nasais e orais, quanto à presença ou ausência de alta ou baixa expressão (p = 0,77).

As células endoteliais expressando E-Selectina (CD62E) foram observadas em todas as lesões estudadas (Quadro 7). Em alguns campos, foi possível observar vasos ativados e não ativados em proximidade. Não se observou diferença significativa de CD62E, quando comparadas às lesões orais e nasais (p = 0,71) (Figuras 4f e 7f).

As células Bcl-2<sup>+</sup> (marcador de supressão de apoptose para molécula ligada à resistência à morte celular) apresentavam distribuição heterogênea, concentrando-se em áreas próximas à lâmina própria papilar nas duas mucosas estudadas (Quadro 6 e Gráfico 1). Constatou-se também a presença de células positivas em torno de vasos e próximas à região de ductos glandulares. Na mucosa nasal, o percentual de células Bcl-2<sup>+</sup> variou de 16 a 47,4 % (média  $\pm$  SEM 34,39  $\pm$  3,25%), e a quantidade de células Bcl-2<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 107 a 720 (média  $\pm$  SEM 395,41  $\pm$  58,82) (Figura 4b). Já na mucosa oral, variou de 23,3 a 49,28% (média  $\pm$  SEM 33,04  $\pm$  3,57%), e no mm<sup>2</sup> 141 a 580 (média  $\pm$  SEM 345,82  $\pm$  59) (Figura 7e). Não houve diferença significativa, comparando-se o percentual (p = 0,673) e a quantidade de células Bcl-2<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,672) entre os dois grupos.

As células expressando o ligante para Fas (FasL<sup>+</sup>) (Quadro 6 e Gráfico 1) apresentavam distribuição heterogênea no infiltrado inflamatório, formando pequenos agrupamentos. As células positivas eram ainda observadas próximas à região de vasos e ductos glandulares. O percentual de FasL<sup>+</sup> variou de 5,6 a 31,8% (média  $\pm$  SEM 14,28  $\pm$  2,08%), e a quantidade de células FasL<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou 70 a 325 (média  $\pm$  SEM 165,33  $\pm$  84,18), em mucosa nasal (Figura 4d). Na mucosa oral, o percentual FasL<sup>+</sup> variou de 4,8 a 30,6 (média  $\pm$  SEM 22,05  $\pm$  3,65%), e FasL<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> variou de 52 a 235 (média  $\pm$  SEM 164  $\pm$  26,82) (Figura 5j). Não foi evidenciada diferença significativa, quando comparados o percentual de FasL (p = 0,91) e a quantidade de FasL<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,735), entre os dois grupos estudados.

As células Fas<sup>+</sup> (Quadro 6 e Gráfico 1) apresentavam distribuição homogênea pelo infiltrado inflamatório nos dois tipos de mucosa. Foi possível também observar células Fas<sup>+</sup> em endotélio de vasos e próximas a eles. Além disso, pôde-se observar células Fas<sup>+</sup> em região de glândulas. Na mucosa nasal, o percentual de células Fas<sup>+</sup> variou de 14 a 47,9% (média  $\pm$  SEM 28,26  $\pm$  2,67%), e a quantidade de Fas<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 12 a 442 (média  $\pm$  SEM 235,51  $\pm$  38,55). Na mucosa oral, o percentual variou de 26,6 a 49% (média  $\pm$  SEM 33,68  $\pm$  2,89) e a quantidade de Fas<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> variou de 88 a 367 (média  $\pm$  SEM 239,85  $\pm$  33,98) (Figuras 5i, 6f). Não foi verificada diferença significativa, quando comparado o percentual de Fas<sup>+</sup> (p = 0,222) e a quantidade de Fas<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido (p = 0,966), entre os dois grupos analisados.

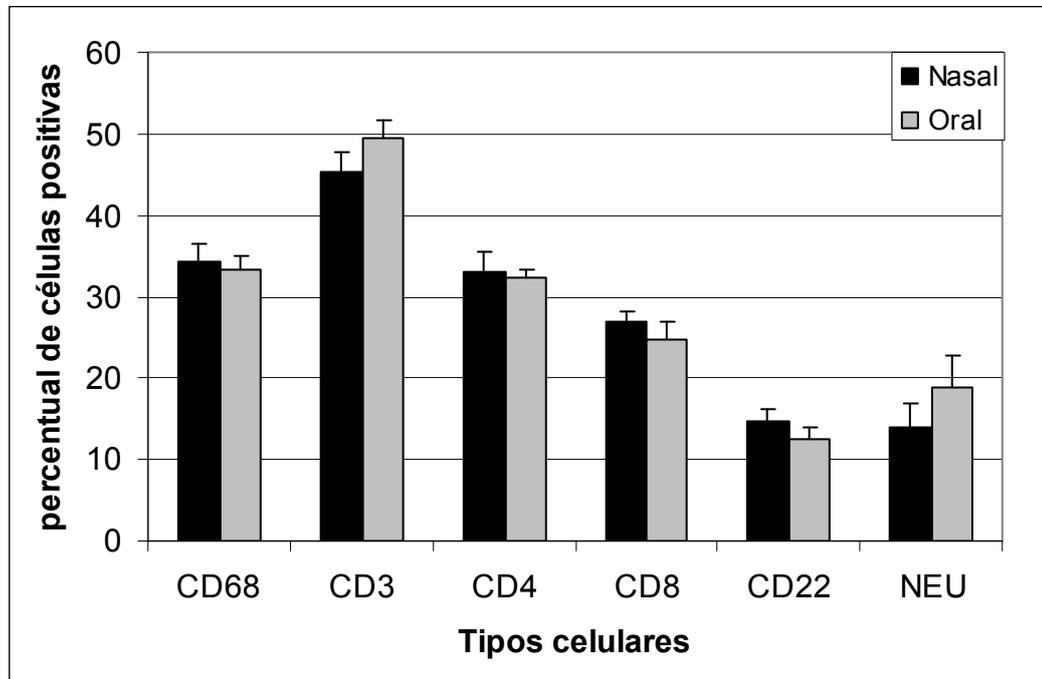
**Quadro 6 – Lesão de LTA em mucosa nasal e oral: Contagem percentual e/ou por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados**

<b>Marcadores Celulares</b>	<b>Mucosa Nasal</b>	<b>Mucosa Oral</b>	<b>P</b>
<b>CD3 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	45,36 ± 2,41 (767,16 ± 106,56)	49,46 ± 2,13 (677,62 ± 78,28)	(p = 0,19) (p = 0,52)
<b>CD4 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	33,04 ± 2,44 (497,25 ± 72,41)	32,26 ± 1,07 (483,75 ± 48,77)	(p = 0,512) (p = 0,817)
<b>CD8 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	26,93 ± 1,34 (452,16 ± 67,90)	24,74 ± 2,16 (364,25 ± 52,14)	(p = 0,817) (p = 0,537)
<b>CD4/CD8</b>	1,23 ± 0,08	1,33 ± 0,11	(p = 0,757)
<b>CD22 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	14,80 ± 1,25 (93,16 ± 15,62)	12,42 ± 1,59 (84,71 ± 18,47)	(p = 0,271) (p = 0,833)
<b>CD68 (%)</b> Cels/mm <sup>2</sup> )	34,40 ± 2,07 (351,16 ± 66,71)	33,33 ± 1,67 (382,12 ± 44,06)	(p = 0,671) (p = 0,217)
<b>Neutrófilos (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	14,03 ± 2,92 (173,16 ± 44,52)	18,79 ± 4,03 (190,12 ± 43,73)	(p = 0,623) (p = 0,563)
<b>CD1a (Cels/EPmm<sup>2</sup>)</b> (Cels/LPmm <sup>2</sup> )	(26,33 ± 8,3) (5,3 ± 1,3)	(32,14 ± 12,79) (5,8 ± 1,59)	(p = 0,865) (p = 0,865)
<b>CL (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	28,41 ± 3,6 (283,91 ± 41,99)	25,54 ± 2,64 (232,71 ± 42,53)	(p = 0,642) (p = 0,398)
<b>Ki67 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	9,60 ± 1,15 (94,33 ± 17,55)	14,62 ± 1,76 (74,42 ± 11,15)	(p = 0,038) (p = 0,398)
<b>BCI-2 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	34,39 ± 3,25 (395,41 ± 58,62)	33,04 ± 3,57 (345,85 ± 59)	(p = 0,673) (p = 0,672)
<b>Fas (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	28,14 ± 2,67 (235,91 ± 38,52)	33,66 ± 2,89 (239,85 ± 33,98)	(p = 0,222) (p = 0,966)
<b>FasL (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	14,28 ± 2,08 (165,33 ± 84,28)	22,05 ± 3,56 (164 ± 26,82)	(p = 0,91) (p = 0,735)

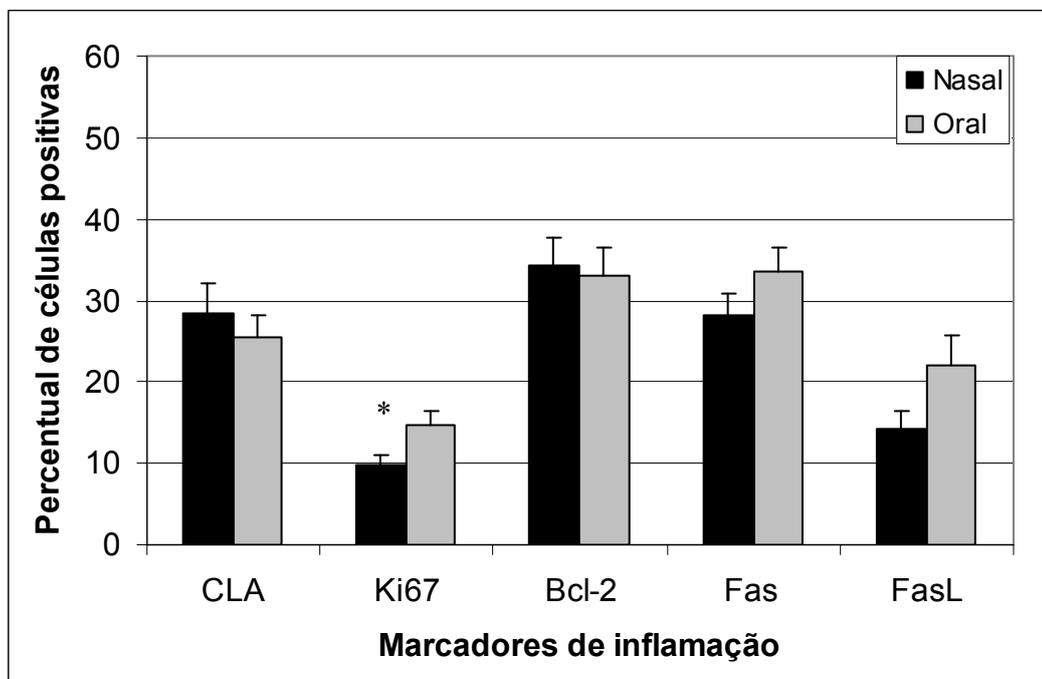
Ep. Epitélio; Lp. Lâmina própria expressos por média ± desvio mínimo valores.

Fonte: o autor, (2008).

**Gráfico 1 - Distribuição comparativa dos percentuais entre as células componentes do infiltrado inflamatório presente nas lesões orais e nasais de LTA**



\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 6)



\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 6)

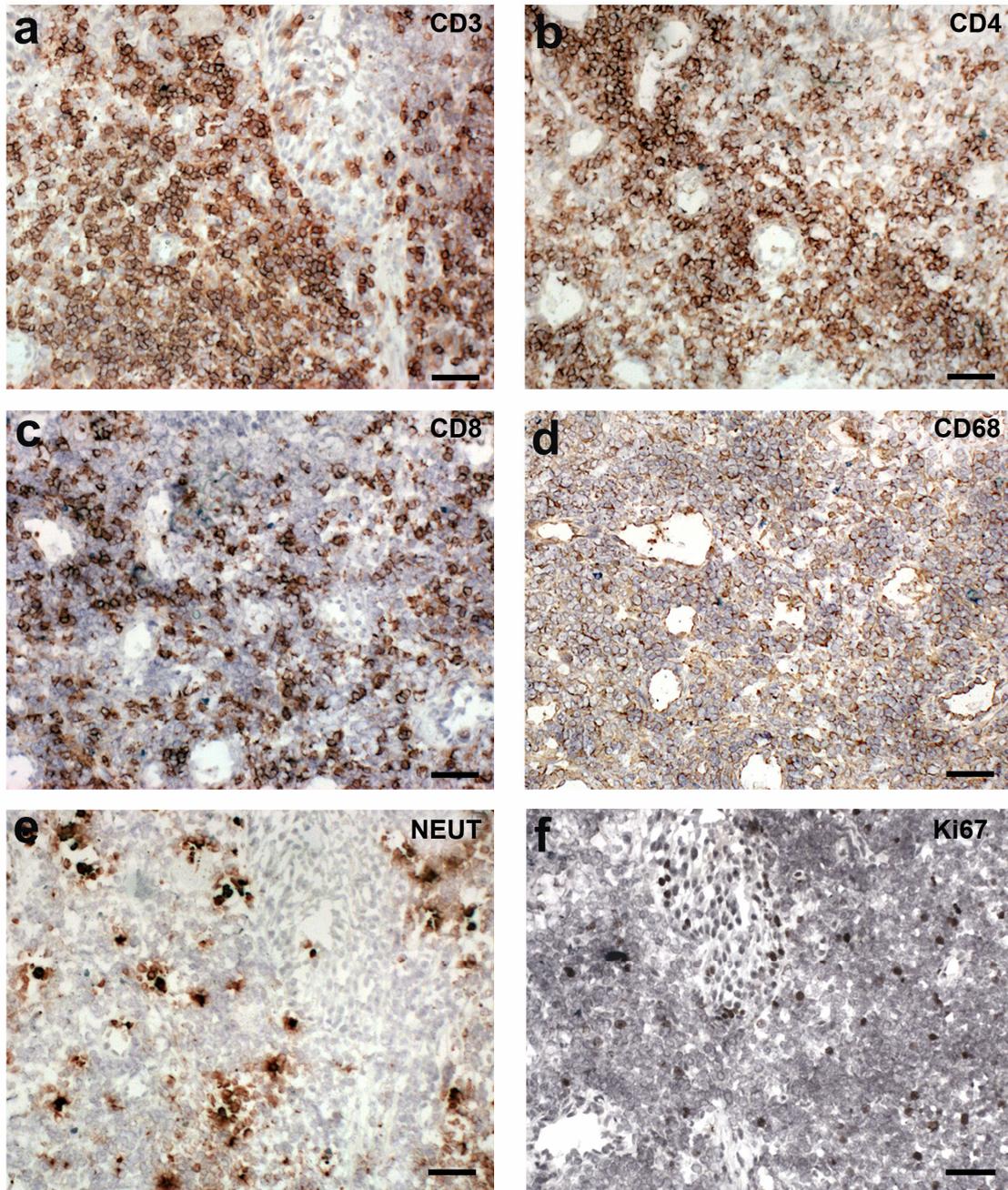
Fonte: o autor, (2008).

**Quadro 7 - Intensidade de NOS2 e E-selectina detectadas nas lesões de LTA em mucosa nasal e oral**

Localização		Distribuição dos casos de acordo com a intensidade +/4			
		Discreto (+/4)	Moderado (++/4)	Intenso (+++/4)	Muito Intenso (++++/4)
NOS2	Nasal	4	3	3	2
	Oral	1	5	1	0
E-selectina	Nasal	0	5	3	4
	Oral	0	3	3	1

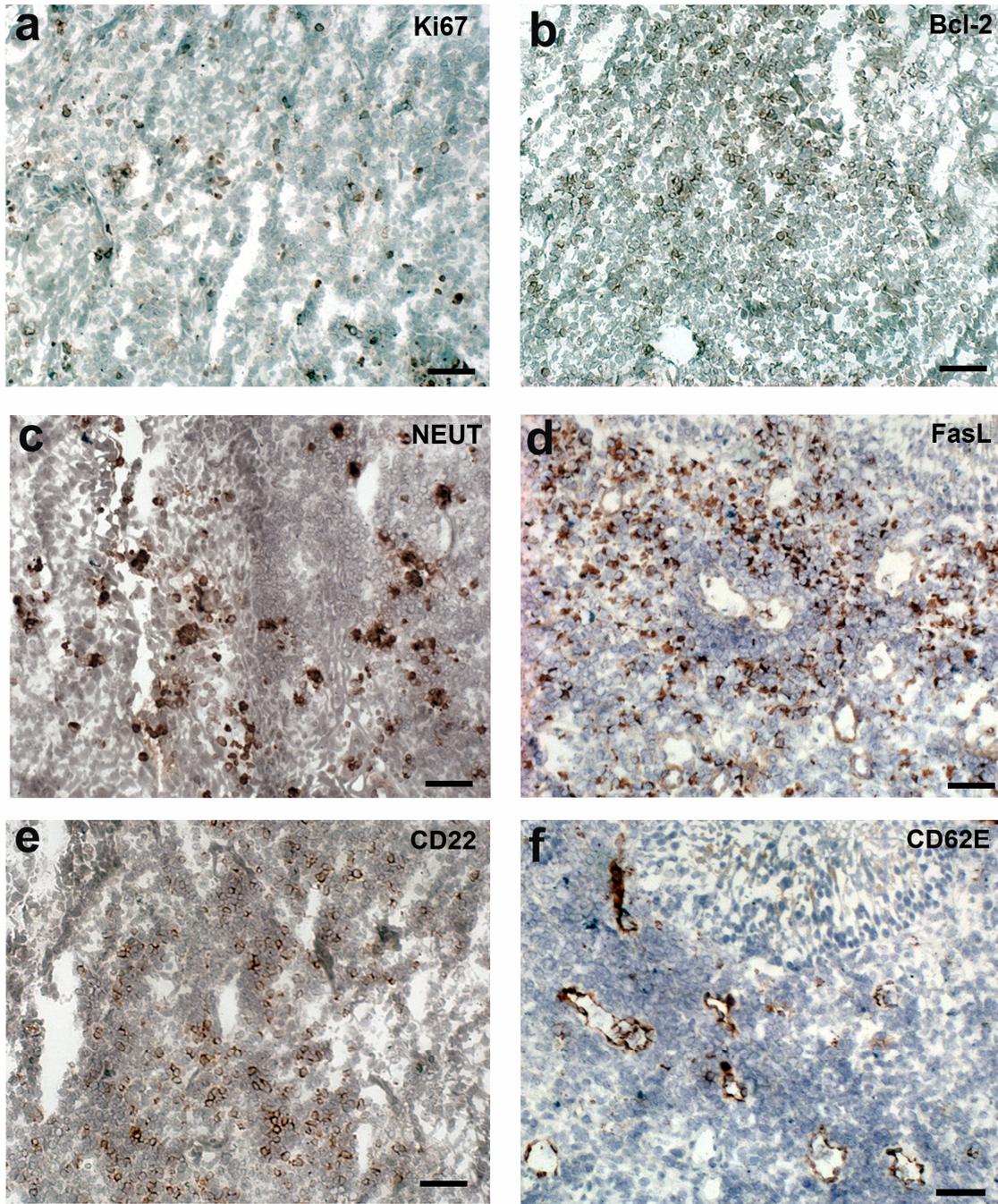
NOS2- oxido nítrico sintase tipo 2.

Fonte: o autor, (2008).



