

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

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 maior parte dos casos humanos é constituído de lesões cutâneas. Contudo, apesar da baixa frequência de lesões mucosas, a extensão da destruição tecidual e a frequência de 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 conseqüência 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*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 TÉCNICAS DE ESTUDO <i>IN SITU</i> : A IMUNO-HISTOQUÍMICA	25
2.1.1 Marcadores de caracterização fenotípica.....	26
2.1.1.1 Linfócitos T e B.....	26
2.1.1.1.1 Linfócitos T (CD3)	27
2.1.1.1.2 Subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8)	27
2.1.1.1.3 Linfócitos B (CD22).....	29
2.1.1.2 Macrófagos (CD68).....	29
2.1.1.3 Polimorfonuclear Neutrófilo (Elastase Neutrofilica)	30
2.1.1.4 Célula de Langerhans (CD1a)	30
2.1.2 Marcadores de caracterização funcional.....	31
2.1.2.1 Ki67	31
2.1.2.2 CLA	33
2.1.2.3 CD62E	33
2.1.2.4 NOS2	33
2.1.3 Marcadores de Regulação de Morte Celular-Apoptose.....	34
2.1.3.1 Fas (CD95) –FasL (CD95L).....	35
2.1.3.2 Bcl-2	36
2.2 A LEISHMANIOSE E SEU AGENTE.....	37
2.2.1 A LTA causada por <i>L. braziliensis</i>	39
2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	40
2.4 A ORGANIZAÇÃO DO TECIDO DA MUCOSA ORAL ENASAL.....	41
2.5 SALIVA E ESUS COMPONENTES.....	45
2.6 A ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ASSOCIADO À MUCOSA	48
2.7 A RESPOSTA IMUNE NA LTA.....	49
2.8 RESPOSTA IMUNE CELULAR <i>IN SITU</i>	56
2.8.1 Estudos na pele	56
2.8.2 Estudos na mucosa	61
2.9 ESTUDOS NO SANGUE PERIFÉRICO E <i>IN SITU</i> DA MUCOSA EM OUTRAS DOENÇAS INFECCIOSAS E INFLAMATÓRIAS	63
3 HIPÓTESE.....	69
4 OBJETIVOS	70

4.1 OBJETIVO GERAL:.....	70
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	70
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
5.1 MATERIAL	71
5.2 MÉTODO	72
5.2.1 Preparação dos Fragmentos Teciduais.....	72
5.2.2 Histopatologia	73
5.2.3 Imuno-Histoquímica.....	73
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
6 RESULTADOS	76
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS	76
6.1.1 Lesões ativas de LTA mucosa nasal e oral	76
6.1.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias.....	81
6.2 HISTOPATOLOGIA	82
6.2.1 Lesões de LTA mucosa nasal e oral	82
6.2.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias.....	83
6.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA – LESÕES ATIVAS DE LTA E TECIDO CLINICAMENTE SADIO EM MUCOSA NASAL E ORAL	85
6.3.1 Lesões de LTA em mucosa nasal e oral	85
6.3.1.1 Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Quadro 4 e Gráfico 1).....	85
6.3.1.2 Perfil quantitativo e qualitativo de células de Langerhans (Quadro 4 e Figura 5f).....	87
6.3.1.3 Marcadores de inflamação (Quadros 4 e 5, Figuras 3,4,5,6,7 e Gráfico 1).....	88
6.3.2 Mucosas nasal e oral clinicamente sadias.....	99
6.3.2.1 Perfil quantitativo e qualitativo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Quadro 6 e Gráfico 2).....	99
6.3.2.2 Perfil quantitativo e qualitativo de células de Langerhans (Quadro 6)	101
6.3.2.3 Marcadores de inflamação (Quadros 6 e 7).....	101
6.3.3 Comparação entre lesão e o tecido clinicamente sadio em mucosa nasal.....	111
6.3.4 Comparação entre lesão e o tecido clinicamente sadio em mucosa oral.....	115
6.3.5 Detecção de parasitas	119
7 DISCUSSÃO	120
8 CONCLUSÕES.....	130

REFERÊNCIAS	131
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS.....	142
ANEXO B - OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA PUCRS	143
ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ....	144
ANEXO D - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FIOCRUZ	145
ANEXO E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	147
ANEXO F - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE	152
ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE SADIO.....	153

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 Intradermoreação 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.

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.