

MARIANA DO SOCORRO MACIEL QUARESMA

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE
LANGERHANS PURIFICADAS DA EPIDERME DE
CAMUNDONGO BALB/c, APÓS INTERAÇÃO *in vitro*
COM *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania*
(Leishmania) amazonensis.

BELEM - PA

2003

MARIANA DO SOCORRO MACIEL QUARESMA

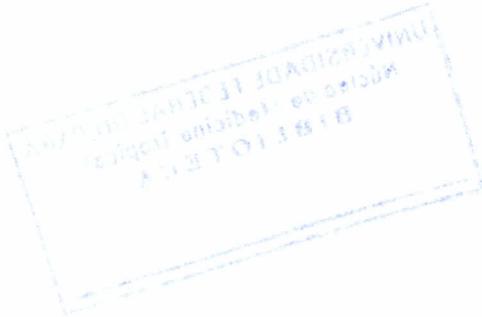


**ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE
LANGERHANS PURIFICADAS DA EPIDERME DE
CAMUNDONGO BALB/c, APÓS INTERAÇÃO *in vitro*
COM *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania
(Leishmania) amazonensis*.**

BELEM - PA

2003

acervo 136528
exemplar 202-111



Quaresma, Mariana do Socorro Maciel

Análise Morfológica das Células De Langerhans Purificadas Da Epiderme De Camundongo Balb/C, Após Interação *In Vitro* Com *Leishmania (Viannia) Braziliensis* E *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*/Mariana do Socorro Maciel Quaresma.—Belém:UFPA/ Núcleo de Medicina Tropical, 2003.

ix, 34f.:il.; 1 cm .

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado

Dissertação (mestrado) – UFPA/ Núcleo de Medicina Tropical/Clinica de Doenças Tropicais, 2003.

Referências bibliográficas: f. 37-43

1. Leishmaniose tegumentar americana (LTA). 2. Etiologia. 3. Epidemiologia. 4. A Célula de Langerhans. 5. Imunopatogenia. 6. Aspectos Clínicos. 7. Diagnostico Laboratorial-Tese. I. Salgado, Cláudio Guedes. II. Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Clínica de Doenças Tropicais. III Título.

MARIANA DO SOCORRO MACIEL QUARESMA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE
LANGERHANS PURIFICADAS DA EPIDERME DE
CAMUNDONGO BALB/c, APÓS INTERAÇÃO *in vitro*
COM *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania*
*(Leishmania) amazonensis***

Dissertação submetida ao Curso de Mestrado em
Clínica de Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina
Tropical da UFPa como requisito para obtenção do
título de Mestre em Clínica das Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado

BELÉM - PA

2003

616.9364
Q1a
DIS

MARIANA DO SOCORRO MACIEL QUARESMA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS
PURIFICADAS DA EPIDERME DE CAMUNDONGO BALB/c, APÓS
INTERAÇÃO *in vitro*, COM *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania
(Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Clínica das Doenças Tropicais.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira
Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. José Luis Vieira
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito (Suplente)
Universidade Federal do Pará

Julgado em: 29/12/2003

Conceito: 9,0

BELEM
2003



*Ao meu esposo Mauro e minha filha Mariana, por sua
compreensão, incentivo e amor.*

*À minha família, em especial ao meu pai e minhas irmãs
Viviana e Vitorina que sempre se fizeram presentes,
incentivando-me na conclusão deste objetivo.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
1.1 CONCEITO.....	10
1.2 ETIOLOGIA	10
1.2.1 Posição Taxonômica (Lainson, 1997).....	10
1.2.2 Principais Espécies De Leishmanias Envolvidas Na Leishmaniose Tegumentar Americana No Brasil	10
1.2.3 Biologia.....	12
1.2.4 Ciclo Evolutivo No Flebotomíneo	12
1.2.5 Ciclo Evolutivo No Hospedeiro Vertebrado	12
1.3 EPIDEMIOLOGIA	13
1.4 A CÉLULA DE LANGERHANS.....	16
1.4.1 Função da Célula de Langerhans na Leishmaniose	17
1.5 IMUNOPATOGENIA	18
1.6 ASPECTOS CLÍNICOS	19
1.6.1 Classificação Clínica e Imunopatológica	20
1.6.1.1 Leishmaniose Cutânea Localizada.....	20
1.6.1.2 Leishmaniose Cutâneo-Mucosa	20
1.6.1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica	21
1.6.1.4 Leishmaniose Cutânea Disseminada Boderline	21
1.7 DIGNÓSTICO LABORATORIAL	22
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVO.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 METODOLOGIA	23
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	23
4.2 PARASITOS	24
4.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS	24
4.4 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS COM <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	25
4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS	25
4.5.1 Microscopia Óptica Comum	25
4.5.2 Microscopia Eletrônica De Transmissão	25
4.5.3 Microscopia Eletrônica De Varredura.....	26
5 RESULTADOS.....	26
6 DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo evolutivo da <i>leishmania</i>.	13
FIGURA 2. Percentual de municípios atingidos pela Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, por regiões, de 1994 a 1998.	14
FIGURA 3. Coeficiente de detecção de casos autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes no Brasil, de 1985 a 1999.	15
FIGURA 4. Células de Langerhans recém-isoladas e avaliadas por diferentes técnicas.	27
FIGURA 5. Células de Langerhans coradas com Giemsa após 12 horas de cultivo sem a presença de <i>leishmanias</i>.	28
FIGURA 6. Células de Langerhans coradas com Giemsa após 12 horas de cultivo com <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>.	29
FIGURA 7. Células de Langerhans coradas com Giemsa após 12 horas de cultivo com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.	29
FIGURA 8. Célula de Langerhans observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 12h de cultivo, sem a presença de <i>leishmanias</i>.	30
FIGURA 9: Célula de Langerhans observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 12 horas de cultivo com <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>. ...	31

RESUMO

Células de Langerhans (CL) são células apresentadoras de antígenos, MHC classe II positivas, que constituem 2 a 3% de todas as células da epiderme, e que têm demonstrado serem estimuladoras de uma resposta vigorosa de linfócitos T contra *Leishmania major*. A leishmaniose cutânea do Novo Mundo é causada por diferentes espécies, apresentando formas clínicas diversas, variando de leishmaniose cutânea localizada à leishmaniose cutâneo-mucosa e leishmaniose cutânea difusa anérgica. Utilizando a técnica de "panning", CL da epiderme de camundongos BALB/c foram purificadas para em torno de 95% de pureza (pCL) em relação à outras células da epiderme. As CL recentemente isoladas apresentaram dendritos pequenos e delicados e os clássicos grânulos de Birbeck. Tem sido sugerido que os parasitos do subgênero *Viannia* e *Leishmania*, que são geneticamente bastante distintos, podem ter respostas espécie-específicas na resposta imune celular. Neste estudo, pCL e *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* foram cultivados e a morfologia das CL foi analisada após 12 ou 36h de cultura. Utilizando a coloração de Giemsa e a microscopia eletrônica de varredura, alterações morfológicas diferentes foram detectadas nas CL após 12h de cultivo nas duas culturas, CL e *L. (V.) braziliensis* ou CL e *L. (L.) amazonensis*. Depois da interação com *L. (V.) braziliensis* as CL tornaram-se mais dendríticas, que eram mais curtos quando comparados às CL cultivadas isoladamente. Em contraste, após a interação com *L. (L.) amazonensis*, as CL tornaram-se arredondadas com algumas células mostrando alguns dendritos. Além disto, verificou-se um contato íntimo entre o flagelo das promastigotas com as CL, mas sem observar a fagocitose das leishmanias após 12 ou 36h de cultivo, o que é diferente dos relatos da literatura com CL e *L. major*. Estes resultados sugerem que a resposta imune primária das CL contra as diferentes espécies de leishmania podem ser distintas de acordo com a espécie envolvida no processo de interação.

ABSTRACT

Langerhans Cells (LC) are MHC class II positive antigen-presenting cells that constitute 2-3% of all epidermal cells, which have been demonstrated to stimulate a vigorous T-cell response to *Leishmania major*. New World cutaneous leishmaniasis is caused by different species, presenting diverse clinical pictures, varying from cutaneous localized to mucous or anergic disease. Using a "panning" technique, murine (Balb/c) epidermal LC were purified to around 95% purity (pLC). The freshly prepared LC (fLC) presented small, delicate dendrites and the classic Birbeck granules. Parasites of the subgenera *Viannia* and *Leishmania*, which are genetically very distinct, have been suggested to have a possible species-specific response in cell mediated immunity. In this study, pLC and *L. (V.) braziliensis* or *L. (L.) amazonensis* were cultured and their morphology were analyzed after 12h or 36h culture. Using Giemsa stain and scanning electron microscopy, different morphologic changes were detected on LC after 12h culture on both cultures, LC and *L. (V.) braziliensis* or LC and *L. (L.) amazonensis*. After interaction with *L. (V.) braziliensis*, LC became more dendritic, that were smaller in length when compared to LC cultivated alone. In contrast, after interaction with *L. (L.) amazonensis*, LC became round shaped with a few cells showing some dendrites. Moreover, there was a close contact between the promastigotes flagelli and LC, but without phagocytosis in 12h or 36h culture, what is different of the observations found in the literature on the interaction between LC and *L. major*. These results suggest that LC primary response against different species of *Leishmania* could be distinct upon the species involved in the interaction process.

INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, crônica, causada por protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida por insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, caracterizada por um amplo espectro de formas clínicas, que varia de acordo com a espécie do parasita e com a resposta imune celular do hospedeiro (PEARSON & SOUZA, 1996).

1.2 ETIOLOGIA

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário do gênero *Leishmania*, que possui um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Possui em seu ciclo evolutivo duas formas básicas, a forma amastigota, encontrada no mamífero e a forma promastigota, encontrada no vetor.

1.2.1 Posição Taxonômica (Lainson, 1997)

Reino PROTISTA Haeckel 1866

Sub-Reino PROTOZOA Goldfuss 1817

Filum SARCOMASTIGOPHORA Honigbreg e Balamuth 1963

Sub-Filum MASTIGOPHORA Deising 1866

Classe ZOOMASTIGOPHORA Calkins 1909

Ordem KINETOPLASTIDA Honingberg 1963

Sub-Ordem TRYPANOSOMATINA Kent 1880

Família TRYPANOSOMATIDAE Doflein 1901, emend Grobben 1905

Gênero *Leishmania* Ross, 1903

1.2.2 Principais Espécies De Leishmanias Envolvidas Na Leishmaniose Tegumentar Americana No Brasil

Até o momento, sete espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA

(LAINSON, 1997; SILVEIRA, 2002; GONTIJO & CARVALHO, 2003) Em seguida, são descritas algumas características de cada espécie:

A - *Leishmania (Viannia) braziliensis*: é a espécie mais prevalente no homem e pode causar lesões cutâneas e mucosas. Esta espécie é encontrada em todas as zonas endêmicas do país, desde o norte até o sul, sendo que em áreas de colonização antiga está geralmente associada a presença de animais domésticos, sendo transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Psychodopigus wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*, dentre outras.

B - *Leishmania (Viannia) guyanensis*: causadora de lesões cutâneas. Ocorre em locais à margem do Rio Amazonas em áreas de colonização recente, estando associada a marsupiais. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são a *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia whitmani*.

C - *Leishmania (Viannia) naiffi*: ocorre na Amazônia, nos estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu como reservatório natural. O parasita causa LTA de evolução benigna e seus principais vetores são a *Lutzomyia squamiventris*, *Lutzomyia paraensis* e *Lutzomyia ayrozae*.

D - *Leishmania (Viannia) shawi*: Responsável por casos ocorridos no Amazonas e Pará, tendo como reservatório vários animais silvestres como macacos e preguiças e como vetor *Lutzomyia whitmani*.

E - *Leishmania (Viannia) lainsoni*: observada apenas na Amazônia, tem como animal suspeito de reservatório a paca e como vetor *Lutzomyia ubiquitalis*.

F - *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: agente etiológico de LTA, incluindo a forma anérgica ou leishmaniose cutâneo-difusa. Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a *Lutzomyia flaviscutelata* e *Lutzomyia olmeca* são os principais vetores.

G - *Leishmania (Viannia) lindenbergi*: Observada em Belém, estado do Pará, adquirida em áreas próximo a florestas primárias, é bem diferenciada das outras espécies através de eletroforese de enzimas e técnica envolvendo anticorpos monoclonais. O vetor é a *Lutzomyia antunesi*, com possibilidade de existirem outros vetores.

1.2.3 Biologia

O gênero *Leishmania* possui duas formas em seu ciclo evolutivo, a forma amastigota no hospedeiro mamífero e a forma promastigota no vetor. A forma promastigota possui o corpo alongado, medindo 15-26 μ m em comprimento e 2-3 μ m em largura, é bastante móvel, dotada de um flagelo no pólo anterior, com capacidade de sobreviver à temperatura ambiente de 22°C a 26°C, é encontrada no intestino das fêmeas de flebotomíneo, sendo a forma infectante para o homem. A forma amastigota é encontrada no interior das células mononucleares, possui um diâmetro de 2-3 μ m, sobrevive a temperatura corporal dos mamíferos e é a forma infectante para o flebotomíneo (PEARSON & SOUSA, 1995).

1.2.4 Ciclo Evolutivo No Flebotomíneo

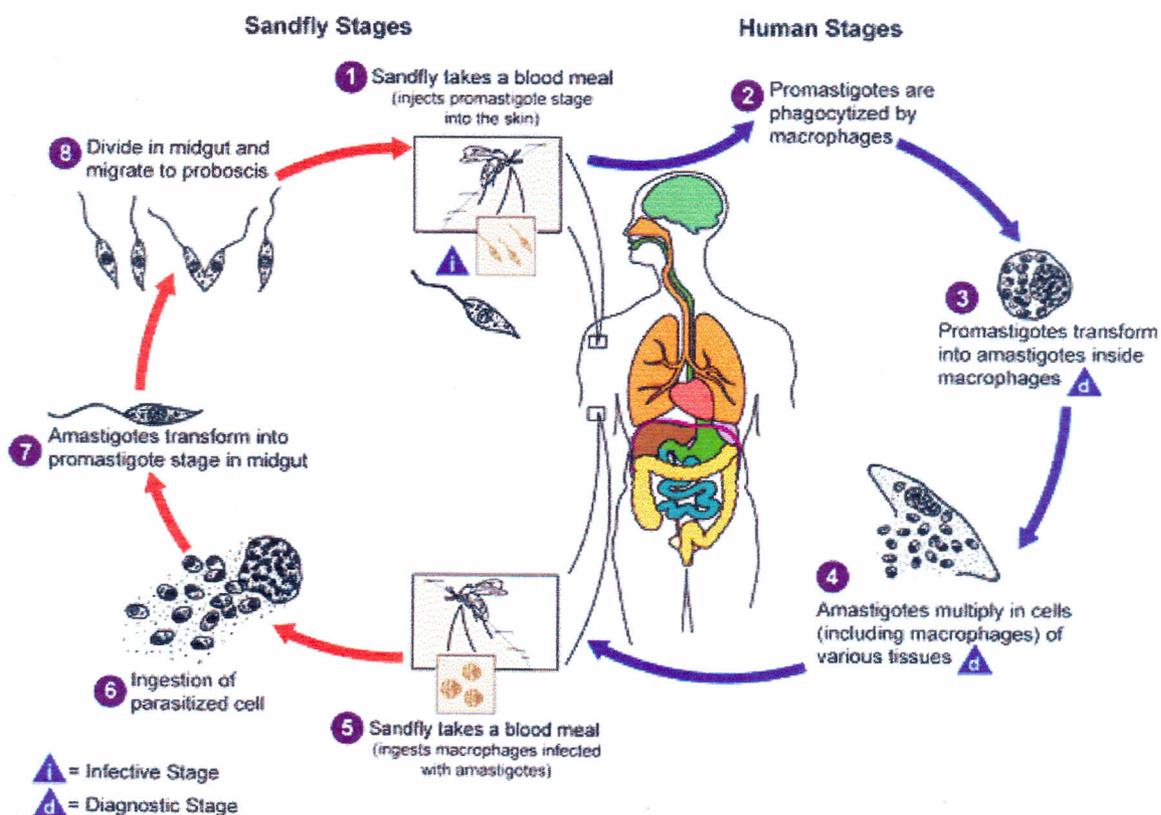
O ciclo inicia quando a fêmea de flebotomíneo, que é hematófaga, suga o sangue de um animal infectado, ingerindo parasitas sob a forma amastigota, situados na pele ou na circulação sanguínea. Após a ingestão, esses parasitos vão para o tubo digestivo do inseto e as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicando-se por divisão binária, assexuada, em seguida migram para a probóscida do inseto deixando-o apto a infectar novo hospedeiro (Figura 1). Baseado no comportamento do parasito no intestino do flebotomíneo, as espécies de *Leishmania* foram agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania*, quando as formas promastigotas desenvolvem-se no intestino anterior e médio e *Viannia*, quando o desenvolvimento ocorre no intestino anterior, médio e posterior (LAINSON, 1997).