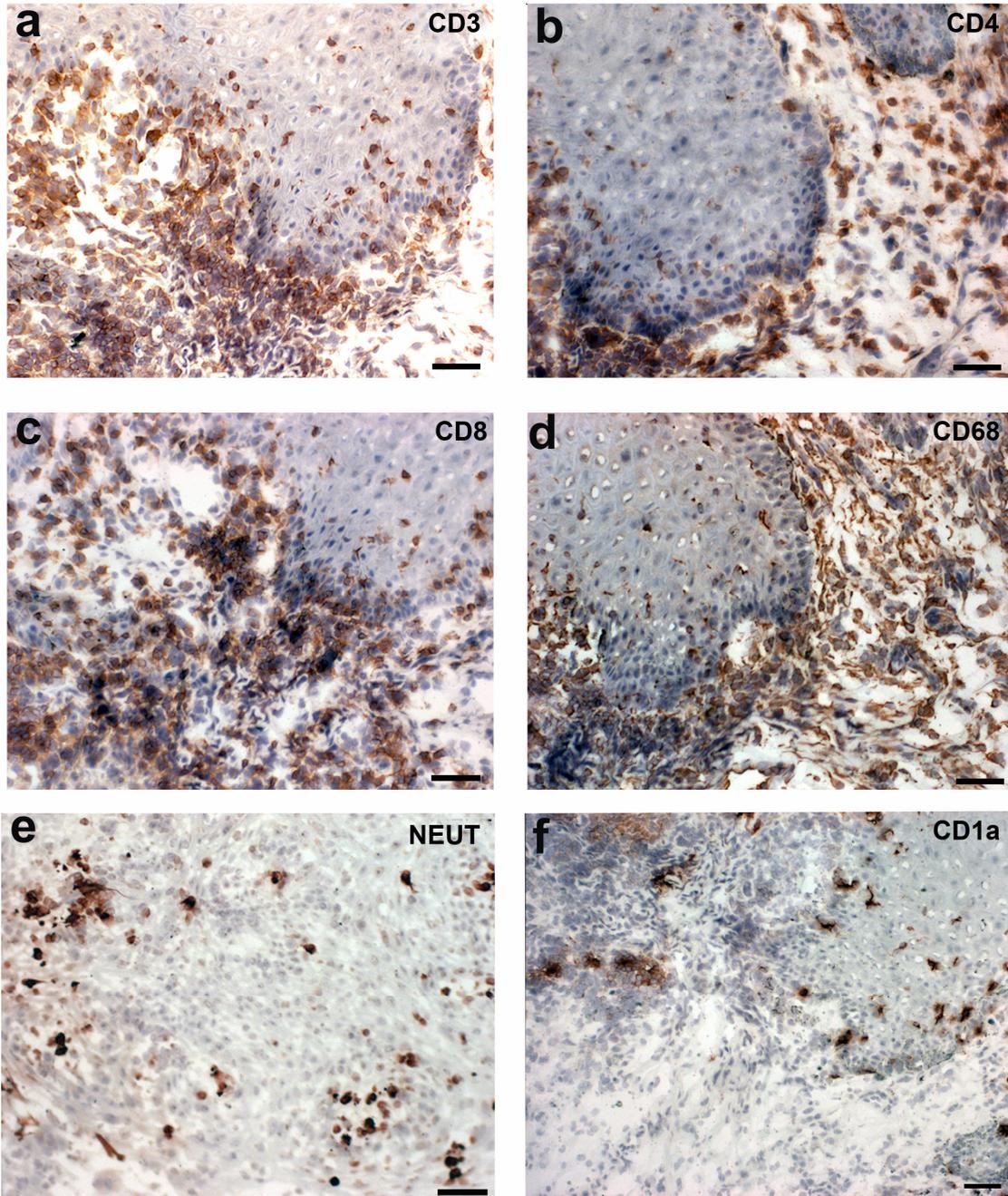
**Figura 3 - Mucosa nasal LTA:** (a) células T CD3<sup>+</sup>; (b) células T CD4<sup>+</sup>, (c) células T CD8<sup>+</sup>, (d) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (e) neutrófilos, (f) células Ki67<sup>+</sup>. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



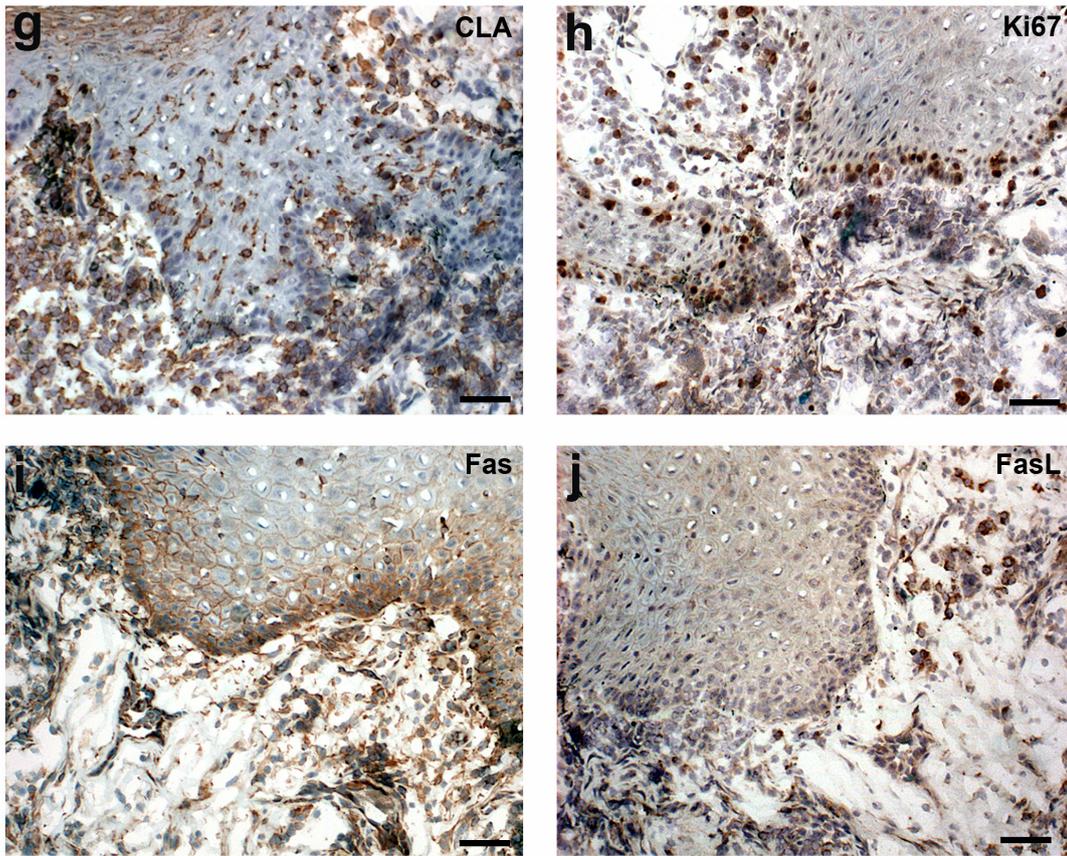
**Figura 4 - Mucosa nasal LTA:** (a) células Ki67<sup>+</sup>, (b) células Bcl-2<sup>+</sup>, (c) neutrófilos, (d) células FasL<sup>+</sup>, (e) células CD22<sup>+</sup>, (f) Expressão de CD62E. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



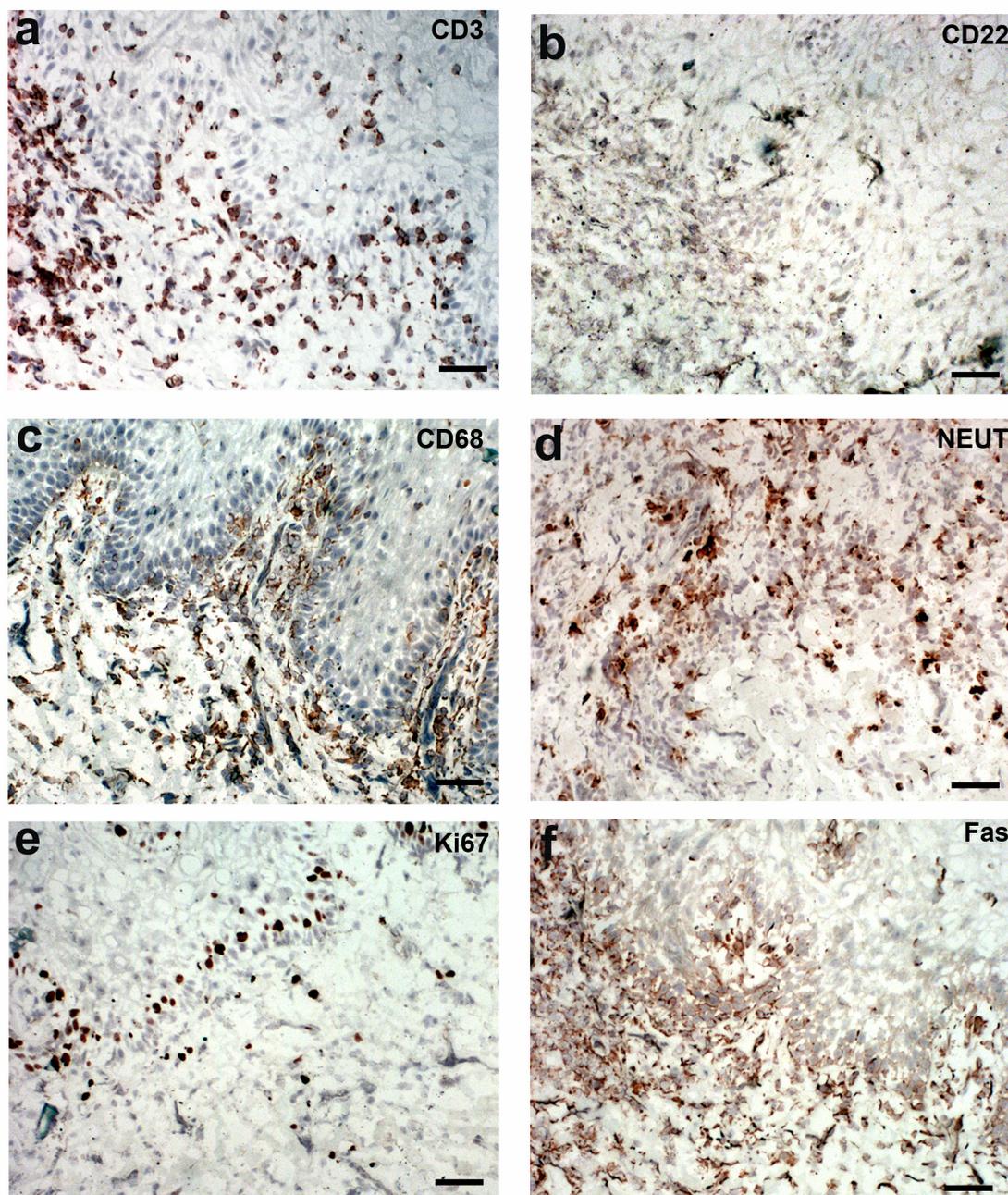
**Figura 5 - Mucosa oral LTA:** (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células CD4<sup>+</sup>, (c) células CD8<sup>+</sup>, (d) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (e) Neutrófilos, (f) células CD1a<sup>+</sup>. Aumento original de 200x

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



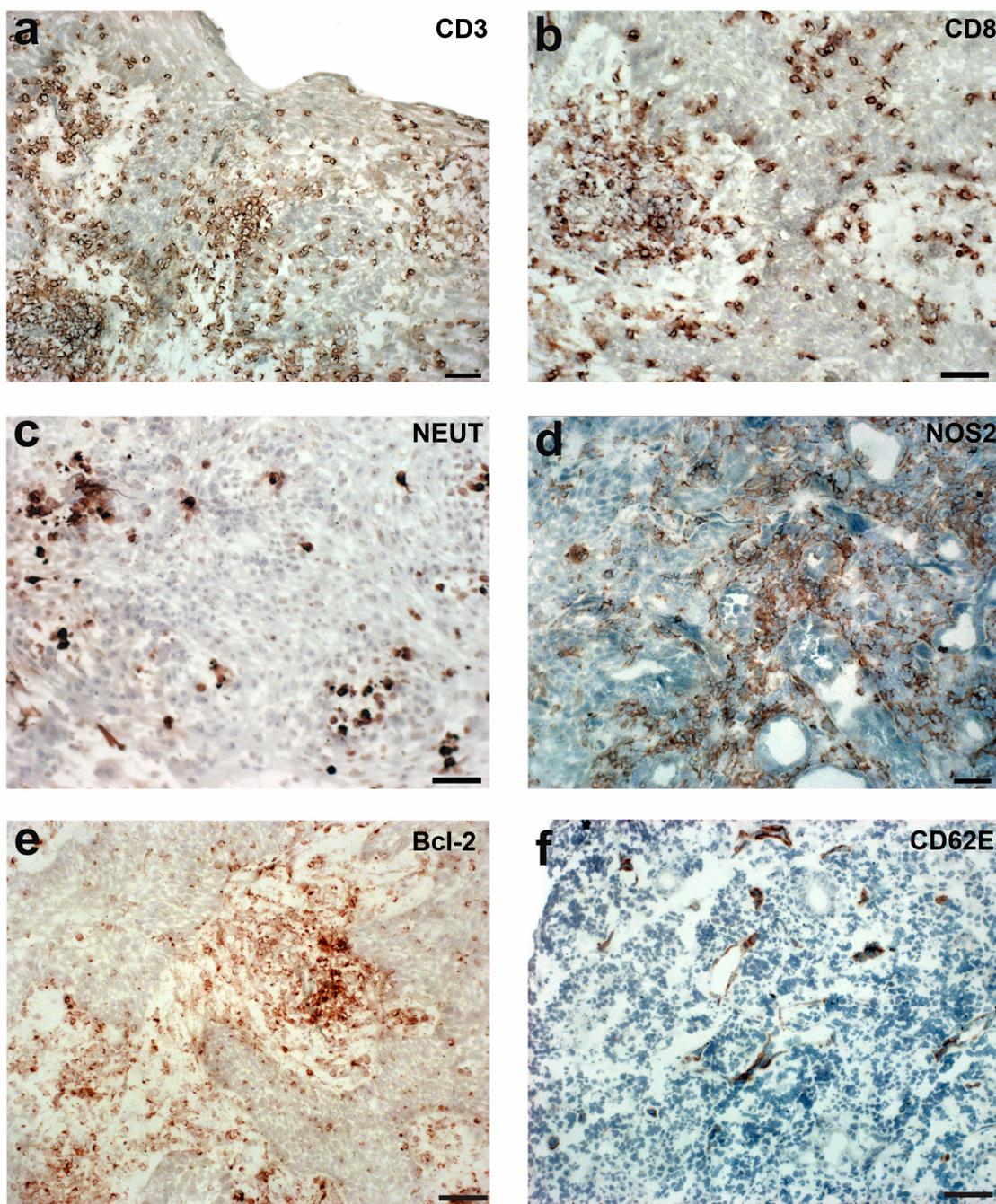
**Figura 5 - Mucosa oral LTA:** (g) células CLA<sup>+</sup>, (h) células Ki67<sup>+</sup>, (i) células Fas<sup>+</sup>, (j) células FasL<sup>+</sup>. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



**Figura 6 - Mucosa oral LTA:** (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células CD22<sup>+</sup>, (c) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (d) neutrófilos (e) células Ki67<sup>+</sup>, (f) células Fas<sup>+</sup>. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



**Figura 7 - Mucosa oral LTA:** (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células T CD8<sup>+</sup>, (c) neutrófilos, (d) expressão de NOS2<sup>+</sup>, (e) Células Bcl-2<sup>+</sup>, (f) expressão de CD62E. Aumento original de 200x  
Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).

### 6.3.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias

#### 6.3.2.1 Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Quadro 8 e Gráfico 2)

As células CD68<sup>+</sup> estavam presentes tanto no epitélio, como na lâmina própria e apresentavam nesta uma distribuição homogênea tanto nas mucosas orais quanto nasais. Na lâmina própria, foram observadas células positivas próximo ao endotélio de vasos e em torno de ductos e glândulas. Na mucosa nasal, o percentual variou de 12,4 a 31,2 (média  $\pm$  SEM 26,71  $\pm$  1,76%), e a quantidade de células CD68<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 56 a 190 (média  $\pm$  SEM 137,9  $\pm$  13,96) (Figura 3d). Na mucosa oral, o percentual variou de 11,4 a 35 (média  $\pm$  SEM 23,14  $\pm$  2,29%), e a quantidade de células CD68<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 75 a 270 (média  $\pm$  SEM 140,60  $\pm$  21,7) (Figura 9i). Não foi encontrada diferença significativa, quando comparados os valores das mucosas sadias nasais e orais, tanto para o percentual de células CD68<sup>+</sup> (p = 0,173) quanto células CD68<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (p = 0,821).

As células CD3<sup>+</sup> podiam ser encontradas tanto no epitélio, como na lâmina própria, mas sempre em pequena quantidade, se comparado com as mucosas de LTA. Na lâmina própria, essas células apresentavam-se de forma difusa e discreta. Além disso, elas podiam ser vistas no interior de vasos e/ou justapostas ao endotélio e próximas à região de ductos e glândulas. Na mucosa nasal, o percentual variou de 18,4 a 32,2 (média  $\pm$  SEM 26,82  $\pm$  1,67%), e a quantidade de células CD3<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 71 a 219 (média  $\pm$  SEM 151  $\pm$  16,18) (Figura 8a). Na mucosa oral, o percentual variou de 7 a 39,4 (média  $\pm$  SEM 20,32  $\pm$  2,81%), e no mm<sup>2</sup> variou de 46 a 352 (média  $\pm$  SEM 127,2  $\pm$  28,03) (Figura 9g). Houve diferença significativa no percentual de células CD3<sup>+</sup> entre as mucosas sadias (p = 0,038). Contudo, a comparação de distribuição de células CD3<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup> nos dois tipos de mucosa não evidenciou diferenças significativas (p = 0,199).

Tanto na mucosa oral quanto na nasal as células CD4<sup>+</sup> apresentavam distribuição pequena e heterogênea na lâmina própria, além de também estarem presentes no epitélio subjacente (Figura 8b). Na mucosa nasal, essas células variaram de 10,6 a 26%, (média  $\pm$  SEM 18,04  $\pm$  1,69%). Já a quantidade de células CD4<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>, de tecido era de 26 a 157 (média

$\pm$  SEM 79,9  $\pm$  11,93). Na mucosa oral, a porcentagem variou de 6 a 16,4% (média  $\pm$  SEM 10,54  $\pm$  0,95%). Na distribuição por mm<sup>2</sup> no tecido, verificou-se a presença de 22 a 210 células (média  $\pm$  SEM 68  $\pm$  16,75). Na contagem percentual sobre as células totais, foi evidenciada diferença significativa ( $p = 0,002$ ). Entretanto, na distribuição por mm<sup>2</sup>, não houve diferença significativa ( $p = 0,212$ ) nos dois grupos analisados.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentavam discreta distribuição heterogênea, com áreas de marcações mais frequentes e menos frequentes, em meio à lâmina própria. Na mucosa nasal, o percentual variou de 13,6 a 26% (média  $\pm$  SEM 19,3  $\pm$  1,21%), e a quantidade de células CD8<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido de 36 a 221 (média  $\pm$  SEM 125,2  $\pm$  20,2) (Figura 8c). Na mucosa oral, o percentual variou de 4,8 a 15% (média  $\pm$  SEM 8,66  $\pm$  0,86%) e no mm<sup>2</sup> de tecido 17 a 236 (média  $\pm$  SEM 60,2  $\pm$  20,02) (Figura 9h). Não foi observada diferença significativa na contagem percentual ( $p = 0,817$ ) e na distribuição por mm<sup>2</sup> ( $p = 0,537$ ). A razão CD4/CD8, na mucosa nasal sadia, variou de 0,67 a 1,20 (média  $\pm$  SEM 0,92  $\pm$  0,063). Já na mucosa oral, sadia a mesma razão variou de 0,88 a 1,42 (média  $\pm$  SEM 1,25  $\pm$  0,11). Houve diferença significativa entre as razões CD4/CD8 ( $p = 0,019$ ) na comparação dos dois grupos pesquisados.

Apesar de pouco frequentes, as células B CD22<sup>+</sup> tinham um padrão de distribuição heterogêneo, formando pequenos grupos de células positivas, em meio ao infiltrado inflamatório, na lâmina própria. Na mucosa nasal, o percentual de B CD22<sup>+</sup> variou de 3,4 a 14,8% (média  $\pm$  SEM 9,3  $\pm$  1,25%), e a quantidade de CD22<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 14 a 89 (média  $\pm$  SEM 44,4  $\pm$  7,98) (Figura 8f). Na mucosa oral, o percentual variou de 2 a 11,2% (média  $\pm$  SEM 6,32  $\pm$  0,89%), e a quantidade de CD22<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 12 a 67 (média  $\pm$  SEM 30,2  $\pm$  6,16) (Figura 9l). Não foram observadas diferenças significativas, quando comparados o percentual de CD22<sup>+</sup> ( $p = 0,13$ ) e a quantidade de CD22<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> ( $p = 0,212$ ) nas mucosa nasal e oral.