1.2.5 Ciclo Evolutivo No Hospedeiro Vertebrado

A fêmea de flebotomíneo infectada por ocasião do seu repasto sanguíneo, inocula as formas promastigotas na pele do hospedeiro. Estas são fagocitadas por macrófagos da pele, transformando-se em formas amastigotas no interior de fagossomas, multiplicando-se por divisão assexuada, resultando em rompimento da célula e liberação de formas amastigotas na corrente sanguínea, que serão fagocitadas por célula mononucleares, principalmente macrófagos. O flebotomíneo, por ocasião do um repasto sanguíneo, ingere macrófagos infectados com formas

amastigotas, iniciando dessa forma o ciclo evolutivo do vetor (Figura 1) (MARCHESE *et al.* 1996).

FIGURA 1. Ciclo evolutivo da *leishmania*.



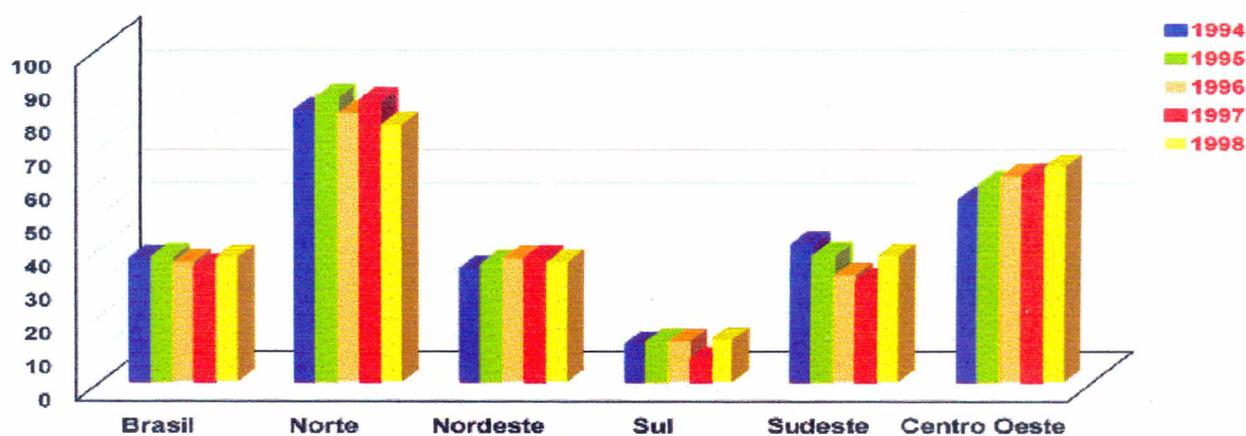
1.3 EPIDEMIOLOGIA

É uma doença de importância mundial, ocupando o segundo lugar nas doenças causadas por protozoários, sendo precedida apenas pela malária. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose ocorre em 88 países, porém sua notificação compulsória ocorre em apenas 30 países, sendo a incidência de difícil avaliação pela falta de registro e notificação em diversas localidades. Em 1990 a OMS estimou que 350 milhões de pessoas encontravam-se em risco de infecção e aproximadamente 120 milhões de pessoas foram infectadas (LAINSON, 1997).

A distribuição da leishmaniose nas Américas varia desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo o foco mais importante o sul-americano, com exceção de Chile e Uruguai, onde não há casos notificados.

No Brasil, houve aumento da incidência nos últimos 20 anos, com surtos no Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e mais recentemente na Região Amazônica, relacionado ao processo de colonização. Nos últimos 15 anos, de 1985 a 1999, foram registrados 388.155 casos autóctones de LTA, com um aumento no coeficiente de detecção de 10,45 casos por 100.000 habitantes para 18,63 casos por 100.000 habitantes, sendo este fato atribuído a uma melhora no fluxo de informações (Figura 2). Somente no ano de 2001 foram diagnosticados 37.064 casos. No estado do Pará, entre 1991 a 2001, foram diagnosticados 10.300 casos (FUNASA, 2000).

FIGURA 2. Percentual de municípios atingidos pela Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, por regiões, de 1994 a 1998.

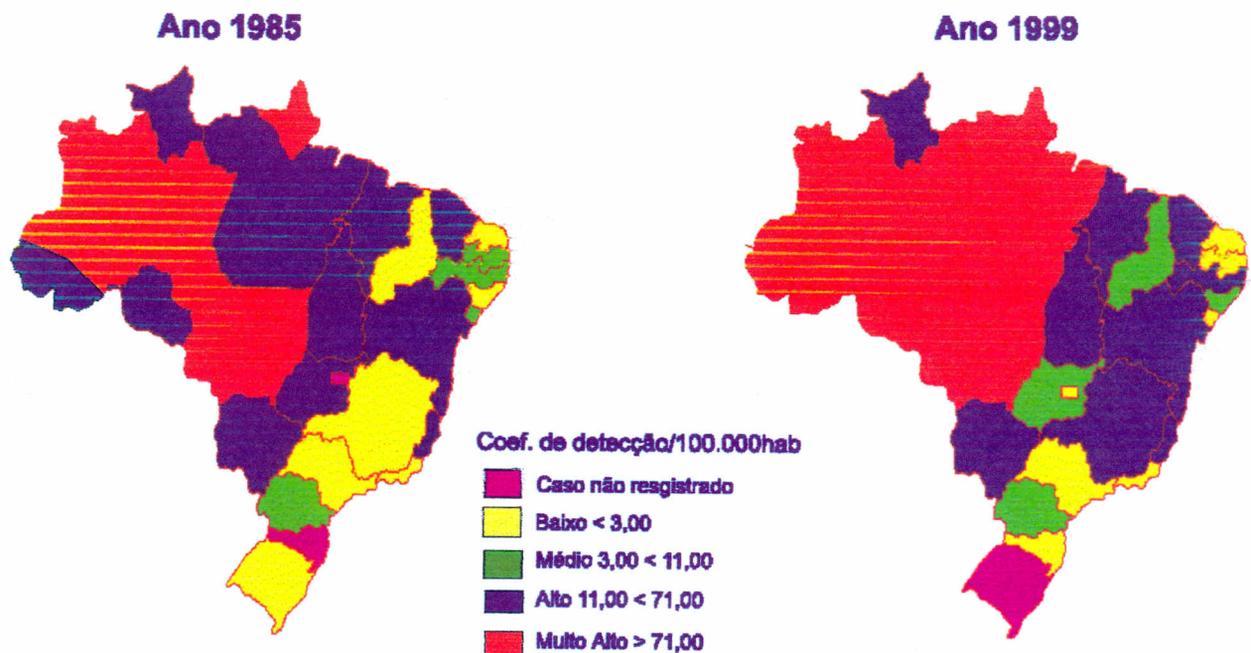


Fonte: FUNASA, 2001

A LTA no Brasil tem uma expressão geográfica crescente, sendo que no ano de 1994 foram registrados casos em 1861 municípios, representando 36,9% do total de municípios brasileiros. A doença tem uma magnitude ampla e quando são comparados os anos de 1985 e 1999, observa-se um aumento no coeficiente de detecção na Região Norte, com mais de 71 casos por 100.000 habitantes, sendo o

Pará considerado um estado com um nível de endemia muito alto (Figura 3) (FUNASA, 2000).

FIGURA 3. Coeficiente de detecção de casos autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes no Brasil, de 1985 a 1999. Note que o estado do Pará passa de uma endemia alta para uma endemia muito alta.



Fonte: FUNASA, 2001

Não há predileção por sexo ou raça, porém a doença acomete mais indivíduos do sexo masculino, pelo fato de estarem mais envolvidos em trabalhos como garimpagem, extração de madeiras, carvão vegetal e mineração em áreas de floresta, o que aumenta o risco de exposição ao vetor. É importante lembrar que em algumas áreas há transmissão domiciliar, como locais onde a expansão urbana aproximou a população dos vetores (MARCHESE *et al.*, 1996).

No Brasil, a grande maioria dos casos de leishmaniose possui como agente etiológico a *Leishmania (V.) braziliensis*, diferindo da Região Amazônica onde

encontramos infecções pelos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Em algumas regiões como o Amapá e o norte do Pará há o predomínio de *L. (V.) guyannensis*, enquanto que na zona bragantina é mais comum a infecção por *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA *et al.*, 1998).

A *L. (L.) amazonensis* é uma das espécies de *Leishmania* de maior interesse médico, com distribuição principal na Bacia Amazônica, tendo como vetor o flebotômíneo *Lutzomyia flaviscutelata* e como principais reservatórios os marsupiais e os roedores do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* (SILVEIRA *et al.*, 1997).

As espécies de flebotômíneos conhecidas são mais de 400, distribuídas em região neotropical, com 13 espécies envolvidas na transmissão da doença, das quais as mais comuns são *Lutzomyia flaviscutelata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca* para a *L.(L.) amazonensis* e *Psychodopigus wellcomei* para a *L.(V.) braziliensis* (FUNASA, 2002).

1.4 A CÉLULA DE LANGERHANS

A pele possui uma potente capacidade acessória de iniciar a resposta imune primária, através da ação das células de Langerhans (CL). Sua distribuição na pele é topograficamente variável, sendo mais abundante na cabeça, pescoço, tronco e membros e em menor número nas regiões palmo-plantares, genitais e sacro-coccígea (MOMMAOS *et al.*, 1995). Esta célula está envolvida na fagocitose de organismos pequenos (2 - 5µm), como *Stafylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, micobactérias, leveduras e *Leishmania (L. major)*. Uma das propriedades mais importante das CL é a sua função como célula apresentadora de antígenos, como haptenos e proteínas, que geram resposta mediada por células T auxiliares e supressoras (MOLL *et al.*, 1993).

As CL foram inicialmente descritas por Paul Langerhans em 1868, como células dendríticas localizadas na epiderme, que poderiam funcionar como receptores de sinais extracutâneos para o sistema nervoso (DE PANFILIS, 1988). Depois de mais de um século, foi demonstrado que as CL se originam na medula óssea, de onde migram para a epiderme, compondo 2 a 3% de todas as células, apresentam dendritos

finos e delicados, e possuem uma organela ultraestrutural característica, conhecida como grânulo de Birbeck, além de serem as únicas células epidérmicas que expressam MHC classe II *in situ* (TAMAKI *et al.*, 1979). São células com superfície irregular, mitocôndria densa e núcleo irregular (STEINMAN & NUSSENZWEIG, 1980).

As CL migram para os linfonodos com a finalidade de apresentar antígenos e possuem uma função crucial na resposta imune celular primária e secundária, dependente de linfócitos T. São usualmente conhecidas como células interdigitais na zona T dos linfonodos (PICKER & SIEGELMAN, 1993). Durante esta migração, as CL aumentam a expressão de MHC classe II, perdem os grânulos de Birbeck e melhoram a sua capacidade em apresentar antígenos, possuindo então uma morfologia bastante dendrítica, quando comparadas às CL localizadas na epiderme. O aumento da quantidade e do comprimento dos dendritos nas CL tem sido correlacionado a sua capacidade em apresentar antígenos a linfócitos T nos linfonodos (DEMIDEM *et al.*, 1991).

Recentemente, tem sido demonstrado que diferentes agentes externos, como a radiação ultra-violeta (RATTIS *et al.*, 1998) e produtos químicos (FORSEY *et al.*, 1998) têm a capacidade de induzir alterações morfológicas importantes, como a diminuição do comprimento dos dendritos das CL e a alteração da superfície celular com a diminuição do aspecto rugoso conferido pelos dendritos, o que tem sido associado a sinais de apoptose, como a expressão do antígeno Fas (CD95), que após contato com o seu receptor Fas ligante e interferon- γ (IFN- γ), inicia o processo de apoptose (KAWAMURA *et al.*, 2000).

1.4.1 Função da Célula de Langerhans na Leishmaniose

Após a penetração dos parasitos na pele, os macrófagos fagocitam as leishmanias, as apresentam ao linfócito T e ativam a secreção de citocinas, desenvolvendo um padrão de resposta celular do tipo Th1 ou Th2. As CL também encontram-se presentes na pele juntamente com os macrófagos, porém talvez a fagocitose não seja a sua função mais importante e sim o processamento de antígenos para posterior apresentação à célula T (MOLL, 1993).

Após a infecção há uma migração de CL da epiderme para a derme, com aumento do número de CL parasitadas por *L. major* na derme e redução do número de células da epiderme, sugerindo que elas migram para a derme após a fagocitose e posteriormente aos linfonodos, onde cumprirão a sua função de células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T. Durante a migração, as CL desenvolvem o papel de células apresentadoras de antígenos com habilidade para iniciar uma resposta imune. Em seguida, observam-se células T ativadas contra antígenos específicos de *L. major* migrando via sanguínea para a lesão (MOMMAOS *et al.*, 1993; MOLL, 1993).

Assim, podemos considerar que a CL tem capacidade para apresentar o antígeno para os linfócitos T com alta eficiência, possuindo habilidade para induzir a ativação primária de resposta imune celular específica, sendo o envolvimento da CL nessa fase inicial da infecção um pré-requisito para uma boa resposta imune em uma fase mais tardia da infecção, pelo fato de ser possível um aumento do número de células T de memória, sendo que isto pode ser imperativo para uma resposta imune celular efetiva (PÉGUET-NAVARRO *et al.*, 1993).

Além de serem poucos os trabalhos que enfatizam a resposta da CL na leishmaniose, eles só se referem a *L. major* e sua participação na manutenção da resposta imune, porém não há trabalhos mostrando o comportamento de CL em interação com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, agentes encontrados em **nossa região**.

Em estudo realizado por Blank *et al.*, 1993 com CL recém-purificadas e *L. major*, observou-se a presença de amastigotas em CL, porém não havia formas promastigotas como nos macrófagos. Observou-se ainda duas formas amastigotas com um fagossoma indicando mitose intracelular, sugerindo replicação no interior de CL. Após 9 horas de cultura essa visualização caiu para menos de 90% e após mais de 12 horas não se observava mais o parasita (BLANK *et al.*, 1993).

1.5 IMUNOPATOGENIA

Após a inoculação da forma promastigota na pele do hospedeiro, ocorre grande infiltração predominantemente de macrófagos no local da infecção para fagocitar o parasito. Esse processo é mediado por citocinas como TNF α e IL-1, e por ser a porta de entrada na leishmaniose, a pele é de fundamental importância para a

resposta imune no estágio inicial da doença (MOOL *et al.*, 1993; BLANK *et al.*, 1993).

Os receptores presentes na membrana dos macrófagos, como o receptor para manose-fucose e o CR3, estão envolvidos na penetração do parasito nas células, sendo os glicoconjugados ligantes presentes na superfície dos parasitos apontados como moléculas responsáveis por esse evento. Após interação e endocitose das formas promastigotas do parasito pelos macrófagos, elas transformam-se em amastigotas, multiplicam-se nos fagolisossomas, rompem a célula, são liberados na corrente sanguínea e invadem novos mononucleares. Além dos macrófagos da derme, outras células da pele possuem receptores CR3, como as CL, que também são infectadas por *L. major*. O contato da forma promastigota com o macrófago desencadeia a destruição de muitos parasitos através de um processo oxidativo (LOLESLEY *apud* XAVIER, 2001).

Após a fagocitose, haverá a apresentação dos antígenos do parasito aos linfócitos T CD4, originando uma resposta imune celular do tipo Th1 com produção de IL-1, IL-12 e IFN γ ou um padrão de resposta imune do tipo Th2 com produção de IL-4, IL-10 e IL-13 (ROGERS *et al.*, 2002).

Foi observado que em camundongos infectados com *L. major* resistentes à infecção, ou seja, que desenvolvem resposta Th1 (produção de IFN γ e IL-2), os macrófagos são estimulados a destruir o parasita. Por outro lado, quando se bloqueia o IFN γ , há uma exacerbação do curso da infecção com evolução para resposta Th2. Nos camundongos sensíveis à infecção, a IL-4 pode bloquear a atividade do IFN- γ na destruição do parasita, ao passo que quando se neutraliza a IL-4 há evolução para resposta Th1 e cura da doença (MOOL *et al.*, 1995).

1.6 ASPECTOS CLÍNICOS

Clinicamente, a doença se caracteriza por lesão cutânea, mucosa ou cutâneo-mucosa. O número de lesões caracteriza a forma da leishmaniose, podendo ser: localizada (lesão única ou múltipla), disseminada (muitas lesões em várias regiões do tegumento) ou difusa (MARCHESE *et al.*, 1993).

1.6.1 Classificação Clínica e Imunopatológica

1.6.1.1 *Leishmaniose Cutânea Localizada*

O agente etiológico mais relacionado a essa forma, nas Américas, é a *L. (V.) braziliensis* e em alguns casos a *L. (L.) amazonensis*. Dependendo do padrão de resposta imunológica mediada por células Th1 ou Th2, pode haver até cura espontânea, porém alguns casos requerem tratamento. Geralmente há um predomínio de resposta imune Th1 (CÁCERES-DITTIMAR *et al.*, 1993; PIRMEZ *et al.* 1993; CARVALHO *et al.*, 1995 **apud** SILVEIRA, 2001).

De acordo com o padrão imunológico, uma infecção não controlada por mecanismos imunes, poderá polarizar para um polo hipersensitivo, caracterizado clinicamente pela Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM) ou para um polo hiposensitivo, caracterizado clinicamente pela Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica (LCDA). Esse desvio no curso da infecção para um ou outro polo é também influenciada pelos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania* (SILVEIRA, 2001). As lesões cutâneas são caracterizadas pela presença de uma ou mais úlceras com bordos elevados, assemelhando-se a uma moldura, seu fundo é granuloso e limpo, são geralmente indolores, mas pode haver infecção secundária mudando todo o aspecto da lesão. Essa lesão é acompanhada de adenopatia satélite, podendo fistulizar (SCHECHETER & MARANGONI, 1998).