Os neutrófilos também demonstravam um padrão de distribuição heterogêneo e mais discreto que nas lesões estudadas. Na mucosa nasal, o percentual variou de 1,2 a 22,6% (média  $\pm$  SEM 11  $\pm$  2,10%), e a quantidade de neutrófilos/mm<sup>2</sup> de tecido foi de 6 a 82 (média  $\pm$  SEM 45,7  $\pm$  9,78) (Figura 8e). Na mucosa oral, o percentual variou de 0,5 a 10,2% (média  $\pm$  SEM 4,78  $\pm$  1,10%), e a quantidade de neutrófilos/mm<sup>2</sup> de tecido variou de 2 a 586 (média  $\pm$  SEM 30,4  $\pm$  9,33) (Figura 9j). Houve diferença significativa na contagem percentual de

neutrófilos entre as duas mucosas ( $p = 0,028$ ). Todavia, na distribuição por  $\text{mm}^2$  ( $p = 0,364$ ), não foi observada diferença entre os dois grupos estudados.

### 6.3.2.2 Perfil quantitativo e qualitativo de células de Langerhans (Quadro 8)

As células de Langerhans  $\text{CD1a}^+$  foram observadas em menor quantidade tanto no epitélio quanto na lâmina própria. Na lâmina própria podiam ser observadas células dispersas e próximas à lâmina própria papilar, embora em pouquíssima quantidade. Na mucosa nasal, a quantidade de células  $\text{CD1a}^+/\text{mm}^2$  variou no epitélio de 5 a 48 (média  $\pm$  SEM  $13,22 \pm 5,6$ ) e na lâmina própria variou de 1 a 7 (média  $\pm$  SEM  $3,55 \pm 0,74$ ) (Figura 8g). Na mucosa oral, a quantidade de células  $\text{CD1a}^+/\text{mm}^2$  variou de 3 a 69 no epitélio (média  $\pm$  SEM  $34,88 \pm 6,84$ ) e na lâmina própria variou de 1 a 7 (média  $\pm$  SEM  $2,42 \pm 0,87$ ) (Figura 9a). Houve diferença significativa na quantidade de células  $\text{CD1a}^+/\text{mm}^2$  de tecido tanto no epitélio ( $p = 0,046$ ) quanto na lâmina própria ( $p = 0,126$ ) quando comparado com a das mucosas nasal e oral sadias.

### 6.3.2.3 Marcadores de inflamação (Quadros 8 e 9)

As células  $\text{CLA}^+$  podiam ser observadas na lâmina própria apresentando distribuição heterogênea. Na lâmina própria papilar, a marcação era mais intensa que na área reticular. Havia também a presença de células  $\text{CLA}^+$  próximas, ou na luz de vasos, e próximas a áreas de ductos e glândulas, mas sempre em pequenas quantidades. Na mucosa nasal, o percentual variou de 6 a 24% (média  $\pm$  SEM  $11 \pm 1,66\%$ ), e a quantidade de células  $\text{CLA}^+/\text{mm}^2$  de tecido variou de 23 a 126 (média  $\pm$  SEM  $56,6 \pm 9,07$ ) (Figura 8h). Na mucosa oral, o percentual variou de 5,6 a 36% (média  $\pm$  SEM  $13,5 \pm 2,8\%$ ), e a quantidade de células  $\text{CLA}^+/\text{mm}^2$  de tecido variou 19 a 260 (média  $\pm$  SEM  $60,9 \pm 22,85$ ) (Figura 9b). Não houve diferença significativa tanto na contagem percentual ( $p = 0,596$ ) quanto na quantidade de células  $\text{CLA}^+/\text{mm}^2$  de tecido ( $p = 0,199$ ). A comparação entre tecido sadio e doente demonstrou que as células  $\text{CLA}^+$  na mucosa oral sadia apresentavam-se em número

semelhante às das lesões. No entanto, na mucosa nasal sadia elas eram cerca de metade do observado nas lesões.

As células Ki67<sup>+</sup> encontradas na membrana basal apresentavam marcação positiva em todas as lesões. Na lâmina própria, apesar de pequena concentração as células Ki67<sup>+</sup> podiam ser identificadas em distribuição heterogênea. A comparação entre tecido sadio e doente mostrou uma redução de cerca de 3 a 4 vezes o número de células positivas. Na mucosa nasal, o percentual variou de 1,6 a 11,1% (média  $\pm$  SEM 5,79  $\pm$  1,15 %), e a quantidade de células Ki67<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido da lâmina própria variou de 12 a 68 (média  $\pm$  SEM 26,1  $\pm$  5,76) (Figura 8i). Na mucosa oral, o percentual variou de 1 a 8,8% (média  $\pm$  SEM 3,42  $\pm$  0,70%), e a quantidade de células Ki67<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> no tecido da lâmina própria variou de 5 a 34 (média  $\pm$  SEM 16,4  $\pm$  3,46) (Figura 9c). Não foi observada diferença significativa no percentual ( $p = 0,186$ ), e na distribuição por mm<sup>2</sup> de tecido ( $p = 0,129$ ).

A presença de NOS2 foi evidenciada nas mucosas sadias (Quadro 9 e Figura 9f). Nessas mucosas, essa enzima apresentava baixa expressão, com marcação menos intensa e distribuição mais discreta. Não houve diferença significativa na expressão de NOS2, comparando-se as mucosas nasais e orais sadias ( $p = 0,99$ ).

A expressão de E-selectina (CD62-E) foi observada em todos os tecidos estudados (Quadro 9 e Figura 9m). A maioria das amostras apresentava baixa expressão de selectina-E. Comparando-se o grau de intensidade da Selectina-E, não foi observada diferença significante quando se pesquisou as mucosas nasais e orais sadias ( $p = 0,25$ ).

As células Bcl-2<sup>+</sup> apresentavam distribuição heterogênea, concentrando-se em áreas próximas à lâmina própria papilar (Quadro 8, Figura 9d e Gráfico 2). Na mucosa nasal, o percentual de células positivas variou de 10,8 a 43% (média  $\pm$  SEM 27,97  $\pm$  3,1%), e a quantidade de células Bcl-2<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido foi de 107 a 720 (média  $\pm$  SEM 150,7  $\pm$  14,3). Já na mucosa oral, o percentual variou de 6,2 a 30,6% (média  $\pm$  SEM 14,2  $\pm$  2,23%), e a quantidade de células Bcl-2<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido foi de 32 a 160 (média  $\pm$  SEM 69,2  $\pm$  11,6). Houve diferença significativa comparando tanto a distribuição percentual ( $p = 0,008$ ) quanto à quantidade de células Bcl-2<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido ( $p = 0,001$ ).

As células expressando o ligante para Fas (FasL<sup>+</sup>) (Quadro 8 e Gráfico 2) mostravam distribuição heterogênea, e organizada em pequenas áreas. Na mucosa nasal, o percentual de células positivas variou de 6 a 28% (média  $\pm$  SEM 11,80  $\pm$  2,07%), e a quantidade de células FasL<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> no tecido examinado foi de 28 a 129 (média  $\pm$  SEM 62,8  $\pm$  9,36). Na mucosa oral, a contagem percentual variou de 1,5 a 20,4% (média  $\pm$  SEM 13,45  $\pm$  1,91%), e a quantidade de células FasL<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido, de 9 a 232 (média  $\pm$  SEM 64,3  $\pm$  11,35). Não foi evidenciada diferença significativa tanto na contagem percentual ( $p = 0,212$ ), quanto na quantidade de células FasL<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido ( $p = 0,88$ ).

As células Fas<sup>+</sup> apresentavam distribuição homogênea pelo tecido (Quadro 8 e Gráfico 2). Além disso, pôde-se notar também células Fas<sup>+</sup> positivas em ductos e glândulas e próximo à vasos sanguíneos. Na mucosa nasal, o percentual de células positivas variou de 8,4 a 32% (média  $\pm$  SEM 16,28  $\pm$  2,25%), e a quantidade de Fas<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido, de 50 a 145 (média  $\pm$  SEM 82,5  $\pm$  10,06) (Figura 8j). Na mucosa oral, o percentual variou de 12,6 a 28,8% (média  $\pm$  SEM 19,73  $\pm$  1,72%), e a quantidade de Fas<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> no tecido, de 47 a 227 (média  $\pm$  SEM 95,9  $\pm$  16,83) (Figura 9e). Quando comparou-se os dois tipos de mucosa sadia, não foi encontrada diferença significativa entre os percentuais ( $p = 0,162$ ), e a quantidade de Fas<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de tecido ( $p = 0,705$ ).

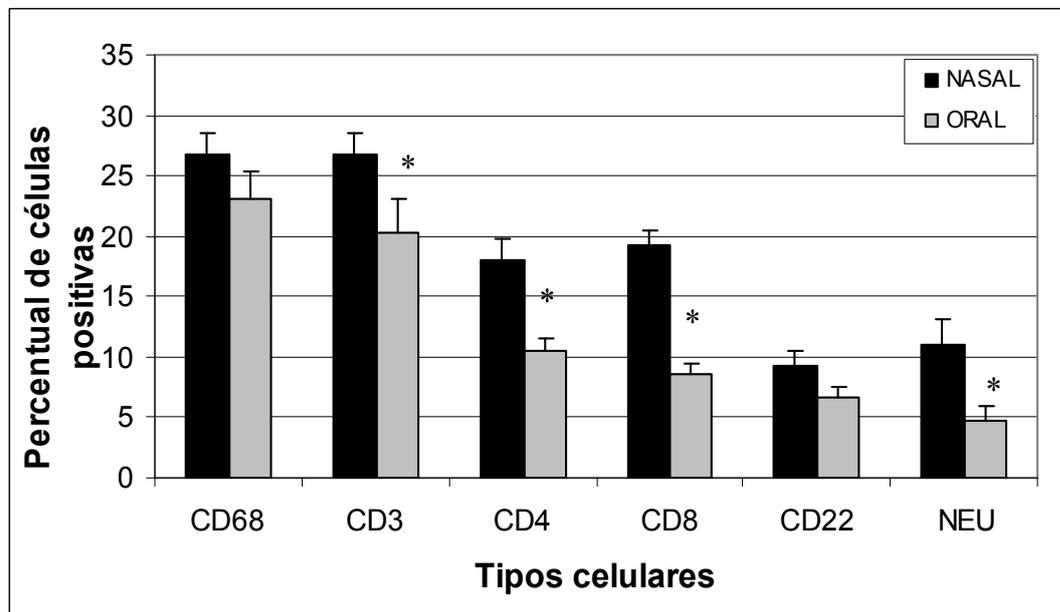
**Quadro 8 - Mucosas clinicamente sadias nasal e oral: Contagem percentual e/ou por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados**

<b>Marcadores Celulares</b>	<b>Mucosa Nasal</b>	<b>Mucosa Oral</b>	<b>P</b>
<b>CD3 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	26,82 ± 1,67 (151 ± 16,18)	20,32 ± 2,81 (127,2 ± 28,03)	(p = 0,038) (p = 0,199)
<b>CD4 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	18,04 ± 1,69 (79,9 ± 11,93)	10,54 ± 0,95 (68 ± 16,75)	(p = 0,002) (p = 0,212)
<b>CD8 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	19,3 ± 1,21 (125,2 ± 20,2)	8,66 ± 0,86 (60,2 ± 20,02)	(p = 0,0001) (p = 0,015)
<b>CD4/CD8</b>	0,92 ± 0,063	1,25 ± 0,11	(p = 0,019)
<b>CD22 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	9,3 ± 1,25 (44,40 ± 7,98)	6,68 ± 0,90 (30,20 ± 6,16)	(p = 0,13) (p = 0,212)
<b>CD68 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	26,71 ± 1,76 (137,90 ± 13,96)	23,14 ± 2,29 (140,60 ± 21,70)	(p = 0,173) (p = 0,821)
<b>Neutrófilos (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	11 ± 2,10 (45,7 ± 9,78)	4,78 ± 1,10 (30,40 ± 9,33)	(p = 0,028) (p = 0,364)
<b>CD1a (Cels/EPmm<sup>2</sup>)</b> (Cels/LPmm <sup>2</sup> )	(13,22 ± 5,6) (2,42 ± 0,87)	(34,88 ± 6,84) (3,55 ± 0,74)	(p = 0,046) (p = 0,126)
<b>CLA (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	11 ± 1,66 (56,6 ± 9,07)	13,5 ± 2,8 (60,9 ± 22,85)	(p = 0,596) (p = 0,199)
<b>Ki67 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	5,79 ± 1,15 (26,10 ± 5,76)	3,42 ± 0,70 (16,4 ± 3,46)	(p = 0,186) (p = 0,129)
<b>BCI-2 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	27,97 ± 3,1 (150,7 ± 14,3)	14,2 ± 2,23 (69,2 ± 11,6)	(p = 0,008) (p = 0,001)
<b>Fas (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	16,28 ± 2,25 (82,5 ± 10,06)	19,73 ± 1,72 (95,9 ± 16,83)	(p = 0,162) (p = 0,705)
<b>FasL (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	11,80 ± 2,07 (62,8 ± 9,36)	13,45 ± 1,91 (64,3 ± 11,35)	(p = 0,212) (p = 0,88)

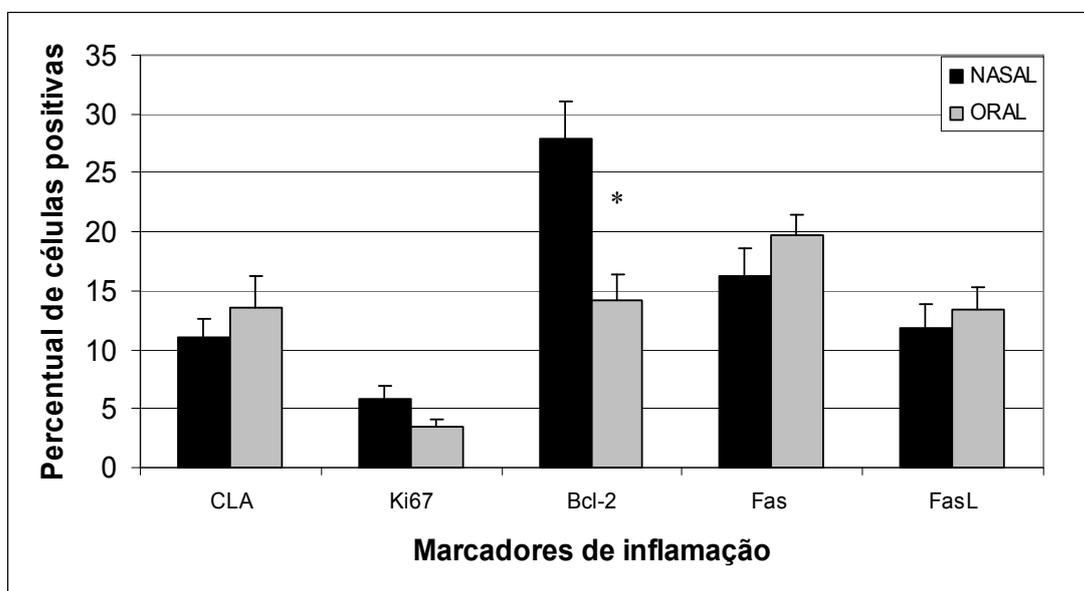
Ep. Eptélio; Lp. Lâmina própria expressos por média ± desvio mínimo valores.

Fonte: o autor, (2008).

**Gráfico 2 - Distribuição comparativa dos percentuais presente em mucosas orais e nasais clinicamente sadias**



\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 8)



\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 8)

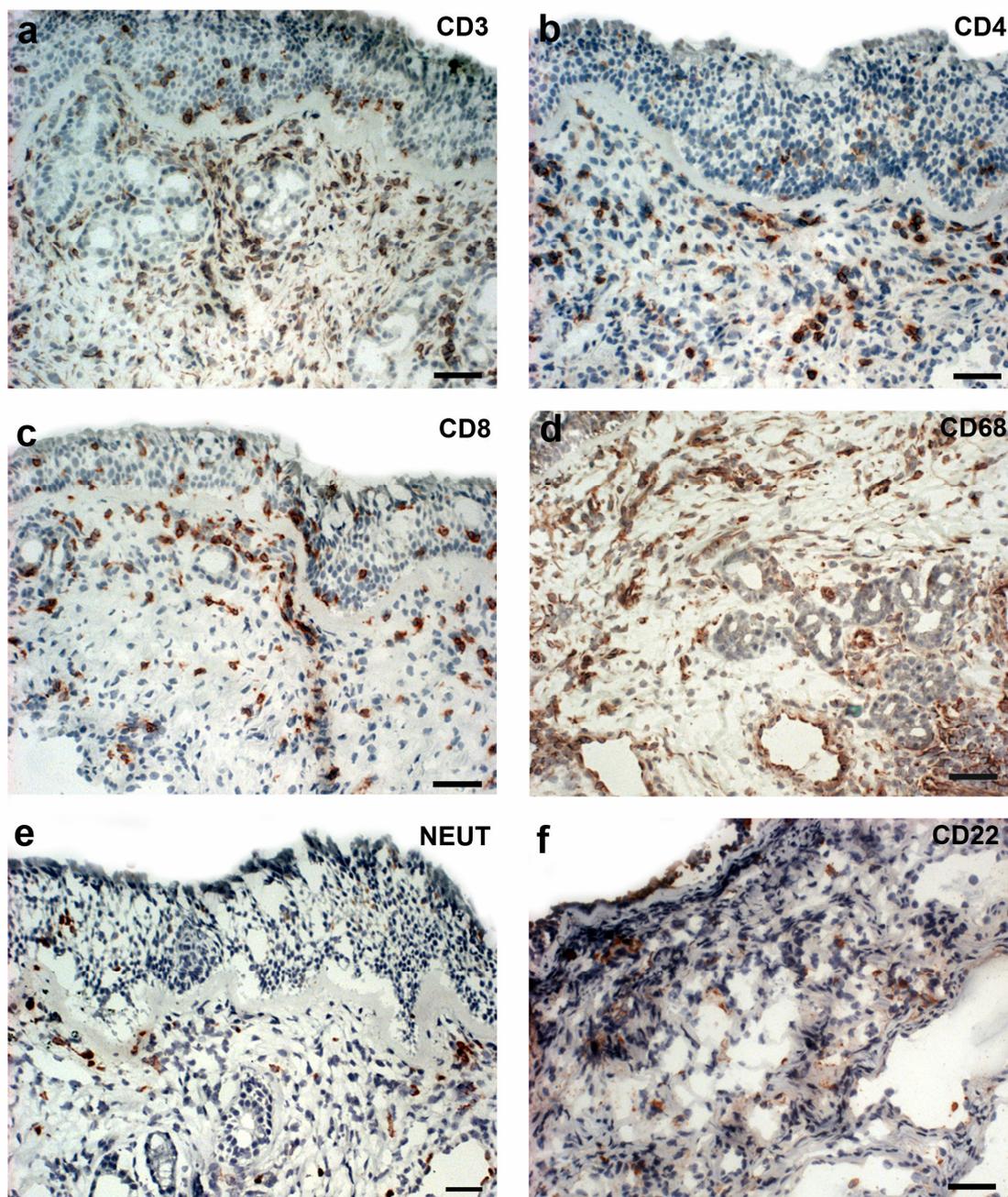
Fonte: o autor, (2008)

**Quadro 9 - Intensidade de NOS2 e E-selectina verificadas nas mucosas clinicamente sadias nasal e oral**

Localização		Distribuição dos casos de acordo com a intensidade +/-4			
		Discreto (+/4)	Moderado (++/4)	Intenso (+++/4)	Muito Intenso (++++/4)
NOS2	Nasal	9	1	0	0
	Oral	9	1	0	0
E-selectina	Nasal	6	4	0	0
	Oral	5	2	3	0