1.6.1.2 *Leishmaniose Cutâneo-Mucosa*

O agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis* com resposta imune celular predominantemente Th1, tendo uma boa resposta ao tratamento (SILVEIRA, 2002).

Essa forma é geralmente secundária à forma cutânea, surgindo após resolução do quadro cutâneo, muitas vezes não se identificando a porta de entrada, podendo ser de origem subclínica, atingindo preferencialmente as vias aéreas superiores, podendo também ser acometidos faringe, laringe e cavidade oral (MARCHESE *et al.*, 1996).

O quadro clínico é composto por obstrução nasal, epistaxe, odinofagia, rouquidão, tosse e lesões na cavidade oral. Ao exame físico podemos observar infiltração, ulceração, perfuração do septo nasal, lesões ulceradas, vegetantes,

crostosas ou destrutivas, de acordo com o estágio da infecção. A extensão da lesão não tem relação com o tempo de evolução, existindo lesões que em poucos meses levam à perfuração de septo. Esse quadro clínico, associado com história de úlcera de longa evolução ou cicatriz cutânea reforça o diagnóstico, porém a ausência de cicatriz não afasta o diagnóstico. Na forma cutâneo-mucosa existem lesões em diferentes estágios de evolução, sugerindo disseminação hematogênica (SCHECHETER, 1998).

1.6.1.3 *Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica*

É causada pela *L. (L.) amazonensis*, sendo caracterizada por nódulos, máculas e pápulas pouco infiltradas. Há uma resposta imune celular deficiente, predominando a resposta Th2, sendo considerada anérgica, não respondendo ao tratamento (SILVEIRA, 2002).

1.6.1.4 *Leishmaniose Cutânea Disseminada Boderline*

Corresponde a forma disseminada da patologia. O tempo em que ocorre esse processo de disseminação, depende do subgênero envolvido, no caso do subgênero *Leishmania* há uma evolução mais arrastada (mais de 6 meses após o início da doença), sendo o quadro clínico semelhante à forma anérgica com presença de lesões nodulares, placas infiltradas geralmente em extremidades, preservando mucosas, o padrão de resposta imunológica parece ser predominantemente do tipo Th1, apesar de haver uma ausência de resposta ao teste de hipersensibilidade, acredita-se que essa seja parcial, pois após a instituição da terapêutica durante 6 meses com tratamento convencional, há resolução do quadro clínico. O subgênero *Viannia* leva a uma disseminação mais rápida (em um a dois meses), com várias lesões eritemato-papulosas em todo tegumento. Há também ausência de resposta ao teste de hipersensibilidade, porém com o tratamento há resolução do quadro clínico e restabelecimento da positividade ao teste de hipersensibilidade, acreditando-se que a resposta Th1 esteja parcialmente preservada (SILVEIRA, 2001).

1.7 DIGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana é baseado essencialmente no exame parasitológico (esfregaço da lesão) e imunológico, representado pela intradermorreação de Montenegro. O exame direto é realizado antes do tratamento, pois após o início do tratamento os parasitos desaparecem da lesão. Após a coleta, há fixação do material e coloração com Giemsa, com visualização de formas amastigotas em lesão recente, sendo raro em úlceras antigas. Há positividade em até 80% dos casos. O parasito pode ser também isolado da lesão e cultivado em diversos meios de cultura, dos quais o mais empregado é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle (NNN) (GONTIJO *et al.*, 2003).

A intradermorreação de Montenegro é bastante utilizada, consistindo na injeção de 0,1 ml de antígeno preparado com formas promastigotas de cultura, avaliando dessa forma a sensibilidade do hospedeiro. A leitura é realizada em 48 a 72 horas, considerando-se positiva quando há uma endureção de tamanho igual ou superior a 5 mm. Na prática, isso indica que o indivíduo já foi sensibilizado, porém não significa doença. Em áreas endêmicas pode-se encontrar 25% ou mais de positividade do teste entre pessoas da população. O teste pode ser não reator em casos disseminados ou fase inicial, porém isso tende a se modificar após o início do tratamento. A positividade é de até 97% em indivíduo doente, sendo que em infecções por *L.(L.) amazonensis* essa positividade cai para 51%. Outras formas de diagnóstico podem ser usadas como histopatológico, inoculação em hamster, sorologia, imunofluorescência indireta, ELISA e PCR (GONTIJO *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença endêmica no Brasil, ocorrendo em praticamente todos os estados. A observação da série histórica de 1985 a 1999 indica um aumento do número de casos nos últimos anos, daí a importância de novos estudos serem realizados a cerca do assunto.

Este estudo é baseado em achados experimentais anteriores (MOLL, 1993; BLANK, 1993) que mostram uma interação entre CL e *L. major*, porém não há estudos mostrando a interação com as espécies presentes em nossa região, onde

observa-se dentre as espécies a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis*, responsáveis por quadros clínicos polares e antagônicos de leishmaniose cutâneo-mucosa e leishmaniose cutânea difusa anérgica, respectivamente.

Os dados obtidos neste trabalho irão propiciar um maior conhecimento da interação das CL com as espécies de *Leishmanias* propostas para este estudo, podendo ajudar no esclarecimento da ação de diferentes espécies de *Leishmanias* na indução primária da resposta imune celular contra estes protozoários.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações morfológicas das CL isoladas e purificadas da epiderme de camundongo BALB/c, após interação *in vitro* com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar as alterações morfológicas das CL após interação com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em microscopia óptica após coloração com Giemsa.

Caracterizar possíveis alterações morfológicas das CL após interação com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* através da microscopia eletrônica de varredura.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais utilizados foram 80 fêmeas de camundongo BALB/c com 4 a 8 semanas de vida, fornecidos e mantidos pelo biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC), alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.2 PARASITOS

Os parasitos utilizados foram as espécies *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1996/M15970) e *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/68/H21), sendo a primeira de portador de LTA cutâneo-mucosa e a segunda de portador de LTA difusa anérgica, sob a forma promastigota metacíclica, cultivadas em meio NNN no laboratório de leishmaniose do setor de parasitologia do Instituto Evandro Chagas.

4.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

As CL foram obtidas da epiderme de camundongo BALB/c, através de técnica específica de isolamento e purificação padronizada (KOYAMA *et al.*, 1990; SALGADO *et al.*, 1999), sendo realizada no Laboratório de Dermato-Imunologia Universidade do Estado do Pará / Universidade Federal do Pará / Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária "Dr. Marcello Candia" (UEPA/UFGPA/MC) podendo ser descrita da seguinte maneira:

Inicialmente, sacrifica-se o camundongo BALB/c através de tração cervical, seguida de tricotomia completa do animal. Remove-se a pele e lava-se com solução salina tamponada (PBS). Em um tubo de 50 ml coloca-se duas alíquotas de solução estoque de dispase (Roche Diagnóstico, Indianápolis, USA) e completa-se com 29 ml de RPMI1640 (Sigma, St. Louis, USA) com 5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil) e solução de penicilina com estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA).

Neste momento, adiciona-se uma alíquota de 125µl de anti-IGg-Fc (Cappel, Durham, NC) em 40 ml de PBS, que será distribuída em quatro placas de petri armazenadas a 4°C durante quatro horas. Corta-se a pele em pedaços menores e incuba-se com dispase em estufa com 5% de CO₂ (Revco, Asheville, USA) a 35°C por três horas. Separa-se então a derme da epiderme e incuba-se a epiderme em 0,025% DNase (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, separam-se as células da epiderme, que são passadas por uma membrana de nailon. Incuba-se a suspensão de células epidérmicas com anticorpo anti-Ia^d (MHC classe II) por 60 minutos a 4°C. Coloca-se a suspensão de células epidérmicas já marcadas nas placas da petri de plástico, previamente revestidas por anticorpo primário anti-IGg-Fc, por uma hora. Lava-se para retirar o sobrenadante e finalmente, remove-se as células aderidas às placas.

4.4 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS COM *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*

As CL isoladas e purificadas foram cultivadas em placas de 96 poços (TPP, Switzerland, Europa) durante 12 horas em estufa de CO₂ a 35°C com meio de cultura RPMI1640 associado à 10% de soro fetal bovino, isoladas ou em interação com *Leishmanias* na proporção de 1 CL para 10 leishmanias. Cada experimento foi realizado em triplicata, com cada poço contendo o seguinte: 1) controle com CL isoladas; 2) CL em interação com *L. (L.) amazonensis*; 3) CL em interação com *L.(V.) braziliensis*; 4) controle com *L.(L.) amazonensis* e; 5) controle com *L. (V.) braziliensis*.

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

4.5.1 Microscopia Óptica Comum

As CL isoladas e purificadas da epiderme de camundongo BALB/c foram aderidas em lamínula recobertas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), fixadas em metanol durante um minuto, coradas em solução de Giemsa a 5% (Química Especializada Guich Ltda, São Paulo, Brasil) por 30 minutos, e montadas sobre uma lâmina de vidro.

4.5.2 Microscopia Eletrônica De Transmissão

Para análise ultraestrutural, as CL isoladas e purificadas foram transferidas para tubos eppendorf de 0,6 ml e centrifugadas a 1000 RPM por 3 minutos para a formação de *pellet*. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS em pH 7,2 e fixadas por duas horas em temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e cloreto de cálcio 2,5 mM em tampão cacodilato 0,1M em pH 7.2. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas três vezes com tampão cacodilato 0,1 M pH 7.2 e pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄), 0,8% de ferricianeto de potássio e 1mM de CaCl₂ em tampão de cacodilato 0,1 pH 7.2 a temperatura ambiente por 1 hora.

Novamente as células foram lavadas três vezes no mesmo tampão e desidratadas com passagem em uma série de acetona em água a 20, 30, 50, 70, 90 e

100% com tempo de 15 minutos para cada etapa e duas vezes em acetona a 100%. Após desidratação, as células foram infiltradas com mistura epon/acetona na proporção de 1:2; 1:1; 2:1 por 6 horas cada etapa. Após infiltração com Epon, cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetona de uranila e citrato de chumbo para observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

4.5.3 Microscopia Eletrônica De Varredura

Para análise ultraestrutural as CL isoladas e purificadas foram transferidas para tubos eppendorf de 0,6 ml, fixadas por duas horas a temperatura ambiente em solução contendo 1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído (Labssynth, Diadema, São Paulo, Brasil) em tampão cacodilato 0,1M e pH 7.2. Após esse período as células foram aderidas em uma lamínula previamente recoberta com poli-L-lisina, seguindo-se três lavagens no mesmo tampão e pós-fixação com solução de OsO₄ (tetróxido de ósmio) à 1%, 0,8% de ferricianeto de potássio, 5mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1, e pH 7.2 a temperatura ambiente por uma hora.

Após esse período, realizou-se nova seqüência de lavagem no mesmo tampão, com passagem para desidratação em uma série de etanol em água a 20, 30, 50, 70, 90 e 100%, com tempo de 20 minutos para cada etapa e duas vezes em etanol a 100% por 20 minutos. Seguiu-se um período de secagem por ponto crítico de CO₂ no equipamento EMITECH – K850. A seguir, as lâminas foram fixadas em suporte (stub), metalizadas com EMITECH – K550 e observadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP.

5 RESULTADOS

AS CÉLULAS DE LANGERHANS FORAM ISOLADAS COM MAIS DE 95% DE PUREZA EM RELAÇÃO A OUTRAS CÉLULAS DA EPIDERME COMO QUERATINÓCITOS E MELANÓCITOS

Foi realizado o isolamento de CL da epiderme de fêmeas de camundongo BALB/c, através de técnica padronizada (KOYAMA *et al.*, 1990 & SALGADO *et al.*, 1999), sendo obtido um grau de pureza das células de mais de 95%. A análise do grau de pureza das LC foi realizada pela contagem das células dendríticas obtidas da

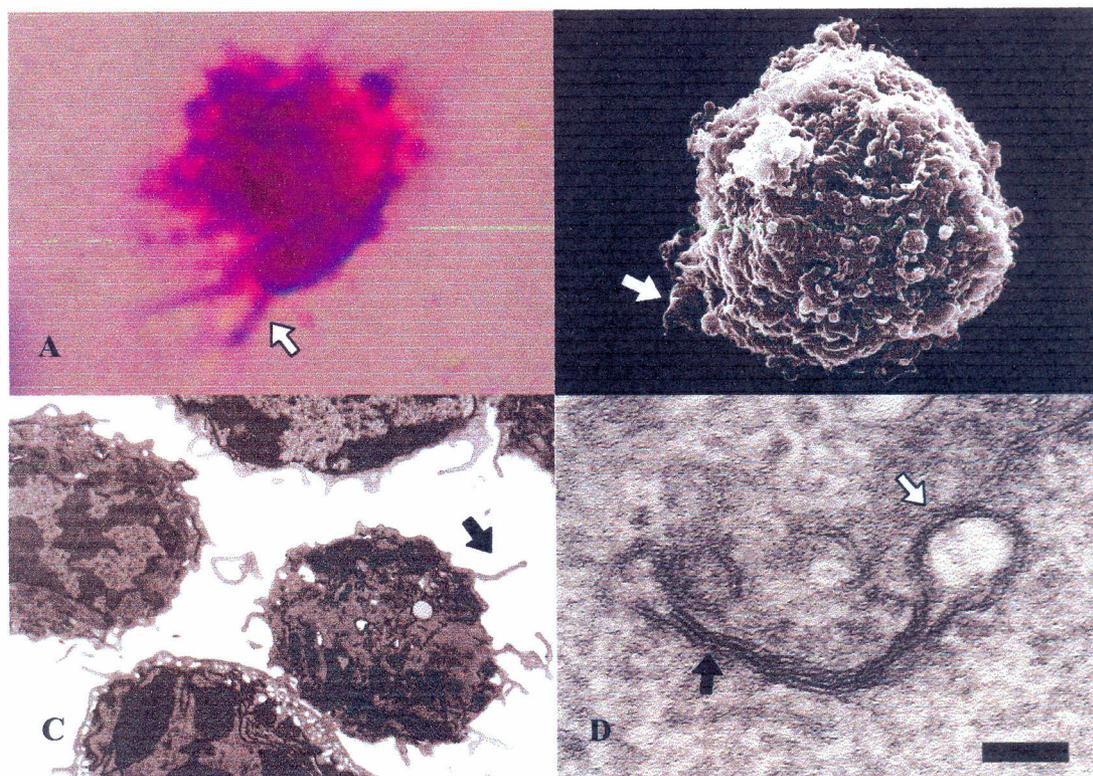
epiderme durante o isolamento, após 12 horas de cultura e coradas com Giemsa (Figura 4A).

Após isolamento, as CL foram preparadas para serem analisadas à microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que as CL apresentavam a superfície rugosa, com projeções delicadas características de dendritos. Em sua base de contato com a poly-L-lisina, observaram-se projeções centrífugas, correspondentes aos dendritos observados na microscopia óptica (Figura 4B).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS ULTRAESTRUTURAIS DAS CÉLULAS DE LANGERHANS RECÉM-ISOLADAS

Após isolamento, ainda para confirmar o bom funcionamento da técnica proposta, as CL foram preparadas para serem analisadas à microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se que as CL apresentavam morfologia dendrítica (Figura 4C), com grande quantidade de mitocôndrias e uma organela em seu citoplasma, conhecida como grânulo de Birbeck (Figura 4D), que é encontrada apenas nesta célula, sendo observada somente em estudos ultraestruturais.

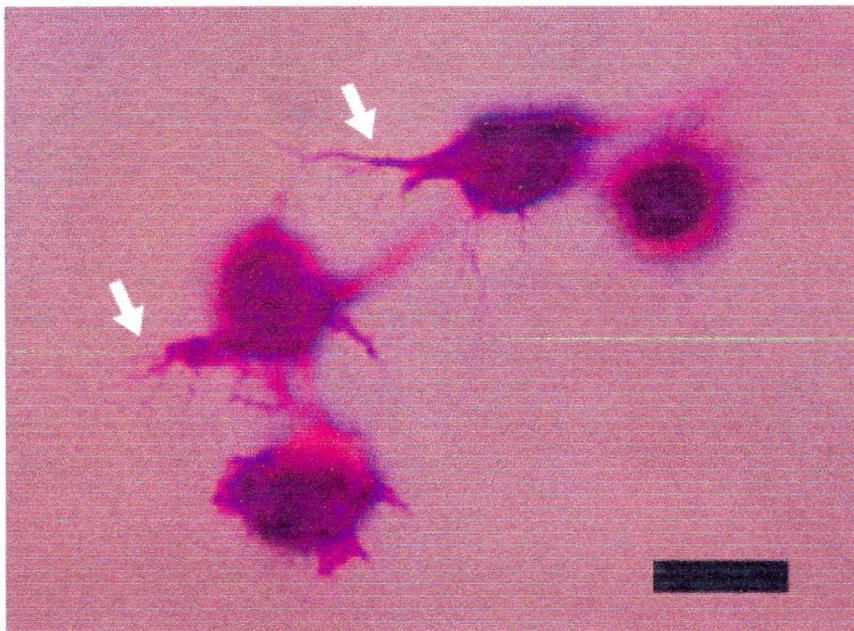
FIGURA 4. Células de Langerhans recém-isoladas e avaliadas por diferentes técnicas. As Células de Langerhans foram isoladas, cultivadas por 12h e coradas com Giemsa ou preparadas para microscopia eletrônica de varredura ou transmissão. Em A, B e C observa-se a formação de dendritos finos e delicados, de base larga (setas). Em D, pode-se observar a presença de um grânulo de Birbeck, com a sua estrutura trilaminar e uma zona elétron-densa central (seta escura) e a presença de uma vesícula na extremidade (seta clara). Barras: A: 3 μ m; B: 2 μ m; C: 3 μ m; D: 0,25 μ m.