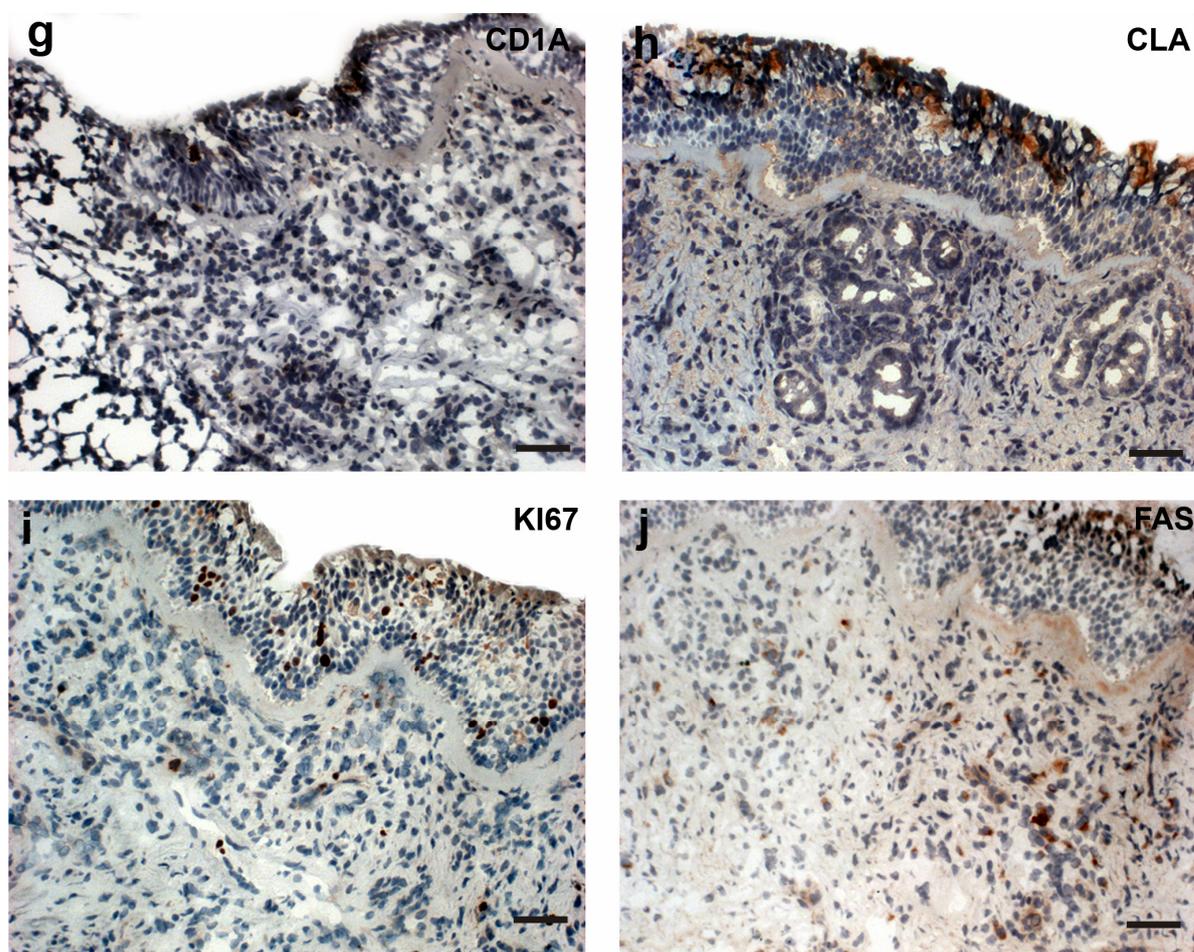
NOS2- óxido nítrico sintase tipo 2.

Fonte: o autor, (2008).



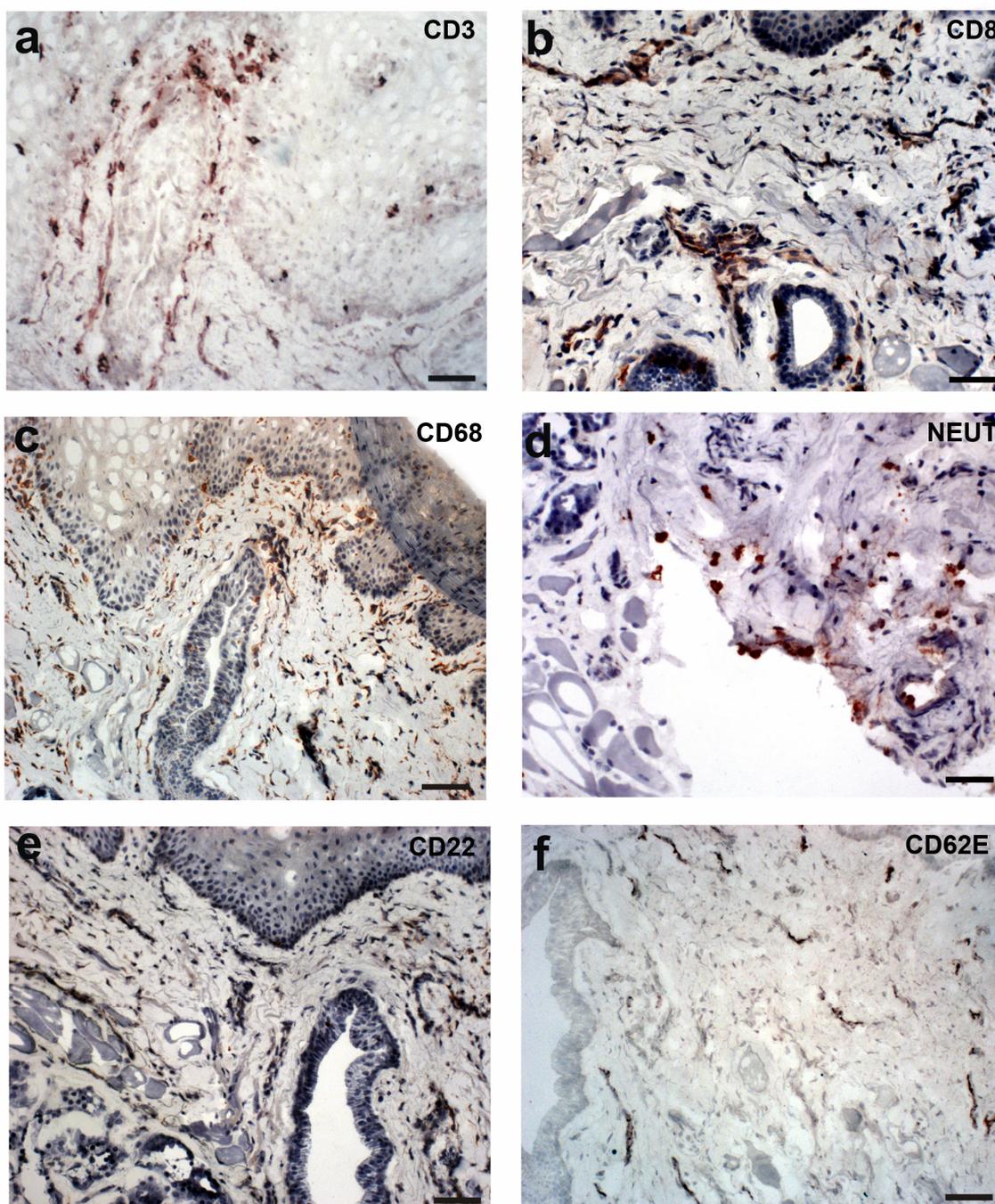
**Figura 8 - Mucosa nasal clinicamente sadia:** (a) células T CD3<sup>+</sup>, (b) células CD4<sup>+</sup>, (c) células CD8<sup>+</sup>, (d) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (e) Neutrófilos, (f) células CD22<sup>+</sup>. Aumento original de 200x

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



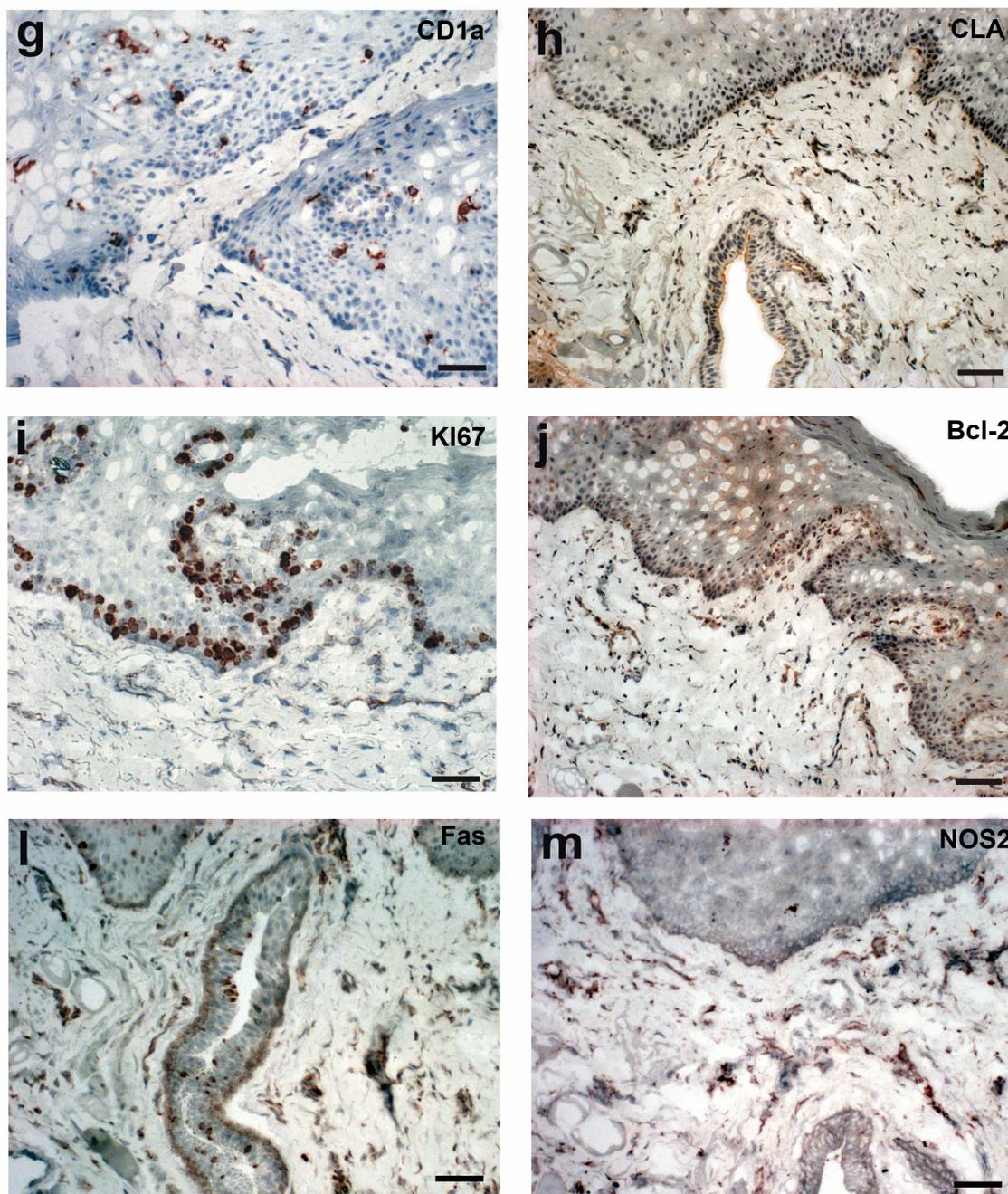
**Figura 8 - Mucosa nasal clinicamente sadia:** (g) células CD1a<sup>+</sup>, (h) células CLA<sup>+</sup>, (i) células Ki67<sup>+</sup>, (j) células Fas<sup>+</sup>. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



**Figura 9- Mucosa oral clinicamente sadia:** (a) células CD3<sup>+</sup>, (b) células CD8<sup>+</sup>, (c) macrófagos CD68<sup>+</sup>, (d) neutrófilos, (e) células CD22<sup>+</sup>, (f) expressão de CD62E. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).



**Figura 9 - Mucosa oral clinicamente sadia:** (g) células CD1a<sup>+</sup>, (h) células CLA<sup>+</sup>, (j) células Bcl-2<sup>+</sup>, (l) células Fas<sup>+</sup>, (m) expressão de NOS2<sup>+</sup>. Aumento original de 200x.

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).

### 6.3.3 Comparação entre lesão e o tecido clinicamente sadio em mucosa nasal

Foram observados maiores percentuais de células CD68<sup>+</sup> (p = 0,004), CD3<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD4<sup>+</sup> (p = 0,001), CD8<sup>+</sup> (p = 0,002), CD22<sup>+</sup> (p = 0,008), CLA<sup>+</sup> (p = 0,001), Ki67<sup>+</sup> (p=0,038) e Fas<sup>+</sup> (p = 0,003) em lesão de mucosa nasal, quando comparados à mucosa nasal clinicamente sadia. Quanto à intensidade de células/área de tecido, foi observada maior quantidade de células CD68<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD3<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD4<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD8<sup>+</sup> (p = 0,001), CD22<sup>+</sup> (p = 0,013), Neut<sup>+</sup> (p = 0,007), CLA<sup>+</sup> (p = 0,001), Ki67<sup>+</sup> (p=0,007), Fas<sup>+</sup> (p = 0,005) e FasL<sup>+</sup> (p = 0,001) em lesão de mucosa nasal, quando comparada à mucosa nasal clinicamente sadia (Quadro 10, Gráfico 3).

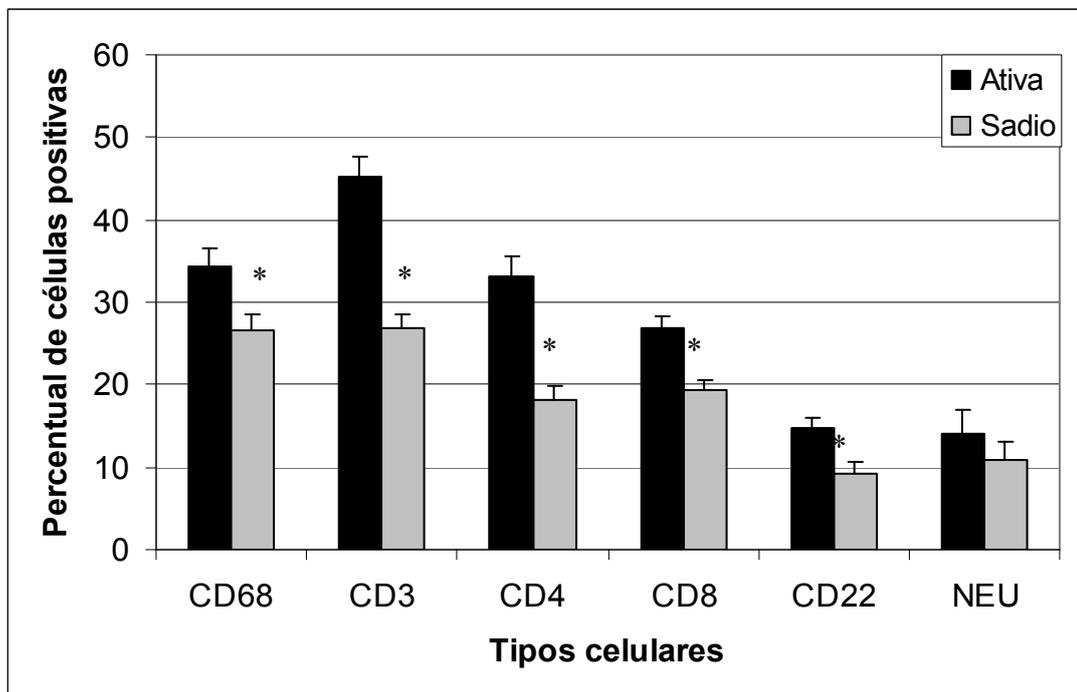
**Quadro 10 - Comparação entre a contagem percentual e/ou por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios de lesões de LTA em mucosa nasal e das mucosas nasais clinicamnte sadias**

<b>Marcadores Celulares</b>	<b>Mucosa Nasal LTA</b>	<b>Mucosa Nasal Sadia</b>	<b>P</b>
<b>CD3 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	45,36 ± 2,41 (767,16 ± 106,56)	26,82 ± 1,67 (151 ± 16,18)	(p = 0,0001) (p = 0,0001)
<b>CD4 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	33,04 ± 2,44 (497,25 ± 72,41)	18,04 ± 1,69 (79,9 ± 11,93)	(p = 0,001) (p = 0,0001)
<b>CD8 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	26,93 ± 1,34 (452,16 ± 67,90)	19,3 ± 1,21 (125,2 ± 20,2)	(p = 0,002) (p = 0,001)
<b>CD4/CD8</b>	1,23 ± 0,08	0,92 ± 0,063	(p = 0,011)
<b>CD22 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	14,80 ± 1,25 (93,16 ± 15,62)	9,3 ± 1,25 (44,40 ± 7,98)	(p = 0,008) (p = 0,013)
<b>CD68 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	34,40 ± 2,07 (351,16 ± 66,71)	26,71 ± 1,76 (137,90 ± 13,96)	(p = 0,004) (p = 0,0001)
<b>Neutrófilos (%) Cels/mm<sup>2</sup></b>	14,03 ± 2,92 (173,16 ± 44,52)	11 ± 2,10 (45,7 ± 9,78)	(p = 0,742) (p = 0,007)
<b>CD1a (Cels/EPmm<sup>2</sup>) (Cels/LPmm<sup>2</sup>)</b>	(26,33 ± 8,3) (5,3 ± 1,3)	(13,22 ± 5,6) (2,42 ± 0,87)	(p = 0,332) (p = 0,212)
<b>CLA (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	28,41 ± 3,6 (283,91 ± 41,99)	11 ± 1,66 (56,6 ± 9,07)	(p = 0,001) (p = 0,0001)
<b>Ki67 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	9,60 ± 1,15 (94,33 ± 17,55)	5,79 ± 1,15 (26,10 ± 5,76)	(p = 0,038) (p = 0,007)
<b>BCI-2 (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	34,39 ± 3,25 (395,41 ± 58,62)	27,97 ± 3,1 (150,7 ± 14,3)	(p = 0,176) (p = 0,001)
<b>Fas (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	28,14 ± 2,67 (235,91 ± 38,52)	16,28 ± 2,25 (82,5 ± 10,06)	(p = 0,003) (p = 0,005)
<b>FasL (%) (Cels/mm<sup>2</sup>)</b>	14,28 ± 2,08 (165,33 ± 84,28)	11,80 ± 2,07 (62,8 ± 9,36)	(p = 0,262) (p = 0,001)

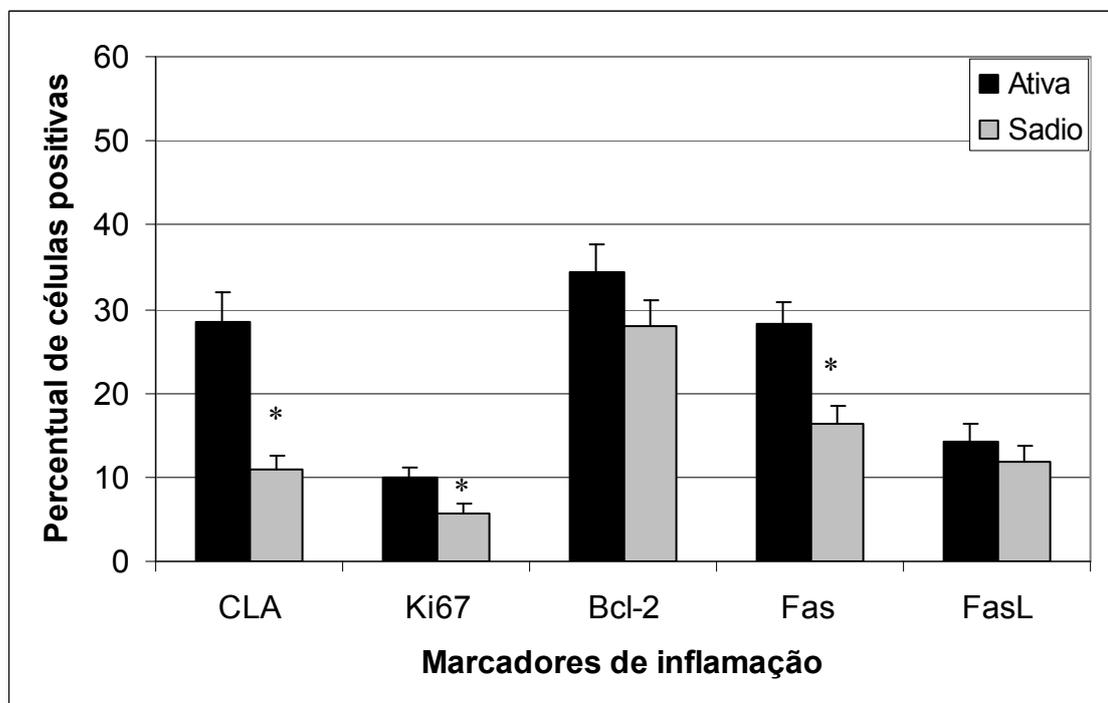
Ep. Eptélio; Lp. Lâmina própria expressos por média ± desvio mínimo valores.