MICROSCOPIA ÓPTICA

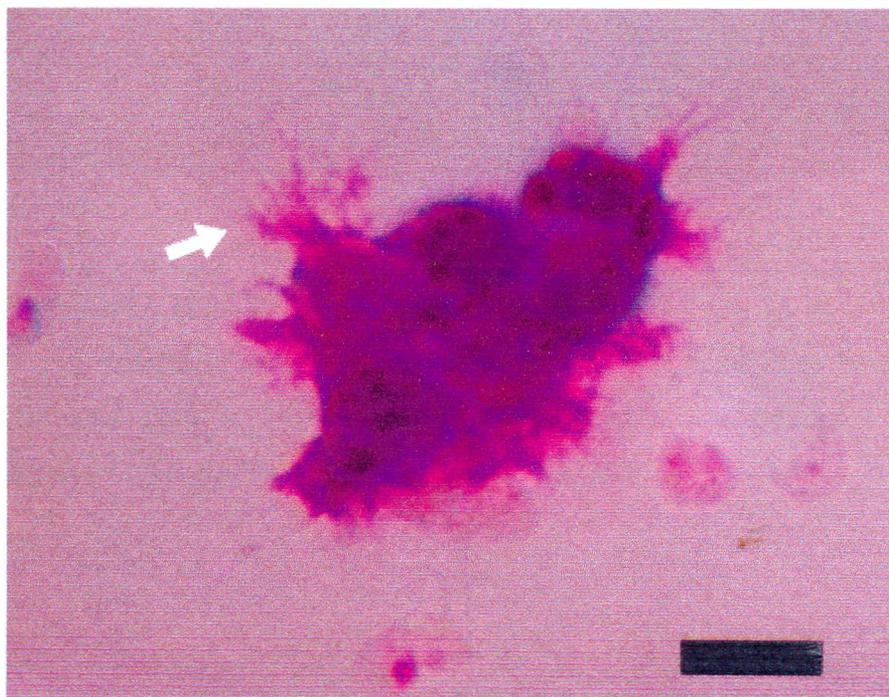
Após coloração com Giemsa observou-se que as CL cultivadas isoladamente apresentavam, após 12 horas em cultura, dendritos de base larga com suas ramificações finas e delicadas, que tocavam as ramificações das outras células presentes no meio de cultura, tomando a disposição de uma aparente rede de conexão celular.

FIGURA 5. Células de Langerhans coradas com Giemsa após 12 horas de cultivo sem a presença de *leishmanias*. As Células de Langerhans foram isoladas e cultivadas por 12h em RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino. Verifica-se a presença de dendritos finos e delicados, de base larga, que se ramificam (setas) e tocam os dendritos de células vizinhas, o que confere o aspecto de uma rede de conexão entre as células. Barra: 8 μ m.



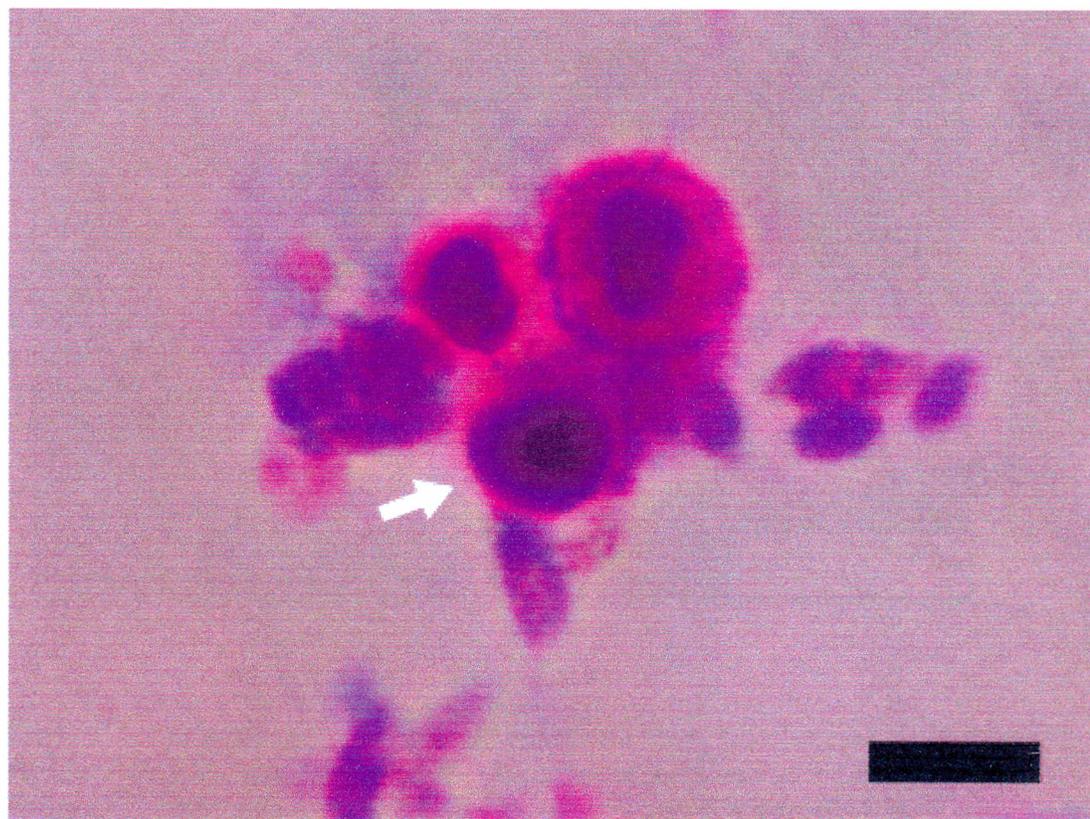
Após a interação das CL com *L. (V.) braziliensis*, observou-se que as CL apresentavam um número maior de dendritos, porém de pequeno tamanho, que formavam agregados celulares aparentemente com uma forte ligação intercelular .

FIGURA 6. Células de Langerhans coradas com Giemsa após 12 horas de cultivo com *Leishmania (V.) braziliensis*. As Células de Langerhans foram isoladas e cultivadas por 12h em RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino e *Leishmania (V.) braziliensis*. Verifica-se a presença de dendritos finos e delicados, curtos e bastante ramificados (seta) em um agregado celular aparentemente com uma forte ligação intercelular. Barra: 8 μ m.



Em contraste, verificou-se que após 12 horas de interação com *L. (L.) amazonensis*, as CL apresentavam-se com formato arredondado, onde não era possível a observação de dendritos, e aparentemente tendendo a formação de pequenos agregados de fraca ligação intercelular.

FIGURA 7. Células de Langerhans coradas com Giemsa após 12 horas de cultivo com *Leishmania (L.) amazonensis*. As Células de Langerhans foram isoladas e cultivadas por 12h em RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino e *Leishmania (L.) amazonensis*. Verifica-se que as células possuem um aspecto arredondado, com a ausência de dendritos, em um agregado celular aparentemente com uma fraca ligação intercelular. Barra: 8 μ m.



MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise ultraestrutural da superfície das CL cultivadas isoladamente ou em interação com *L. (V.) braziliensis*, demonstrou uma pequena diferença na rugosidade celular conferida pelos dendritos das CL.

FIGURA 8. Célula de Langerhans observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 12h de cultivo, sem a presença de *leishmanias*. As Células de Langerhans foram isoladas, cultivadas por 12h em RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino e preparadas para MEV. Verifica-se a presença de dendritos finos e delicados, de base larga (setas), o que confere um aspecto rugoso para a célula. Barra: 2 μ m.