Fonte: o autor/, (2008).

**Gráfico 3 - Comparação de celularidade verificada nos tecidos nasais de pacientes portadores de LTA e indivíduos clinicamente sadios**

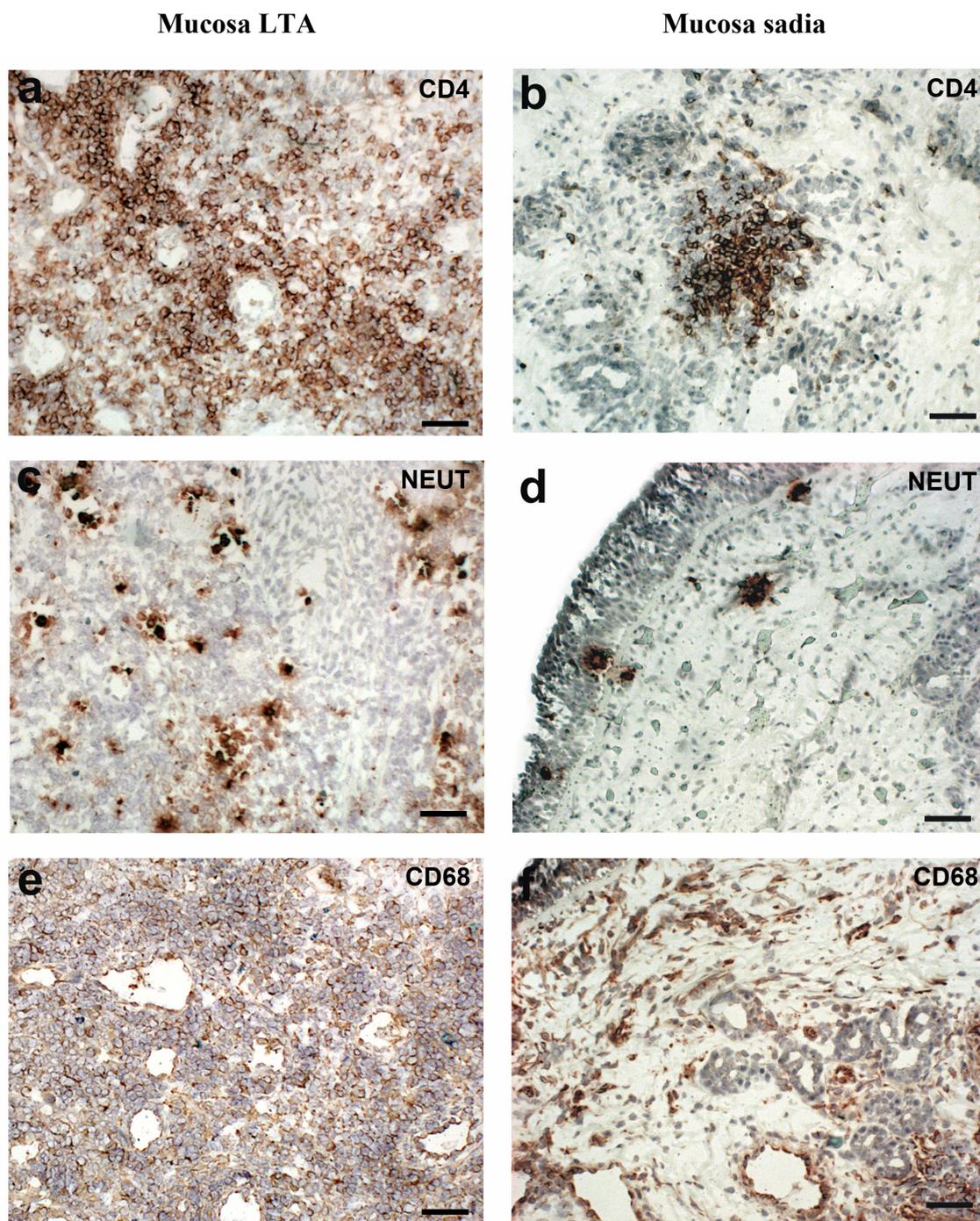


\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 10)



\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 10)

Fonte: o autor, (2008).



**Figura 10 - Estudo comparativo entre mucosas nasais: (a, b) células T CD4<sup>+</sup>, (c, d) neutrófilos, (e, f) células CD68<sup>+</sup>. Aumento original de 200x**

Fonte: Laboratório Imunoparasitologia-IOC-FIOCRUZ (o autor e Fátima Conceição-Silva), (2007).

### 6.3.4 Comparação entre lesão e o tecido clinicamente sadio em mucosa oral

Foram observados maiores percentuais de células CD68<sup>+</sup> (p = 0,006), CD3<sup>+</sup> (p = 0,001), CD4<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD8<sup>+</sup> (p = 0,001), CD22<sup>+</sup> (p = 0,006), Neut<sup>+</sup> (p = 0,001), CLA<sup>+</sup> (p = 0,007), Ki67<sup>+</sup> (p = 0,001), Bcl-2 (p = 0,002), Fas<sup>+</sup> (p = 0,007) e FasL (p = 0,04) em lesão, quando comparados à mucosa oral clinicamente sadia. Quanto à intensidade de células/área de tecido, foi observada maior quantidade de células CD68<sup>+</sup> (p = 0,001), CD3<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD4<sup>+</sup> (p = 0,0001), CD8<sup>+</sup> (p = 0,001), CD22<sup>+</sup> (p = 0,008), Neut<sup>+</sup> (p = 0,003), CLA<sup>+</sup> (p = 0,002), Ki67<sup>+</sup> (p = 0,001), Bcl-2 (p = 0,001), Fas<sup>+</sup> (p = 0,005) e FasL (p = 0,006) em lesão, quando comparado à mucosa oral clinicamente sadia (Quadro 11, Gráfico 4).

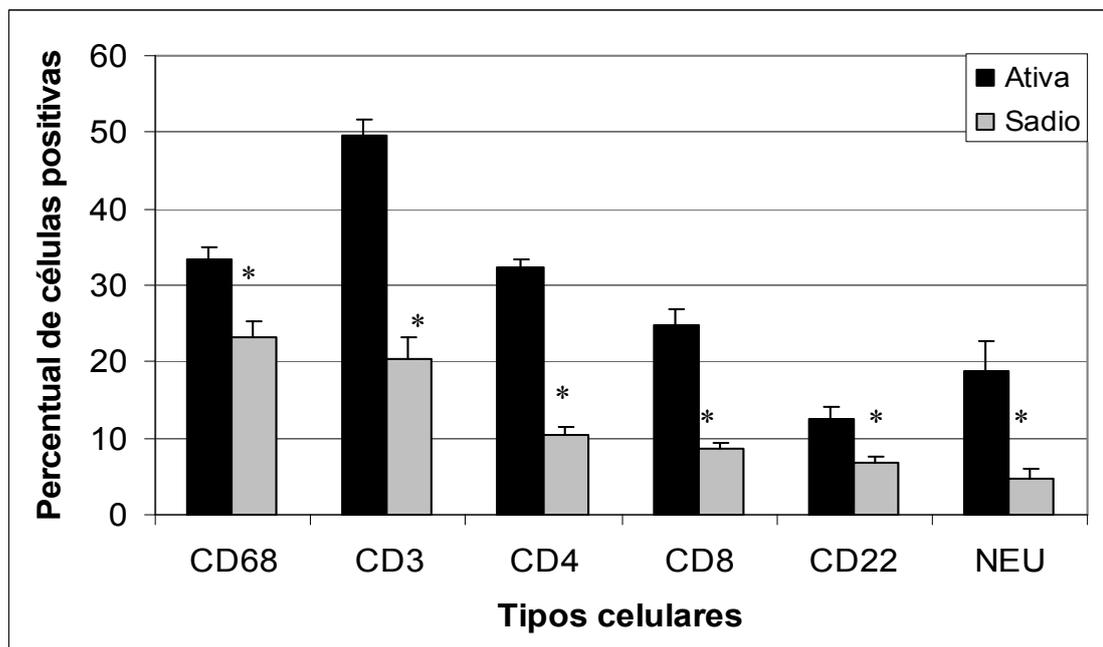
**Quadro 11 - Comparação entre a contagem percentual e/ou por mm<sup>2</sup> dos marcadores estudados nos sítios de lesões de LTA em mucosa oral e das mucosas orais clinicamente sadias.**

<b>Marcadores Celulares</b>	<b>Mucosa Oral LTA</b>	<b>Mucosa Oral Sadia</b>	<b>P</b>
<b>CD3 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	49,46 ± 2,13 (677,62 ± 78,28)	20,32 ± 2,81 (127,2 ± 28,03)	(p = 0,001) (p = 0,0001)
<b>CD4 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	32,26 ± 1,07 (483,75 ± 48,77)	10,54 ± 0,95 (68 ± 16,75)	(p = 0,0001) (p = 0,0001)
<b>CD8 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	24,74 ± 2,16 (364,25 ± 52,14)	8,66 ± 0,86 (60,2 ± 20,02)	(p = 0,001) (p = 0,001)
<b>CD4/CD8</b>	1,33 ± 0,11	1,25 ± 0,11	(p = 0,534)
<b>CD22 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	12,42 ± 1,59 (84,71 ± 18,47)	6,68 ± 0,90 (30,20 ± 6,16)	(p = 0,006) (p = 0,008)
<b>CD68 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	33,33 ± 1,67 (382,12 ± 44,06)	23,14 ± 2,29 (140,60 ± 21,70)	(p = 0,006) (p = 0,001)
<b>Neutrófilos (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	18,79 ± 4,03 (190,12 ± 43,73)	4,78 ± 1,10 (30,40 ± 9,33)	(p = 0,001) (p = 0,003)
<b>CD1a (Cels/EPmm<sup>2</sup>)</b> (Cels/LPmm <sup>2</sup> )	(32,14 ± 12,79) (5,8 ± 1,59)	(34,88 ± 6,84) (3,55 ± 0,74)	(p = 0,75) (p = 0,178)
<b>CLA (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	25,54 ± 2,64 (232,71 ± 42,53)	13,5 ± 2,8 (60,9 ± 22,85)	(p = 0,007) (p = 0,002)
<b>Ki67 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	14,62 ± 1,76 (74,42 ± 11,15)	3,42 ± 0,70 (16,4 ± 3,46)	(p = 0,001) (p = 0,001)
<b>BCI-2 (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	33,04 ± 3,57 (345,85 ± 59)	14,2 ± 2,23 (69,2 ± 11,6)	(p = 0,002) (p = 0,001)
<b>Fas (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	33,66 ± 2,89 (239,85 ± 33,98)	19,73 ± 1,72 (95,9 ± 16,83)	(p = 0,007) (p = 0,005)
<b>FasL (%)</b> (Cels/mm <sup>2</sup> )	22,05 ± 3,56 (164 ± 26,82)	13,45 ± 1,91 (64,3 ± 11,35)	(p = 0,04) (p = 0,006)

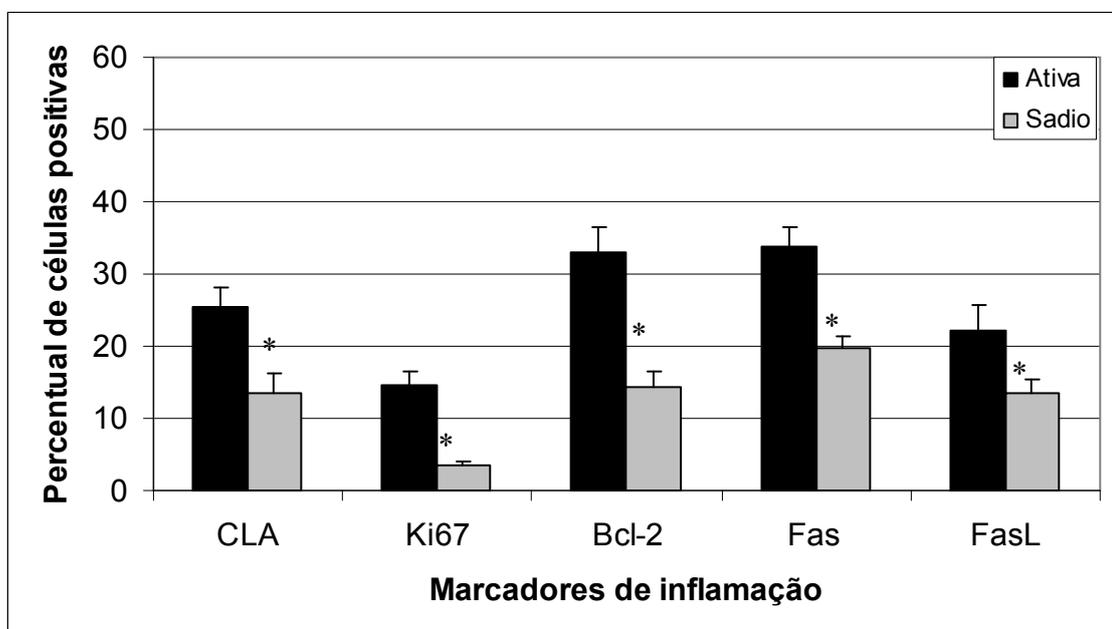
Ep. Eptélio Lp. Lâmina própria expressos por média ± desvio mínimo valores

Fonte: o autor, (2008).

**Gráfico 4 - Comparação de celularidade verificada nos tecidos orais de pacientes portadores de LTA e indivíduos clinicamente sadios**



\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 11)



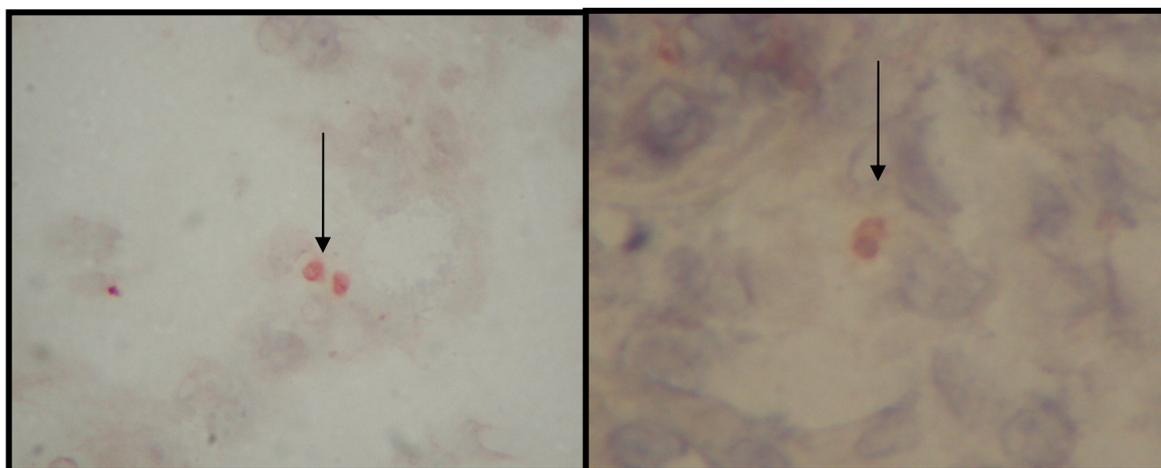
\*  $p < 0,05$  (para detalhes ver quadro 11)

Fonte: o autor, 2008



### 6.3.5 Detecção de parasitas

A detecção de parasitas foi possível em 8 dos 20 pacientes estudados pela histopatologia, sendo (6 casos) de mucosa oral e (2 casos) mucosa nasal. Pela imuno-histoquímica foi possível a visualização de amastigotas em 4 casos. A presença de parasitas era nestes casos mais freqüentes nas lesões orais (3 casos) que nas lesões nasais (1 caso). Nos pacientes em que o parasita não foi visualizado pela imuno-histoquímica e histopatologia, a infecção foi confirmada por cultura (7) ou laudo descritivo de histopatologia sugestivo de LTA (9). Os demais casos foram confirmados por: ELISA (17), (RIFI) (17) e IDRM (18). O estudo de correlação entre a presença de parasitas detectáveis e a intensidade de NOS2 nas lesões demonstrou como resultado uma correlação inversa entre os dois parâmetros ( $p = 0,0436$ ).



**Figura 12** - Imuno-histoquímica para detecção de formas amastigostas em lesões de LTA mucosa em atividade  
Fonte: o autor, Fernanda Nazaré Morgado e Fátima Conceição Silva (2007).

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi analisada a resposta imune celular *in situ* de lesões da LTA forma mucosa, acometendo tanto as cavidades orais quanto nasais, bem como a composição celular de amostras de mucosa nasal e oral sadias. Além disso, foram realizados testes para a detecção de parasitas nas lesões.

As lesões de LTA em atividade mostraram consideráveis infiltrados inflamatórios, constituídos principalmente por células T, macrófagos e, em menores proporções, linfócitos B e granulócitos, tanto nas lesões orais quanto nas nasais. A literatura tem demonstrado que o infiltrado inflamatório na LTA, tanto cutânea quanto mucosa, é composto primariamente por linfócitos T e macrófagos (MARTINEZ-ARENDES *et al.*, 1991; ESTERRE *et al.*, 1992; BARRAL-NETTO *et al.*, 1995; BOTRELL *et al.*, 2001; DIAZ *et al.*, 2002; AMATO *et al.*, 2003; FARIA *et al.*, 2005; MORGADO *et al.*, 2008). A predominância destas células em lesões de mucosa oral e nasal também foi relatada em outras doenças infecciosas granulomatosas como a paracoccidioidomicose (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1989; NEWORAL *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2005) e não granulomatosas, como as periodontites, sinusites e rinites infecciosas (PAWANKAR e OKUDA, 1993; YAMAZAKI *et al.*, 1995; LAPPIN *et al.*, 1999; GREVERS *et al.*, 2000; PETIT *et al.*, 2001). Este achado pode ocorrer devido à característica destes processos inflamatórios notadamente aqueles produzidos por patógenos, em estimular predominantemente a resposta imune celular, com importante função de macrófagos na eliminação do agente causal.

Em outras doenças inflamatórias não infecciosas acometendo mucosa oral, como o lúpus eritematoso, o infiltrado inflamatório também é predominantemente composto por linfócitos T do subtipo CD4, contudo com uma menor quantidade de macrófagos, linfócitos B (LOURENÇO *et al.*, 2007). No nosso estudo, as proporções de linfócitos T, B, macrófagos e neutrófilos, nos tecidos nasais e orais sadios, eram bem menores do que aquelas encontradas nas lesões, mas poderiam ser identificado. Isso pode ocorrer porque as mucosas de boca e nariz, mesmo sendo consideradas sadias, são áreas de contato permanente com corpos estranhos e microorganismos. Desta forma, o sistema de vigilância imune está sempre ativado, mesmo que em pequena intensidade, o que pode explicar a detecção de células tidas como inflamatórias, geralmente em pouca quantidade. Nas mucosas normais, a quantidade de

células fagocíticas residentes é pequena, mas suficiente para desempenhar função de defesa às agressões, que normalmente ocorrem nestas regiões. Também deve ser lembrada a presença de mediadores químicos, IgA, antibióticos naturais e outros na saliva, hoje considerada parte integrante da barreira local às infecções (ABBAS e LICHTMAN, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2008). Além disto, Assim, como a região entra em contato constante com microorganismos potencialmente patogênicos, o sistema imune mantém pequenas concentrações de células em atividade no local. Quando uma infecção se estabelece de forma mais prolongada a resposta imune se organiza para aumentar o número e alterar a composição do infiltrado inflamatório, de acordo com cada necessidade. Desta forma, a maior concentração de tipos celulares e marcadores de atividade, nas lesões mucosas com lesão, estaria relacionada à presença do agente etiológico, que desencadearia uma série de alterações na composição celular, na tentativa de controlar a carga parasitária local e debelar a infecção. Como hoje é sabido que a saliva pode participar da resposta imune oral, o estudo da composição destes componentes em pacientes e controles sadios poderia trazer subsídios à compreensão da reação inflamatória local. Por outro lado, apesar da descrição de diferenças na composição da saliva em relação à faixa etária, estudos conflitantes na literatura parecem indicar que, em situações de inflamação, não haveria diferença significativa na resposta imune local, mesmo comparando-se indivíduos de diferentes idades (NAVAZESH *et al.*, 1992; PERCIVAL *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, encontramos maior quantidade de células T CD4<sup>+</sup> em relação às células T CD8<sup>+</sup>, tanto nas lesões mucosas nasais, quanto nas orais, sendo que as razões CD4/CD8 das duas mucosas foi semelhante. Dados semelhantes foram observados em estudos prévios tanto na forma mucosa quanto na cutânea de LTA, apesar da doença mucosa ser mais severa e destrutiva (MODLIN *et al.*, 1985; BARRAL *et al.*, 1987; MARTINEZ-ARENDES *et al.*, 1991; ESTERRE *et al.*, 1992; BARRAL-NETTO *et al.*, 1995; AMATO *et al.*, 2003; FARIA *et al.*, 2005). Por outro lado, Morgado *et al.*, (2008), estudando lesões recentes e tardias em pele, encontraram uma razão maior de células CD4/CD8 nas lesões tardias quando comparadas com as lesões recentes. Em oposição, em dois estudos sobre leishmaniose cutânea realizados na Venezuela, sendo uma ocasionada por *L. panamensis*, foi observada constância de valores menores para a razão CD4/CD8. Entretanto, os autores não foram capazes de identificar algum fator para explicar essa diferença (MODLIN *et al.*, 1985; ISAZA *et al.*, 1996). Estas diferenças poderiam ocorrer tanto pelo tipo de parasita circulante quanto pela carga genética da população estudada. Em adição, estudos focados na resposta

celular periférica têm evidenciado um maior percentual de células CD8<sup>+</sup> específicas, quando comparado ao percentual de células CD4<sup>+</sup> (CARVALHO, 1985; CASTES *et al.*, 1988; DA-CRUZ *et al.*, 2002). A diferença observada no estudo *in situ* traz evidências sugestivas da compartimentalização da resposta imune, como descrito em outros sistemas. A compartimentalização do sistema imune já foi discutida em diversos órgãos e tecidos, como, por exemplo, em MALT (KUPER *et al.*, 2003; MCGHEE *et al.*, 1992; ALLARDYCE e BIENENSTOCK, 1984), SALT (STREILEIN, 1983), imunologia de unhas (ITO *et al.*, 2005) e olhos (ZIERHUT *et al.*, 1996). Desta forma, a lesão envolvendo tecidos poderia apresentar uma resposta imune local, não necessariamente refletida no compartimento periférico, indicando a importância dos estudos da resposta imune *in situ* na compreensão da imunopatogênese de determinadas doenças.

Neste trabalho, observamos uma variação da expressão de NOS2 (de pouco a muito intenso), tanto em lesões mucosas nasais como em orais. Apesar de não ser possível detectar diferença significativa, as lesões nasais tendem a apresentar expressão maior de NOS2, pois 41,7% das lesões nasais apresentam alta expressão da enzima enquanto que somente 14,3% das lesões orais apresentam alta expressão de NOS2. Os pacientes com leishmaniose mucosa apresentam uma forte imunidade mediada pelas células T, com a detecção de poucos parasitas *in situ* (BRASIL, 2007). No presente estudo, apesar dos pacientes com a forma mucosa de LTA apresentarem infiltrado inflamatório característico, ou seja, processo inflamatório crônico granulomatoso, com infiltrado linfoplasmocitário difuso, a detecção das formas amastigotas pela histopatologia (HE) foi possível apenas em 8 dos 20 indivíduos (40%). Destes 8 pacientes, 6 apresentavam lesões mucosas orais, o que sugere maior quantidade de parasitas identificáveis na mucosa oral, quando comparada à mucosa nasal. Considerando-se todos os possíveis exames para detecção do parasita, a positividade foi de 12 pacientes em 20. Clinicamente, as lesões nasais apresentam reações mais intensas do que as lesões orais, inclusive grandes destruições teciduais com conseqüente maior destruição dos elementos parasitários. Isso poderia explicar a maior frequência de detecção de parasitas nos tecidos orais. No entanto apesar da maior atividade inflamatória nas lesões mucosas nasais, o estudo estatístico dos resultados de anatomopatologia não mostrou diferença de intensidade de infiltrado entre lesões orais e nasais. Isso poderia ser devido a variabilidade encontrada nos vários casos estudados entre lesões orais e nasais. Além disso, a análise estatística das lesões orais mostrou que a presença do parasita determina infiltrados de maior intensidade. Estes resultados aparentemente discrepantes podem ser devidos à dinâmica das lesões. Pacientes

com lesões orais tenderiam a procurar auxílio médico mais precoce, devido aos sintomas clínicos como edema, sangramento, dor e odinofagia. Assim, mesmo nos casos de aumento do processo inflamatório ainda seria possível a visualização do parasita. Já as lesões mucosas nasais tenderiam a cronificar levando ao paciente procurar o médico muitos meses após o início dos sintomas. Esta demora proporciona tempo para a diminuição da carga parasitária. Outra hipótese também leva em consideração o fato de que a menor detecção de parasitas nas lesões nasais seria devido à intensa destruição dos mesmos em paralelo a uma intensa replicação. Desta forma, não haveria acúmulo visível, mas a quantidade de antígeno parasitário presente nas lesões levaria a manutenção de processo inflamatório ativo. Além disso, no presente estudo foi possível constatar uma associação inversa entre a expressão de NOS2 e a quantidade de parasitas nas lesões mucosa. Este dado sugere a importância da enzima no controle da carga parasitária, pois quanto maior a expressão de NOS2, menor é a quantidade de parasitas assim como observados nas lesões cutâneas. Resultados semelhantes foram observados nas lesões cutâneas (MORGADO *et al.*, 2008).

O NO tem sido considerado um importante sinal molecular em uma variedade de tecidos podendo também apresentar papel significativo como um modificador citotóxico na resposta imune não específica, produzindo tanto uma resposta benéfica quanto prejudicial (MONCADA e HIGGS, 1993; KRÖNCKE *et al.*, 1997; KENDALL *et al.*, 2001). Quando o NO é produzido localmente em altas concentrações, pode agir como uma molécula citotóxica, para células infectadas por fungos, bactérias, protozoários, células tumorais e células normais próximas aos sítios de produção (KRÖNCKE *et al.*, 1997). Deste modo, NO poderia também estar relacionado à destruição tecidual (KENDALL *et al.*, 2001).

Morgado *et al.* (2008), constataram que as lesões de LTA cutâneas apresentavam uma reação inflamatória constituída principalmente de linfócitos T e macrófagos. E a análise da expressão do NOS2 mostrou correlação direta com o número de células CD3. Observaram também associação entre NOS2 e a baixa quantidade de parasitas, enfatizando a importância do NOS2 na eliminação do patógeno. Resultados semelhantes foram encontrados por Faria *et al.* (2005), que verificaram ainda que as lesões mucosas apresentavam menor expressão de NOS2, quando comparadas às lesões cutâneas. No entanto, Díaz *et al.* (2002), encontraram expressões semelhantes de NOS2 nos vários tipos de lesões estudadas, mesmo nas lesões de leishmaniose cutânea intermediária (LCI) que apresentam poucos parasitas e cuja resposta imune ocorre de forma semelhante à leishmaniose mucosa. Essas diferenças podem ocorrer

devido a vários fatores, como espécie de *Leishmania* e tempo de evolução. Neste sentido, resultados semelhantes foram encontrados em outras infecções (NEWORAL *et al.*, 2003). Em conjunto estes dados corroboram a sugestão de correlação entre alta expressão de NOS2 e baixa carga parasitária.

Na análise das mucosas sadias, verificou-se baixa expressão da enzima NOS2. Estes dados estão de acordo com estudos realizados em tecidos periodontais, onde pode-se demonstrar que a expressão de NOS2 é mais elevada em gengivites e periodontites quando comparados aos tecidos gengivais clinicamente sadios (LAPPIN *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2002). Em adição, em estudos realizados comparando-se a expressão da enzima NOS2 em amostras de pacientes com rinite alérgica e com amostras de tecidos sadios também foi possível detectar uma maior expressão da molécula nos pacientes de rinite quando comparado aos tecidos sadios (KHARITONOV *et al.*, 1997).

Os macrófagos desempenham um papel central na leishmaniose tanto como células apresentadoras de antígenos, mediando a estimulação de células T específicas, quanto como células hospedeiras das formas amastigotas de *Leishmania* sp. No entanto, uma vez ativadas, essas células são capazes de eliminar os parasitas através dos mecanismos microbicidas e síntese de citocinas e quimiocinas, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Já foi verificado que a eliminação das amastigotas pelos macrófagos murinos e humanos depende principalmente dos mecanismos oxidativos, como intermediários reativos de oxigênio (ROI) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI), particularmente o NO, cuja produção é estimulada pelo NOS2 (BRANDONISIO *et al.*, 2001).

Um encontro marcante nas lesões mucosas foi a presença de quantidades apreciáveis de polimorfonucleares neutrófilos (PMNn). A presença de neutrófilos leucócitos tem sido relatada mais frequentemente em lesões agudas, mas também pode ser encontrada em lesões crônicas de leishmaniose cutânea. Durante o estabelecimento da resposta imune, os PMNn são as células dominantes, nos primeiros três dias após a infecção. No entanto, em estudo recente, Morgado *et al.* (2008), sugeriram a participação de neutrófilos no processo inflamatório, mesmo em estágios tardios da infecção. No presente estudo, os neutrófilos estavam presentes, tanto nas lesões mucosas de LTA, como nas mucosas sadias, porém, em diferentes proporções. Estudos sobre a importância dos neutrófilos, no início da infecção e controle da carga parasitária na leishmaniose, demonstraram que camundongos depletados de

PMNn e infectados por *Leishmania* sp. apresentam cargas parasitárias maiores (LIMA *et al.*, 1998). As lesões mucosas orais apresentavam maior quantidade de neutrófilos do que o tecido oral sadio. As lesões orais são muito dolorosas, o que dificulta a higienização adequada. Deve-se considerar que a boca é um local contaminado e que, no nosso estudo, a maioria dos pacientes apresentava má conservação dentária e de próteses, favorecendo infecções secundárias, como candidíase e doença periodontal. O mesmo não foi observado nas mucosas nasais, onde a quantidade de neutrófilos foi semelhante àquela observada em mucosa nasal sadia, não havendo diferença significativa. Este dado não exclui a possível participação destas células no processo inflamatório, em resposta ao agente etiológico, pois é possível que as mucosas nasais do grupo clinicamente sadio apresentassem agressões não detectáveis no exame microscópico. No entanto, como as lesões nasais tendem à cronicidade e evolução lentificada, a substituição destas células por outras envolvidas na resposta imune celular deve ser considerada.

As células de Langerhans são células dendríticas imaturas intra-epiteliais que atuam como componentes importantes do sistema imune da pele e da mucosa (STINGEL *et al.*, 1980). Elas são responsáveis, nas fases iniciais de infecção, pela captura e transporte dos antígenos proteicos para os linfonodos (MOLL *et al.*, 1993). Essas encontram-se localizadas acima da camada basal da pele (MURPH *et al.*, 1985) e, mucosas oral (ZAVALA e CAVICCHA, 2006), nasal (FOKKERNS, 1989; HELLQUIST *et al.*, 1991), esofágica, pulmonar, vaginal e retal (GIROLOMONI *et al.*, 2002). Nestes locais, as células CD1a<sup>+</sup> apresentam antígenos para os linfócitos T, ativando-os. Como na pele, a maioria das células de Langerhans da mucosa são encontradas no epitélio (VAN LOON *et al.*, 1989). No epitélio da mucosa bucal, a densidade de células de Langerhans não difere significativamente da densidade de células da epiderme. Por outro lado, na camada papilar da lâmina própria da mucosa bucal são encontradas significativamente menos células de Langerhans que na derme. Em nosso estudo, encontramos distribuição semelhante de células de Langerhans CD1a<sup>+</sup> nas lesões mucosas de LTA e mucosas clinicamente saudáveis nasais e orais, tanto em epitélio, como em lâmina própria. De um modo geral, a quantidade de células CD1a<sup>+</sup>, em lâmina própria, era bem menor do que no epitélio. Modlin *et al.* (1985) e Martinez-Arendes *et al.* (1991), observaram que há a ausência de células de Langerhans epiteliais em lesões de leishmaniose mucosa nasal se comparados com os nossos resultados, estes dados, aparentemente contraditórios podem ter várias explicações, desde o tipo de lesão até a fonte do anticorpo utilizado já que mais de 15 anos separam os resultados. Diaz *et al.* (2002) e Morgado *et al.*

(2008), encontraram as células de Langerhans CD1a<sup>+</sup> distribuídas no epitélio das lesões cutâneas de LTA, formando uma rede de células. Xavier *et al.* (2005), em seu estudo, demonstraram que a quantidade de células CD1a<sup>+</sup> era maior nas lesões de LTA cutânea do que nos controles negativos. A diferença qualitativa e quantitativa na distribuição de células de Langerhans pode refletir uma modificação na dinâmica de apresentação de antígenos nestes locais, em relação ao tipo, local e evolução da lesão. No entanto, o mecanismo existente (ainda não totalmente esclarecido) pode ser considerado bastante eficaz, já que o processo inflamatório é intenso nas regiões acometidas.

No presente trabalho, as células CLA<sup>+</sup> foram frequentemente observadas dentro dos vasos e aderidas ao endotélio. A importância dessa molécula nos processos de migração e a localização das células na pele e na mucosa já foram demonstradas (PIETRIZAK *et al.*, 1996; ZITZMANN *et al.*, 2002). Os linfócitos T selecionados nos linfonodos regionais, através da ação das células apresentadoras de antígeno, passam a expressar moléculas de superfície (CLA, LFA-1) que os direcionam para o sítio de lesão. Essa migração é resultado da expressão de CD62E e ICAM-1, pelo endotélio, das vênulas ativadas pelas citocinas inflamatórias. Nas lesões estudadas, as expressões de CD62E e CLA apresentavam distribuição e intensidade variáveis tanto na mucosa nasal, quanto na oral, sem diferença significativa quando as duas mucosas foram comparadas. Morgado *et al.* (2008), também encontraram intensidade e distribuição variável entre CLA e CD62E nas lesões cutâneas de LTA. No presente estudo, a quantidade de células CLA<sup>+</sup> nas lesões de mucosa nasal quando comparada a mucosa nasal clinicamente sadia era praticamente o dobro. Este dado corrobora a descrição de intenso processo inflamatório e ativo, com migração contínua de células e, conseqüentemente, aumento constante da resposta imune local. Já as lesões orais ativas quando comparada a mucosa oral clinicamente sadia apresentavam expressão de CLA<sup>+</sup> muito semelhante. Este achado pode ser devido à constante atividade de vigilância imunológica existente na região ligadas às condições particulares de microtrauma e constante exposição a agentes infecciosos nas mucosas orais ditas sadias. As células CLA positivas também foram encontradas na mucosa oral do líquen plano e mucosa normal (WALTON *et al.*, 1997).

O percentual médio de células Ki67<sup>+</sup> mostrou que algumas das células estão proliferando no sítio de lesão, podendo contribuir para o aumento local da população de células. Em nosso estudo, houve diferença significativa entre as populações de células Ki67<sup>+</sup>, verificadas entre as lesões de mucosa nasal e oral. Nas mucosas clinicamente sadias, a

quantidade de células Ki67<sup>+</sup> era bem menor geralmente e restritas à camada basal do epitélio, quando comparadas às lesões. A mucosa oral apresentou maior quantidade de células Ki67<sup>+</sup>, quando comparada à mucosa nasal. Este achado sugere que o processo inflamatório na mucosa oral se encontrava ainda em franca expansão. Esses dados podem ser associados ao menor tempo de evolução das lesões orais em relação às mucosas nasais (15 x 29 meses, respectivamente) e à maior facilidade de detecção dos parasitas. Em conjunto estas observações apontam para uma atividade inflamatória ainda em estado de expansão. Neste sentido, nossos resultados vão de encontro com aqueles estudados na literatura de LTA. Morgado *et al.* (2008), avaliando a população de células Ki67<sup>+</sup> em lesão cutânea de LTA, encontraram uma correlação positiva entre Ki67 e células T CD4, e sugeriram que estas seriam as células em proliferação no sítio da lesão. Ainda foi observada uma correlação positiva entre Ki67 e Bcl-2 corroborando o ambiente de proliferação.

A família Bcl-2 apresenta um papel importante na regulação da apoptose e na modulação do ciclo celular, regulando as proteínas nos mecanismos de controle da morte (apoptose) e proliferação celular. Essa proteína é encontrada em linfócitos T e B normais. No presente estudo, a quantidade de células Bcl-2<sup>+</sup> era bem maior nas lesões ativas do que nos tecidos clinicamente saudáveis. Poucos são os estudos a respeito de Ki67 e Bcl-2, em doenças infecciosas (KAMINAGAKURA *et al.*, 2006). Os estudos referentes a esses marcadores relatados na literatura, em mucosa oral e nasal, são voltados ao câncer e displasias, sendo avaliado o índice de proliferação celular em epitélio e não em lâmina própria (CRUCHLEY *et al.*, 1998; MCALINDEN *et al.*, 2000; LORO *et al.*, 2002; THOMSOM *et al.*, 2006; VICENTE *et al.*, 2006). No entanto, o achado de células com perfil de proliferação (Ki67<sup>+</sup>) aliado a presença de Bcl-2 (proteção contra morte celular) sugere um ambiente de atividade inflamatória intensa, onde o número de células inflamatórias tende a aumentar. Houve correlação positiva entre Bcl-2 e CD3, CD4 e CD8 e isso sugere que o processo inflamatório está em intensa atividade com estímulo à manutenção e sobrevivência das células. Estes dados são semelhantes aos previamente observados em lesões cutâneas de LTA (MORGADO *et al.*, 2008). Provavelmente este processo pode ser resolvido quando o estímulo produzido pela presença do parasita começar a diminuir. Neste ponto a inflamação pode ser controlada para facilitar a cicatrização.

Foi detectada expressão de Fas, tanto nas lesões de mucosas orais como nas nasais. De forma análoga, expressão de FasL, tanto em mucosa nasal quanto em oral, foi semelhante,

não tendo sido detectada correlação entre Fas/FasL. A ativação da via Fas/FasL desencadeia uma cascata enzimática que leva a célula-alvo à morte por apoptose. A importância do Fas/FasL no controle do processo inflamatório já foi relatada em estudos cutâneos (GUAN *et al.*, 2000) e em mucosa intestinal (MERGER *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006) poucos são os relatos em mucosa oral e nasal (LORO *et al.*, 1999; CAMPANELI *et al.*, 2003). Na forma cutânea de LTA, Morgado *et al.* (2008), encontraram intensa expressão de Fas, que se mantinham mesmo nas lesões mais antigas. Conceição-Silva *et al.* (1998), estudando camundongos deficientes em Fas ou FasL, demonstraram a importância dessa molécula no controle do processo inflamatório e cicatrização da lesão *in vivo*. No nosso trabalho quando se comparou a expressão de Fas e FasL nas lesões mucosas ativas de LTA com os controles negativos, observou-se que tanto a expressão de Fas, quanto de FasL eram significativamente maiores do que nas mucosas clinicamente saudáveis, sugerindo a participação dessa via, no processo inflamatório, nas lesões mucosas de LTA.

Analisados em conjunto, os dados apresentados nesse estudo demonstraram que, de forma geral, o processo inflamatório de LTA nas formas mucosa nasal e oral são semelhantes entre si e guardam estreita relação com os achados observados nas lesões cutâneas (MORGADO *et al.*, 2008). No entanto, algumas particularidades podem ser observadas como a presença de quantidades importantes de PMNs, parasitas, células em proliferação (Ki67<sup>+</sup>) e NOS2 nas lesões orais se comparadas com aquelas observadas nas lesões nasais. Estes dados, em associação com a presença de tempos de evolução mais curtos e maior queixa clínica dos pacientes, demonstraram que de forma geral, as lesões orais são examinadas de forma mais precoce. Isto pode ocorrer principalmente pela dificuldade imposta dia-a-dia do paciente frente a alterações da cavidade bucal que levam à dificuldade de alimentação e também a certo problema social. Em paralelo, a frequência de más condições de conservação dentária e a presença de processos inflamatórios na gengiva tendem a funcionar como um amplificador de destruição tecidual e sintomatologia clínica. Por outro lado, estas mesmas associações podem dificultar e confundir o correto diagnóstico dos pacientes, retardando assim o início do tratamento específico. Não se pode esquecer ainda a dificuldade diagnóstica, pois nem sempre o isolamento de patógenos em cultivo e a identificação de amastigotas de *Leishmania* sp. em permeio ao infiltrado inflamatório, apresenta importante grau de dificuldade, mesmo para patologistas experientes.

No nosso país, onde a LTA é amplamente distribuída, a presença de lesão bucal que não responde aos tratamentos convencionais em pacientes provenientes de área endêmica, ou com história pregressa de viagens habitação temporária em áreas de LTA, assim como relatos de lesões cutâneas de difícil cicatrização deve levantar a suspeita de LTA de mucosa oral, mesmo que existam outras associações como dentes em mal estado de conservação e inflamação relacionadas. Se isto ocorrer, certamente um número maior de casos de LTA envolvendo mucosa oral será identificado e uma resolução mais rápida do caso será obtida.

Quanto à resposta imune nas mucosas acometidas por LTA, outros marcadores funcionais deverão ser testados, de modo a melhor caracterizar o fenômeno, na tentativa de identificar a causa de destruição tecidual mais intensa nestas áreas, quando comparadas às lesões cutâneas. Seria esta destruição consequência de particularidades locais (tipo de vascularização que facilita aporte celular, diferenças de condições fisiopatológicas de manutenção dos tecidos), do maior tempo médio de evolução, mais tempo de inflamação? ou da presença concomitante de outros fatores (alergias, periodontites, associação de agentes infecciosos, maior contato com microorganismos)? ou talvez até de alguma condição ainda não evidenciada? A continuidade da caracterização da resposta imune local nestes casos poderá auxiliar a responder a estas questões.

## 8 CONCLUSÕES

- 1- Não houve diferenças significativas entre idade, sexo e história pregressa dos pacientes apresentando lesão de LTA em mucosa oral ou nasal. No entanto, foi possível verificar um menor tempo de evolução e maior identificação de parasitas nas lesões orais.
- 2- Os resultados apresentados sugerem que o processo inflamatório produzido pela infecção das mucosas por parasitas do gênero *Leishmania* se apresenta de forma semelhante nas mucosas orais e nasais. Apenas algumas células como CD8 e neutrófilos apresentavam diferenças na distribuição.
- 3- A comparação entre mucosa nasal doente e clinicamente sadia demonstrou uma maior concentração e distribuição de macrófagos, linfócitos T (CD4 e CD8), linfócitos B e neutrófilos nas mucosas com lesões de LTA. Da mesma forma, observou-se uma maior expressão de CLA, Ki67, Fas e FasL nas lesões. Estes dados indicam que, apesar de ser possível a visualização de atividade de células relacionadas à resposta imune na mucosa clinicamente sadia, a presença de infecção amplifica o aporte e a estimulação, levando à organização do processo inflamatório propriamente dito;
- 4- Foi verificada a presença de células relacionadas à resposta imune em todas as mucosas clinicamente sadias examinadas. Este fato já era esperado devido à organização do sistema imune associado às mucosas. Em 95% do material estudado, as células eram esparsas e distribuídas de forma heterogênea. Este achado confirma a presença constitutiva de células ligadas à resposta imune no tecido mucoso.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.580.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1294p.
- ALLARCYCE, R.A.; BIENENSTOCK, J. The mucosal immune system in health and disease, with an emphasis on parasitic infection. **Bull World Health Org**, v.62, n.1, p.7-25, 1984.
- ALMEIDA, P.V. *et al.* Saliva composition and functions: a comprehensive review. **J Conteporany Dental Practice**, v.9, n.3, p.72-80, Mar, 2008.
- AMATO, V.S.; ANDRADE, J.R.; H.F.; DUARTE, M.I.S. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Trop**, v.85, n.1, p.39-49, Jan, 2003.
- AMERONGEN A. V; VEERMAN, E.C. Saliva: the defender of the oral cavity. **Oral Dis**, v.8, n1, p.12-22, Jan, 2002.
- ANTONSSON, B.; MARTINOU, J.C. The Bcl-2 Protein Family. **Exp Cell Res**, v.256, n.1, p.50-57, Apr, 2000.
- AZEVEDO-COUTINHO, R.B.G. *et al.* First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro state, Brasil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n.7, p.735-737, Jul, 2007.
- BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immunol**, v.70, n.12, p.6734-6740, Dec, 2002.
- BARRAL, A. *et al.* Evaluation of T-cell in the lesions infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.9, n.4, p. 487-497, Jul, 1987.
- BARRAL, A. *et al.* Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am J Trop Med Hyg**, v.47, n.5, p.587-592, Nov, 1992.
- BARRAL, A. *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am J Trop Med Hyg**, v.53, n.3, p. 256-259, Sep, 1995.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.17, n.1, p. 21-28, Jan, 1995.
- BATINNO, M. *et al.* The antioxidant capacity of saliva. **J Clin Periodontol**, v.29, n.3:189-94, Mar, 2002.
- BATISTA, A.C. *et al.* Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis**, v.8, n.5, p.254-260, Sep, 2002.

BATISTA, A.C.; SOARES, C.T.; LARA, V.S. Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4<sup>+</sup> T cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication. **Rev Inst Med Trop S. Paulo**, v.47, n.5, p.267-273, Sep/Oct, 2005.

BAXTER, A. G. The mystery of the disappearing lymphocytes. IN: Germ warfare: breakthroughs in immunology. Editores Allen & Unwin, Sydney, 2000. Capítulo 4, página 68.

BERNARD, A.; BOUMSELL, L. Human leukocyte differentiation antigens. **Presse Med**, v.13, n.38, p.2311-2316, 1984.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETO, M. Leishmaniasis. In: DOER, W; SIFERT, G; VEHLINGER, E. **Trop. Pathol.** 2. ed. Germany: Springer-Verlag, 1995. v.8, cap. 14, p. 597-644.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.86, n.1, p.317-325, Jan/Mar, 1991.

BLANK, C. *et al.* Parasitism of Epidermal Langerhans cells in Experimental cutaneous Leishmaniasis with *Leishmania Major*. **J Infect Dis**, v.167, n.2, p.418-425, Feb, 1993.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunol**, v.2, n.10, p.907-916, 2001.

BOTRELL, R.L. *et al.* Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infect Immunol**. v.69, n.5, p.3232-3239, May, 2001.

BRANDONISIO, O. *et al.* Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. **Parasitologia**, v.43, S.1, p.1s-6s, 2001.

BRASIL **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Elaborado por Jackson Maurício Lopes Costa *et al.* 6. ed. rev. e ampl. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2007. 62 p.

BRUNO S.; DARZYNKIEWIKS, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif**, Oxford, v.25, n.1, p.31-40, Jan. 1992.

CAMPANELLI, A.P. *et al.* Fas-Fas Ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T Lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, v.187, n.8, p.1496-1505, May, 2003.

CARCERES-DITTMAR, G. *et al.* Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reactin. **Clin Exp Immunol**, v.93, n.3, p.500-505, Mar, 1999.

CARVALHO, E.M. *et al.*, Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol**, v.135, n.6, p. 4144-4148, Dec, 1985.

CARVALHO, L.P. *et al.* Differential immune regulation of activated T cell between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol**, v.29, n.5, p. 251-258, Jan, 2007.

CASTÉS, M. *et al.* Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Immunol Immunopathol**, v.27, n.2, p.176-186, May 1983.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A.; RONDON, A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v.57, n.2, p.279-286, Aug, 1984.

CASTÉS, M. *et al.* T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v.26, p.1207-1213, 1988.

CATANZARIO-GUIMARÃES, S.A. **Patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

CHAKOUR, R. *et al.* Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. **Infect Immunol**, v.71, n.9, p.5287-5295, Sep, 2003.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. *et al.* Quantitative study of *Leishmania braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american mucocutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v.79, n.2, p.221-226, Feb, 1990.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. *et al.* The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95), pathway of cytotoxicity. **Eur J Immunol**, v.28, n.1, p.237-245, Jan, 1998.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 32-94.

CRUCHLEY, A.T. *et al.* Bromodeoxyuridine incorporation and Ki67 expression in oral leukoplakia. **Oral Dis**, v.4, n.1, p.9-15, Mar, 1998.

DA-CRUZ, A.M. *et al.* T-cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clin Diag Lab Immunol**, v.9, n.2, p.251-256, Mar, 2002.

DÍAZ, N.L. *et al.* Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. **Exp Dermatol**, v.11, n.1, p.34-41, Feb, 2002.

DÍAZ, N.L. *et al.* Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. **Exp Dermatol**, v.31, n.1, p.114-117, Jan, 2005.

DOMPMARTIN, A. *et al.* *Leishmania major* infect and replicates within epidermal Langerhans cells. **J Invest Dermatol**, v.91, n., p.404, 1988.

DRIJKONINGEN, M. *et al.* Epidermal Langerhans cells, dermal dendritic cells, and keratinocytes in viral lesions of skin and mucous membranes: an immunohistochemical study. **Arch Dermatol Res**, v.280, n.4, p.220-227, 1988.

DUCHROW, M. *et al.* Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki67. **Cell Prolif**, Oxford, v.29, n.1, p.1-12, Jan, 1996.

EL-KOWRANY, S.I. *et al.* The role of Fas system [Fas-FasL] as an inducer of apoptosis in cutaneous leishmaniasis: a combined human and experimental study. **J Egypt Soc Parasitol**, v.31, n.1, p.245-256, Apr, 2001.

ESTERRE, P. *et al.* Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. **Virchows Archiv A Pathol Anat**, v.421, n.3, p. 239-247, Sep, 1992.

ESTERRE, P. *et al.* Immunohistochemical analysis of the mucosal lesion in mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite**, v.1, n.4, p.305-309, Dec, 1994.

FACCHETTI, F. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. **Am J Pathol**, v.154, n.1, p.145-152, Jan, 1999.

FARIA, D.R. *et al.* Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun**, v.73, n.12, p.7853-7859, Dec, 2005.

FIEBIG H, *et al.* Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells. **Allerg Immunol**, v. 30, n.4, p. 242-250,1984.

FOKKENS, W.J. *et al.* CD-1 (T6), HLA-DR-expressing cells, presumably Langerhans cells, in nasal mucosa. **Allergy**, v.44, n.3, p.167-72, Apr, 1989.

FOKKENS, W.J. *et al.* Characterization and quantification of cellular infiltrates in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy, non-allergic patients with nasal polyps and controls. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v.93, n.1, p.66-72, 1990.

FOKKENS, W.J. The nose in leprosy: Immunohistology of the nasal mucosal. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. v.66, n.3, p.328-339, Sep, 1998.

FONSECA, S.G. *et al.* TNF- $\alpha$  mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v.33, n.8, p.2297-2306, Aug, 2003.

GAZE, S.T. *et al.* Mucosal Leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a non balanced monocyte population. **Scand J Immunol**, v.63, n.1, p.70-78, Jan, 2006.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves, D.P., *et al.*, **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.36-53.

- GERDES, J. *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, New York, v.31, n.1, p.13-20, Jan, 1983.
- GIROLOMONI, G. *et al.* Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. **Trends Immunol**, v.23, n.1, p.6-8, Jan, 2002.
- GOLDSBY, R.A., KINDT, T.J.; OSNORNE, B.A. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.
- GONZALES, A. *et al.* Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides braziliensis*-conidia. **Infect Immun**, v.68, p.2546-2552, 2000.
- GREABU, M. *et al.* Could Constitute saliva the first line of defence against oxidative stress. **Rom J Intern Med**. v.45, n.2, p.209-213, 2007.
- GREVERS, G. *et al.* Involvement of inferior turbinate mucosa in chronic sinusitis-localization of T-cell subset. **Allergy**, v.55, n.12, p.1155-1162, Dec, 2000.
- GRIMALDI, G.; TESH, R.B.; MC-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, v.41, n.6 p.687-725, Dec, 1989.
- GUAN, D.W.; OHSHIMA, T.; KONDO, T. Immunohistochemical study on Fas and Fas ligand in skin wound healing. **Histochemical J**, v.32, n.2, p.85-91, Feb, 2000.
- HELLQUIST, H.B. *et al.* Langerhans cells and subsets of lymphocytes in the nasal mucosa. **APMIS**, v.99, n.5, p.449-454, May, 1991.
- IKEDA, F; RAMALHO, L. T. O. Atlas de Odontologia. Parte teórica: Mucosa Bucal: IN: <http://www.foar.unesp.br/Atlas/indice.html>
- ISAZA, D.M. *et al.* Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. **Am J trop Med Hyg**, v.55, n.4, 365-369, Oct, 1996.
- ITO, T. *et al.* Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege, **J Invest Dermatol**, v.125, n.6, p.1139-1148, Dec, 2005.
- JONES, T.C. *et al.* Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J Infec Dis**, v.156, n.1, p.73-83, Jul, 1987.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 1999. p.427.
- KAMINAGAKURA, E. *et al.* Cell proliferation and P53 expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia of oral paracoccidioidomycosis. **Mycoses**, v.49, n.5, p.393-396, Sep, 2006.
- KANAN, M.W.; RYAN, T.J. Endonasal localization of blood borne viable and non viable particulate matter. **British J Dermatol**, v.92, n.4, p.663-673, Apr, 1975.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Mucosa oral. In: **Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 1999. p.79-117.

KENDALL, H.K.; MARSHALL, R.I; BARTOLD, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**. v.7, n.1, p.2-10, Jan, 2001.

KENNER, J.R. *et al.* Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J Cutan Pathol**, v.26, n.3, p.130-136, Mar, 1999.

KHARITNONOV, S.A. *et al.* Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. **J Allergy Clin Immunol**, v.99, n.1, p.58-64, Jan, 1997.

KRÖNCKE, K.D.; FEHSE, K.; KOLB-BACHAFEN, V. Nitric oxide; cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when and where? **Nitric oxide**, v.1, n.2, p.107-120, Apr, 1997.

KUPER, C.F.; JOSJE, H.E.; FERON, V.J. Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. **Toxicology letters**, v.140-141, p.281-285, Apr, 2003.

LAPPIN, D.F. *et al.* Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. **J Clin Periodontol**, v.26, n.3, p.183-189, Mar, 1999.

LAPPIN, D.F. *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J Periodont Res**, v.35, n.6, p.369-373, Dec, 2000.

LEMOS, M.P. MHC Class II Expression restricted to CD8  $\alpha^+$  and CD 11b $^+$  dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. **J Exp Med**, v.199, n.5, p.725-730, Mar, 2004.

LESSA, M.M. *et al.* Mucosal Leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Rev Bras otorrinolaringol**. v.73, n.6, p.843-847, 2007.

LIEW, F.Y. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v.144, n.12, p.4794-4597, Jun, 1990.

LIMA, H.C. *et al.* American cutaneous leishmaniasis: *in situ* Characterization of the cellular immune response with time. **Am J Trop Med Hyg**, v.50, n.6, p.743-747, Jun, 1994.

LIMA, G.M.A.C. *et al.* The role of polymorphonuclear leucocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. **Immunol Letters**, v.64, n.2-3, p.145-151, Dec, 1998.

LISKMANN, S. *et al.* Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implante health and disease. **Clin Oral Implants Res**. v.18, n.1, p.27-33, Feb, 2007.

LOMBARDI, T.; HAUSER, C.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.22, n.5, p.193-202, May, 1993.

LORO, L.L.; JOHANNESSEN A.C.; VINTERMYR, O.K. Decreased expression of Bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. **Oral Oncol**, v.38, n.7, p.691-698, Oct, 2002.

LORO, L.L. *et al.* Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.28, n.2, p.82-87, Feb, 1999.

LOURENÇO, S.V. *et al.* Lupus erythematosus: Clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of the inflammatory infiltrate. **J Cutan Pathol**, v.34, n.7, p.558-564, Jul, 2007.

MALAMUD, D. Salivary diagnostics: the future is now **J. Am Dent Assoc**, v.137, n.3, p.284-286, Mar, 2006.

MALISIUS, R. *et al.* Constant detection of CD2, CD3, CD4 and CD5 in fixed an paraffin embedded tissue using the peroxidase-mediated deposition of biotin-tyamide. **J Histochem Cytochem**, New Brunswick, v.45, n.12, p.1665-1672, Dec, 1997.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.80, n.6, p.859-876, 1986.

MARTÍNEZ-ARENDS, A. *et al.* Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. **Acta Trop**, v.49, n.4, p.271-280, Sep, 1991.

MATEJKA, M. *et al.* Nitric oxide síntesis is increased in periodontal disease. **J Periodont Res**, v.33, n.8, p.517-518, Nov, 1998.

MCALINDEN, R.L. *et al.* Bcl-2 expression in sequential biopsy of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. **Oral Dis**, v.6, n.5, p.318-326, Sep, 2000.

MEGER, M. *et al.* Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor a in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. **Gut**, v.51, n.2, p.155-163, Aug, 2002.

MCGHEE, J.R. *et al.* The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, v.10, n.2, p.75-88, 1992.

MODLIN, R. *et al.* *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v.60, n.2, p.241-248, May, 1985.

MOLL, H. *et al.* Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation the antigen-specific T cell. **Eur J Immunol**, v.23, n.7, p.1595-1601, Jul, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v.329, n.27, p.2002-2012, Dec, 1993.

MOREIRA, J.S. Estudo da laringite leishmaniótica. Dissertação de Mestrado. Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 1994. 129p.

MORIEARTY, P.L. *et al.* Intralesional plasma cells and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v.47, n.1, p.59-64, Jan, 1982.

- MORGADO, F.N. *et al.* Is the *in situ* inflammatory reaction an important toll to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **J Dermatol**, v.158, n.1, p.50-58, Jan, 2008.
- MOSCARDI-BACCHI, M. *et al.* *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycolol**, v.27, n.3, p.149-158, 1989.
- MOTTA, A.C.F. *et al.* Oral leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases. **Oral Dis**, v.13, n.3, p.335-340, May, 2007.
- MURAKI, Y. *et al.* Immunohistochemical detection Fas antigen in oral epithelia. **J Oral Pathol Med**, v.26, n.2, p.57-62, Feb, 1997.
- MURAKAMI, Y. *et al.*, Biological role of an arginine residue present in a histidine-rich peptide wich inhibits hemagglutination of Porphyromonas gingivalis. **FEMS microbial Lett.**v.77.n 1-3, p.201-204, Nov, 1992.
- MURPH, G.F *et al.* Cell membrane glycoproteins and langerhans cells. **Hum Pathol**, v.16, n.2, p.103-112, Feb, 1985.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v. 267, n.1, p.1449-1456, Mar, 1995.
- NASCIMENTO, F.R.F. *et al.* Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol**, v.168, p.593-460, 2002.
- NAVAZESH, M. *et al*, Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. **J Den Res**, v.71, n.7, p.1275-1278, Jul, 1992.
- NEWORAL, E.P.M. *et al.* Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosal and Lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v.21, n.5, p.234-241, Mar, 2003.
- PALMEIRO, M.R. *et al.* Gingival leishmaniasis in an HIV-negative patient. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.104, n.6, p. e12-e16, Dec, 2007.
- PARISE-FORTES, M.R. *et al.* Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. **Clin Labs Invest**, v.154, n.4, p.643-650, Apr, 2006.
- PAWANKAR, R.; OKUDA, M. A comparative study of the characteristics of intraepithelial and lamina propria lymphocytes of the human nasal mucosa. **Allergy**, v.48, n.2, p.99-105, Feb, 1993.
- PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Basic and clinical Immunology**. 1. ed. London: Churchill Livinstone, 1994. 430 p.
- PETIT, M.D. *et al.* Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. **J Periodontol Res**, v.36, n.4, p.214-220, Feb, 2001.

PERCIVAL, R.S; CHALLACOMBW, S.J; MARSH, P.D. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. **J Dent Res**, v.73, n.8, p.1416-1420, Aug, 1994.

PIETRIZAK, E.R.; SAVAGE, N.W.; WALSH, L.J. Human gingival keratinocytes express E-selectin (CD62E). **Oral Dis**, v.2, n.1, p.11-17, Mar, 1996.

PIRMEZ, C. *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest**, v.91, n.4, p.1390-1395, Apr, 1993.

POMPEU, M.L. *et al.* Granulocytis in inflammatory process of balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop**, v.48, n.3, p.185-193, Jan, 1991.

QADOUMI, M. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. **Infect Immunity**, v.70, n.8, p.4638-4642, Aug, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.731.

RIBEIRO-GOMES, F.L. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.172, n.7, p.4454-4462, Apr, 2004.

ROITT, I.V.; BRUSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 2. ed. São Paulo: Malone, 1992. 220p.

ROLAND, N.J. *et al.* Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? **Clin Otolaryngol Allied Sci**, v.19, n.1, p.13-18, Feb, 1994.

SANTAMARIA-BABI, L.F. CLA<sup>+</sup> T cell in cutaneous diseases. **Eur J Dermatol**, v.14, n.1, p.13-18, Jan-Feb, 2004.

SCHUBACH, A. *et al.* Detection of *Leishmania* DNA Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. **J Infec Dis**, v.178, n.3, p.911-914, Sep, 1998.

SERARSLAN, G.; ATIK, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.280, n.1-2, p.147-149, Dec, 2005.

SIQUEIRA Jr, J.F.; DANTAS, C.J.S. Sistema imune e circulatório: aspectos morfofuncionais In: **Mecanismos moleculares e celulares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.29-59.

SOUZA, H.S. *et al.* Distinct patterns of mucosal apoptosis in H pylori-associated gastric ulcer are associated with altered FASL and perforin cytotoxic pathways. **World J Gastroenterol**, v.12, n.38, p.6133-6141, 2006.

STENGER, S. *et al.* Tissue expression of inducible nitric oxide synthases in closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med**, v.180, n.3, p.783-793, Sep, 1994.

STINGEL, G. *et al.* The functional role of Langerhans cells. **J Invest Dermatol**, v.74, n.5, p315-318, May, 1980.

STRÄTER, J. *et al.* CD95 Ligand (CD95L) in normal human lymphoid tissues. A subset of plasma cells are prominent producers of CD95L. **Am J Pathol**, v.154, n.1, p.193-201, 1999.

STREILEIN, J.W., Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. **J Invest Dermatol**, v.80, s.1, p. 12s-16s, Jun, 1983.

SUNDERKÖTTER, C. *et al.* Activated T cells induce expression of E-selectin *in vitro* and in an antigen-dependent manner *in vivo*. **Eur J Immunol** v.26, n.1, p.1571-1579, 1996.

TACCHINI-COTTIER, F. *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4<sup>+</sup> Th2 response in Balb/c mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol**, v.165, n.5, p. 2628-2636, Sep, 2000.

TAPIA, F.J. *et al.* The cutaneous lesions in american leishmaniasis leucocyte subsets cellular interaction and cytokine production. **Biol Res**, v.26, n.1-2, p.239-247, 1993.

TEN CATE, A.R. Histologia Bucal. Desenvolvimento, estruturas e função. Ed. Guanabara Koogan, 5 ed, 2001.

TERAKI, Y. *et al.* In vivo evidence for close association of CLA expression and E-selectin binding by T cells in the inflamed skin. **J Dermatol Sci**, v.36, n.1, p.63-65, Oct, 2004.

THOMSOM, S.J. *et al.* Phenethyl isothiocyanate triggers apoptosis in Jurkat cells made resistant by the overexpression of Bcl-2. **Cancer Res**, v.66, n.13, p.6772-6777, Jul, 2006.

THOUSSAINT, S.; KAMIRO, H., **Non infectious erythenatous papulas and squamous diseases**. In: Lever, W.F. Lever's Histopathology of the skin. 8. ed. Philadelphia: Lippcott-Raven, 1997. Cap.7.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Bcl-2 family: Life-or-death switch. **FEBS Letters**, v.466, n.1, p.6-10, Jan, 2000.

VAN LOON, L.A.J. *et al.* Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin. **J Oral Pathol Med**, v.18, n.4, p.197-201, Apr, 1989.

VAN ZANDBERGEM, G. *et al.* Cutting edge neutrophil granulocyte serum as a vector for *Leishmania* entry into macrophage. **J Immunol**, v.173, n.11, p.6521-6525, Dec, 2004.

VENUPRASAD, K. *et al.* Human neutrophil-expressed CD28 interaction with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN gamma secretion and restriction of *leishmania* growth. **J Immunol**, v.169, n.2, p.920-928, Jul, 2002.

VICENTE, J.C. *et al.* Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.35, n.3, p.140-145, Mar, 2006.

WALTON, L.J. *et al.* Cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) and  $\alpha\beta 7$  integrins are expressed by mononuclear cells in skin and oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.26, n.9, p.402-407, Oct, 1997.

XAVIER, M.B. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: A quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between *L.(L.) amazonensis* and *Viannia* subgenus. **Acta Trop**, v.95, n.1, p.67-73, Jul, 2005.

XU, T. *et al.* Anticandidal activity of major human salivary histatins. **Infect Immun**, v.59, n.8, p.2549-2554, Aug, 1991.

YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; HARA, K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. **Clin Exp Immunol**, v.99, n.3, p.384-391, Mar, 1995.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. Sistema imune, sistema respiratório e tecidos orais. In: **Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.193-248.

ZAPH, C.; SCOTT, P. Th1 cell-mediated resistance to cutaneous infection with *Leishmania major* is independent of P and E-selectins. **J Immunol**, v.171, n.9, p.4726-4732, Nov, 2003.

ZAVALA, W.D.; CAVICCHIA, J.C. Deterioration of the Langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging. **Arch Oral Biol**, v.51, n.12, p.1150-1155, Dec, 2006.

ZIERHUT, M. *et al.* Immunology of the skin and the eye. **Immunol Today**, v.17, n.10, p.448-450, Oct, 1996.

ZITZMANN, N.U. *et al.* Expression of endothelial adhesion molecules in the alveolar ridge mucosa, gingival and periimplat mucosa. **J Clin Periodontol**, v.29, n.6, p.490-495, Jun, 2002.

ZHU, Q. *et al.* Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. **World J Gastroenterol**, v.11, n.39, p.6125-6129, 2005.

**ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E ÉTICA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 11 de novembro de 2005

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0127/05

**Intitulado:** *Análise da resposta imune celular in situ das lesões ativas em mucosa oral e nasal da leishmaniose tegumentar americana*

**do(a) aluno(a):** Mariana Reuter Palmeiro

**Programa de:** Estomatologia Clínica

**do curso de:**

**Nível:** Doutorado

**Orientado pelo(a):** Profa. Dra. Salete Maria Pretto e Profa. Fátima Conceição Silva

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 11 de novembro de 2005.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS*

11 Novembro 2005  
Mariana Reuter Palmeiro

**Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**ANEXO B - OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA PUCRS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 014/2006-CEP

Porto Alegre, 03 janeiro de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Análise da resposta imune celular in situ das lesões ativas em mucosa oral e nasal da leishmaniose tegumentar americana".

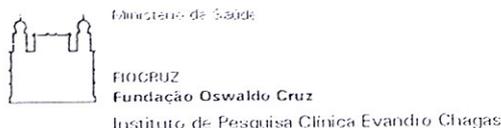
Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Caio Coelho Marques  
COORDENADOR EM EXERCÍCIO

Ilmo(a) Sr(a)  
Dout Mariana Reuter Palmeiro  
N/Universidade

## ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER 011/2006

Rio de Janeiro, 13 de março de 2006

**Deliberação: APROVADO**

**Título do Projeto:** "Análise da resposta imune celular *in situ* das lesões ativas em mucosa oral e nasal da leishmaniose tegumentar americana".

**Protocolo nº CEP:** 0017.0.011.009-06.

**Pesquisador Responsável:** Fátima Conceição-Silva.

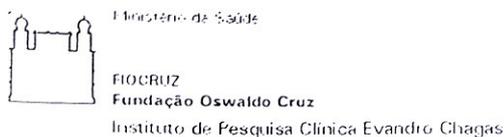
**Instituição:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Este estudo visa a comparar através do método de imunohistoquímica, a formação, composição e distribuição espacial do processo inflamatório *in situ* das lesões ativas em mucosa oral e nasal da Leishmaniose Tegumentar Americana. A amostra será composta de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana, confirmados através da intradermoreação de Montenegro e de pelo menos mais um outro método de diagnóstico laboratorial para a leishmaniose, entre eles: impressão em lâmina, Anatomopatológico, Elisa, Imunofluorescência Indireta e Cultura. Os indivíduos com controle serão aqueles que se submeterem à cirurgia plástica estética ou reparadora na região oral ou nasal. Os pacientes comporão 3 grupos, cada um com 10 a 15 indivíduos com as seguintes características: 1) lesão ativa em cavidade oral; 2) lesão ativa em cavidade nasal; 3) mucosas não relacionadas, oriundas de cirurgias plásticas e ou reparativas. Os dados clínicos serão obtidos do prontuário de atendimento e discutidos com o médico responsável, mantendo-se a cláusula de sigilo. Será desenvolvido numa colaboração entre o Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ e o Ambulatório do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC/FIOCRUZ.

Após análise da viabilidade e dos aspectos éticos do estudo e de acordo com a Resolução 196/96 do CNS-MS, a deliberação deste Comitê foi pela **aprovação** do protocolo de pesquisa apresentado.

Dr.<sup>a</sup> Léa Camillo-Coura  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
IPEC / FIOCRUZ

## ANEXO D - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ



Comitê de Ética em Pesquisa

### PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo 0017.0.011.009-06

#### 1. Identificação:

**Título do Projeto:** "Análise da resposta imune celular *in situ* das lesões ativas em mucosa oral e nasal da leishmaniose tegumentar americana".

**Pesquisador Responsável:** Fátima Conceição-Silva (IOC)

**Instituição Responsável:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ.

**Data de Apresentação ao CEP:** 22/02/2006.

#### 2. Sumário:

Este estudo visa a comparar através do método de imunohistoquímica, a formação, composição e distribuição espacial do processo inflamatório *in situ* das lesões ativas em mucosa oral e nasal da Leishmaniose Tegumentar Americana. A amostra será composta de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana, confirmados através da intradermoreação de Montenegro e de pelo menos mais um outro método de diagnóstico laboratorial para a leishmaniose, entre eles: impressão em lâmina, Anatomopatológico, Elisa, Imunofluorescência Indireta e Cultura. Os indivíduos com controle serão aqueles que se submeterem à cirurgia plástica estética ou reparadora na região oral ou nasal. Os pacientes comporão 3 grupos, cada um com 10 a 15 indivíduos com as seguintes características: 1) lesão ativa em cavidade oral; 2) lesão ativa em cavidade nasal; 3) mucosas não relacionadas, oriundas de cirurgias plásticas e ou reparativas. Os dados clínicos serão obtidos do prontuário de atendimento e discutidos com o médico responsável, mantendo-se a cláusula de sigilo. Será desenvolvido numa colaboração entre o Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ e o Ambulatório do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC/FIOCRUZ.

#### 3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Estrutura do Protocolo: Adequado.

Justificativa de uso de placebo: Não se aplica.

Justificativa de suspensão terapêutica: (wash-out) Não se aplica.

Análise de riscos e benefícios: Adequada.

Retorno de benefícios para o sujeito e/ou para a comunidade: Adequadas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Bem elaborado.

Informação adequada quanto ao financiamento: O projeto conta com suporte financeiro do IOC/FIOCRUZ (parte experimental), IPEC/FIOCRUZ (atendimento ambulatorial e rotina diagnóstica) e CNPq – MS.

## **ANEXO E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido<sup>1</sup>**

**INSTITUIÇÃO:** INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS (IPEC) – FIOCRUZ

**COORDENADOR DA PESQUISA:** ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

**ENDEREÇO:** AV. BRASIL 4365 - MANGUINHOS - RIO DE JANEIRO - RJ - CEP 21045-900

**TELEFONES:** (0xx21) 2598-4260 / 2598-4263 / 2598-4266 FAX (0xx21) 2590-9988

**NOME DO PROJETO DE PESQUISA:** AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA APRESENTANDO LESÕES ATIVAS E CICATRIZADAS

**NOME DO VOLUNTÁRIO:** \_\_\_\_\_

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por parasitas chamados leishmanias e que acomete seres humanos e animais. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, micoses, tuberculose, sífilis, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e, depois de curadas, pode não ser possível diferenciar as cicatrizes através dos exames utilizados de rotina atualmente.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: quais pacientes irão permanecer curados após o tratamento e quais irão reabrir suas cicatrizes ou desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? outras doenças têm sido confundidas e tratadas como LTA? qual o papel dos seres humanos doentes ou aparentemente curados na transmissão da doença?

---

<sup>1</sup> 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Paciente

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC, com o objetivo de avaliar o estado clínico e os exames de laboratório de indivíduos com LTA, em diferentes períodos de evolução, assim como o aspecto microscópico e a presença de leishmanias no sangue e nas lesões de pele ativas ou cicatrizadas comparando-as com amostras de pele sadia e com outras doenças.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte do IPEC. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para avaliar a evolução da sua doença e que este material seja utilizado neste estudo. Também será necessária a sua autorização para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo e para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você vier apresentar referentes ao estudo, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para o

Dr. Armando de Oliveira Schubach ou Dra. Mariza Salgueiro nos telefones acima. Caso você apresente qualquer problema clínico relacionado ao estudo e que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

**Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:**

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de pele doente (lesão ativa ou cicatrizada) ou de pele sadia, para realização de exames para identificar células e outros componentes do organismo, assim como a possível presença de leishmanias.

Quando indicados, outros exames poderão ser realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de ser confundidas com a LTA e para avaliar a resposta do organismo contra as leishmanias: um teste cutâneo (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para LTA na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista cerca de 2 dias após a injeção); e exames de sangue (quantidade equivalente a 2 colheres de sopa).

**Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:**

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, o teste na pele poderá, apresentar uma reação forte com inflamação do local, mais raramente, formação de bolhas e de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto o teste na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

Eventualmente, no local da biópsia, poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Mais raramente a cicatriz poderá reabrir. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos ou de repetir o tratamento para LTA.

**Formas de ressarcimento:**

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço Social do IPEC para pacientes externos.

**Benefícios esperados:**

Espera-se que os exames realizados indiquem que, neste momento, você esteja curado ou necessite de nova investigação ou tratamento. Entretanto, as consultas de retorno regulares por vários anos após o tratamento são indicadas para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

Nome paciente:	Data
Nome médico:	Data
Nome testemunha <sup>2</sup> :	Data
Nome testemunha <sup>2</sup> :	Data

<sup>2</sup> Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

**ANEXO F - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE****TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE**

Eu, FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA, coordenadora e MARIANA REUTER PALMEIRO, aluna do projeto de pesquisa intitulado “ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR IN SITU EM LESÕES ATIVAS EM MUCOSA ORAL E NASAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.”, nos comprometemos a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, serão mantidos em um banco de dados sob nossa responsabilidade.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, 30/10/2005.

---

Fátima Conceição Silva

---

Mariana Reuter Palmeiro

**ANEXO G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –  
CONTROLE SADIO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
Controle sadio**

**Instituição:** Instituto Oswaldo Cruz e Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ

**Título do Projeto:** “Influência da resposta imune *in situ* na evolução de doenças infecto-parasitárias. Estará o fenômeno de morte celular (programada e eventual) envolvido no processo de resolução das lesões?”  
**CEP-IPEC-Fiocruz- 014/2002**

**Investigadores (Pesquisadores):** Fátima da Conceição Silva MD, PhD; Armando Schubach, MD PhD; Antônio Francesconi do Valle, MD PhD; Maria Clara Galhardo, MD PhD; Mônica Barros, MD MSc; Marisa Salgueiro, MD; João Moreira, MD MSc; Regina Lana, MD, PhD; Keila B. F. Marzochi, MD PhD; Álvaro Bertho dos Santos PhD; Fernanda Nazaré Morgado MSc, Mariana Reuter Palmeiro.

Nome do Voluntário:

Eu, ....., declaro que sou voluntário no estudo sobre LEISHMANIOSE, ESPOROTRICOSE E OUTRAS DOENÇAS GRANULOMATOSAS. Fui informado que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre estas doenças. Minha participação será como controle não doente para comparação com os casos de doentes. A minha participação em nada alterará o atendimento e acompanhamento médico que se faz necessário para diagnosticar e tratar meu caso. Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas. Todos os resultados serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos serem divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitido a minha identificação.

Pelo responsável fui informado de que:

- 1- Este documento procura fornecer informações sobre doenças infecciosas da boca e o que será realizado, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. Poderei recusar-me a participar da pesquisa ou, mesmo, dela me afastar em qualquer tempo, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento, e que o acompanhamento clínico, o tratamento e o controle de cura em nada serão modificados pela minha desistência. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos.
- 2- Os investigadores se obrigam a não revelar minha identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como, poderão interromper minha participação, a qualquer tempo, por razões técnico/ médicas quando, então, me serão fornecidos aconselhamentos e orientação.
- 3- Antes de assinar este Termo, devo me informar plenamente sobre o mesmo, não hesitando em fazer perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

A- O problema de saúde objeto da investigação:

A leishmaniose, esporotricose etc são doenças da pele de gravidade variável de acordo com a reação do organismo do doente. Ainda não existe uma forma de prevenção, como vacinas para esta doença.

B- Objetivo da investigação:

O objetivo principal deste trabalho é estudar a resposta imunológica dos pacientes para que possamos deste modo tentar evidenciar um tipo de resposta protetora (benéfica). O conhecimento desta resposta poderá ser importante para se tentar prever a evolução das

doenças e com isto tentar evitar ou minimizar as formas graves. Além disto, o melhor conhecimento destas doenças pode propiciar no futuro o desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.

C- Exames, procedimentos e tratamento que serão utilizados:

Nesta investigação está previsto o estudo da resposta imunológica dos voluntários provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose, esporotricose. Os pacientes voluntários farão um teste na pele (injeção de 0,1 ml), chamado teste de Montenegro, para auxiliar no diagnóstico da doença. Será coletado sangue da veia (20 ml) antes e após o tratamento com antimonial. Este sangue servirá para fazer alguns exames de esclarecimento diagnóstico e também para a pesquisa. Além disso, será retirado um fragmento de biópsia de lesão que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasita, e para o estudo científico. Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para confirmar que estou com Leishmaniose. No meu caso específico será coletada apenas uma amostra de tecido da boca a cirurgia que será realizada por outras causas (retirada de dentes e outras) ou tecido da mucosa nasal (Corneto inferior) por outras causas (septoplastia e turbinectomia) e Exames relacionados à leishmaniose, esporotricose etc.

D- Benefícios:

O estudo da resposta imune em pacientes com leishmaniose tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores imunológicos na evolução da doença. No entanto, mais estudos são necessários para que possamos tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção da Leishmaniose. Estes conhecimentos poderão fornecer importantes contribuições para se prever a evolução desta enfermidade nos indivíduos doentes e, para que possamos estabelecer uma futura vacina para a leishmaniose.

E- Inconvenientes:

Os inconvenientes que possam surgir serão devidos à cirurgia que farei. Nenhuma adição será feita ao procedimento necessário.

F- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:

Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante este trabalho são os rotineiramente usados no meu tipo de tratamento.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo assim como abandonar o estudo caso queira. Declaro dar meu consentimento para participar desta investigação recebendo uma cópia do Termo, estando ciente, ainda, de que uma outra cópia permanecerá registrada nos arquivos do laboratório responsável pela pesquisa.

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha:  
\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do investigador /médico responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)