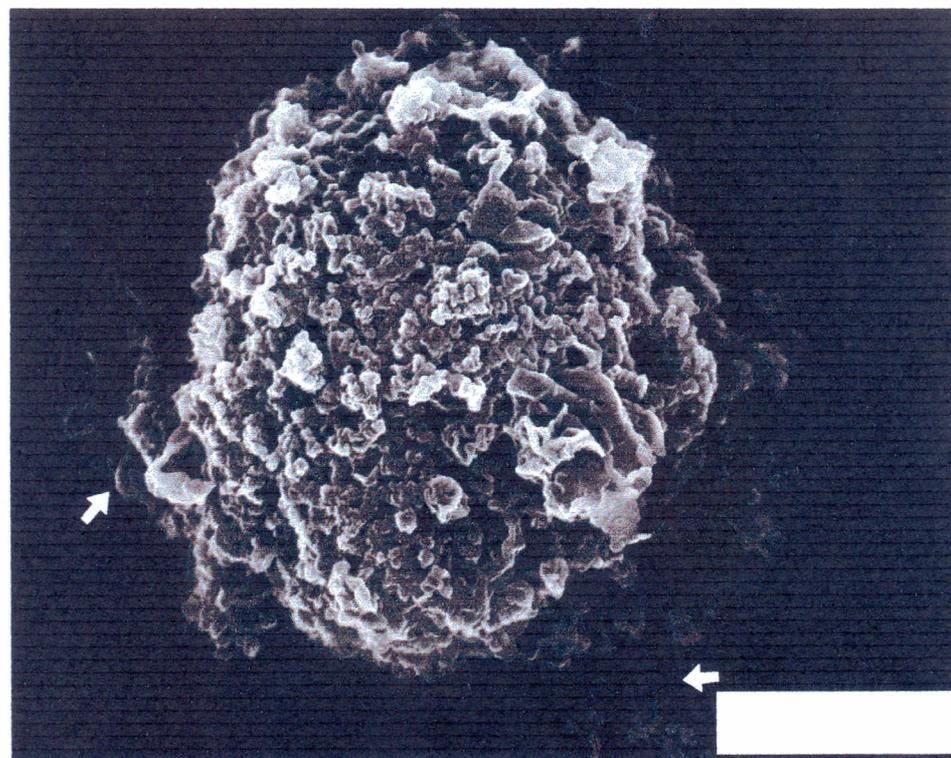
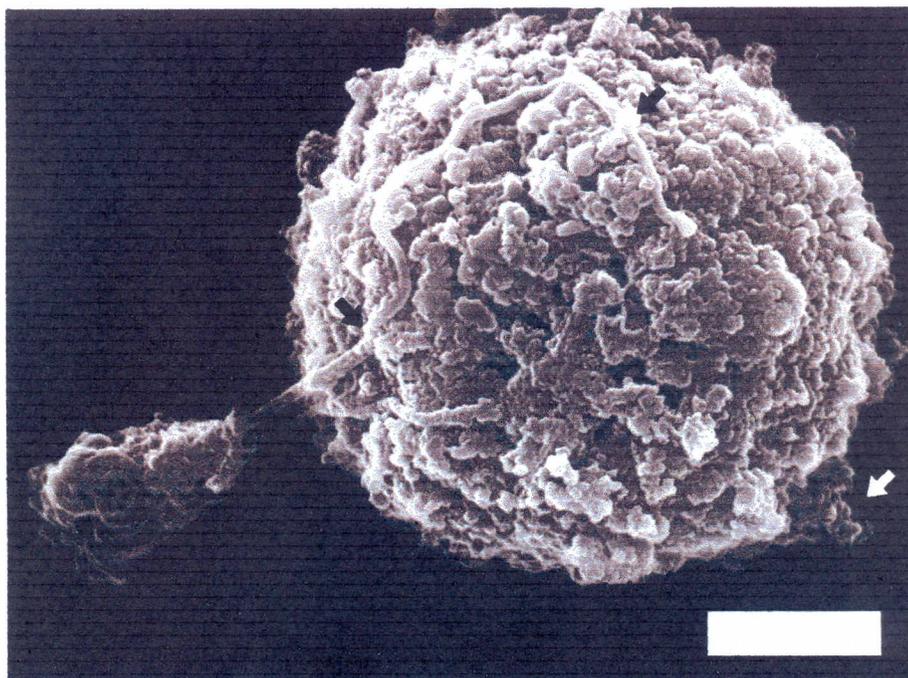


FIGURA 9: Célula de Langerhans observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 12 horas de cultivo com *Leishmania (V.) braziliensis*. As Células de Langerhans foram isoladas, cultivadas por 12h em RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino e *Leishmania (V.) braziliensis* e preparadas para MEV. Verifica-se a presença de dendritos curtos (seta clara), o que confere um aspecto menos rugoso para a célula, quando comparada à célula de Langerhans cultivada sem *leishmanias*. Observa-se ainda um contato íntimo entre o flagelo da forma promastigota e a superfície da célula de Langerhans (setas escuras). Barra: 2 μ m.



As CL cultivadas com *L. (L.) amazonensis*, apresentaram a superfície levemente rugosa, aparentemente sem a projeção de dendritos .

FIGURA 10. Célula de Langerhans observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após 12 horas de cultivo com *Leishmania (L.) amazonensis*. As Células de Langerhans foram isoladas, cultivadas por 12h em RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino e *Leishmania (L.) amazonensis* e preparadas para MEV. Verifica-se a ausência de dendritos, o que confere um aspecto ainda menos rugoso para a célula, quando comparada à célula de Langerhans cultivada sem *leishmanias* ou à célula de Langerhans cultivada com *Leishmania (V.) braziliensis*. Barra: 3 μ m.



6 DISCUSSÃO

As CL possuem uma importância inquestionável na iniciação da resposta imune e estão localizadas estrategicamente na epiderme, onde podem manter contato com microorganismos invasores (MOLL, 2003). Em razão da sua importância como células apresentadoras de antígenos, existem encontros mundiais específicos sobre CL. No entanto, apesar de toda esta importância, poucos grupos de pesquisa possuem a capacidade de isolar as CL das outras células da epiderme. A grande dificuldade reside no fato de as CL serem apenas 2 a 3% de todas as células da epiderme, o que torna a técnica de isolamento e purificação trabalhosa.

Em março de 2003 o grupo de pesquisa do Laboratório de Dermatologia conseguiu padronizar a técnica e implantá-la de modo inédito na América Latina.

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar a morfologia das CL recém-isoladas por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, bem como avaliar a morfologia celular por microscopia óptica e eletrônica de varredura após a interação das CL isoladas com a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis*.

Inicialmente, foi necessário analisar as células que estavam sendo purificadas para confirmar o isolamento das CL, o que foi realizado pelas três técnicas utilizadas. A primeira delas, a microscopia óptica com coloração por Giemsa, demonstrou a presença de mais de 95% de células dendríticas advindas da epiderme entre as células isoladas, o que é considerado um alto grau de pureza para CL. Isto é importante, pois a presença de outras células, *e.g.* queratinócitos, em experimentos de interação podem alterar os resultados em razão das citocinas liberadas por estas células ou mesmo pelo contato direto do queratinócito com as CL e com as outras células envolvidas no processo da interação que se pretende estudar. Isto é observado em outros modelos de isolamento, que obtém um grau de pureza em torno de 40 a 80% (RASANEN *et al.*, 1986).

Além da coloração de Giemsa, a confirmação incontestável do isolamento das CL advém da presença de grânulos de Birbeck no seu citoplasma, conforme demonstrado nas CL recém-isoladas. Estes grânulos parecem ter uma função de zonas de limite entre duas membranas, mas isto ainda não está claro (VALLADEAU

& DEZUTTER-DAMBUYANT & SAELAND, 2003). O que é importante ressaltar é que o grânulo de Birbeck está presente apenas nas CL *in situ* e desaparecem rapidamente após a separação das CL de suas células vizinhas na epiderme. Além disto, a especificidade do grânulo de Birbeck tem sido utilizada na demonstração da geração *in vitro* de células “Langerhans-like” provenientes de células dendríticas CD34+ que circulam em pequeno número na corrente sanguínea ou presentes no sangue do cordão umbilical, e que se corretamente estimuladas, podem se transformar em células dendríticas que contém estes grânulos (ARRIGHI *et al.*, 2003).

A microscopia eletrônica de varredura confirmou apenas a morfologia dendrítica das CL, conforme a expectativa. É importante lembrar que existem outras células dendríticas na epiderme, mas que apenas as CL expressam MHC classe II, que é o antígeno utilizado para o processo de isolamento e purificação aqui descrito.

Desta forma, após a confirmação de que as células utilizadas eram realmente as CL, iniciaram-se os experimentos de interação entre as CL e as leishmanias.

As duas leishmanias escolhidas representam as formas mais polares de leishmaniose cutânea, sendo de um lado a *L. (V.) braziliensis* responsável pela leishmaniose cutâneo-mucosa, que apresenta lesões mucosas com poucos parasitos, o que sugere uma boa resposta imune celular e por outro lado a *L. (L.) amazonensis* responsável pela leishmaniose cutânea difusa anérgica, que apresenta lesões cutâneas disseminadas, com muitos parasitos e de difícil terapêutica, o que sugere uma resposta imune celular deficiente.

Os estudos aqui descritos demonstraram-se complementares, com a microscopia eletrônica de varredura confirmando os dados da microscopia óptica e demonstrando achados que serão agora discutidos.

Inicialmente, verificou-se a presença de contato entre as CL através dos dendritos, após 12 horas de interação, com disposição semelhante a uma rede de conexão, o que é compatível com a migração celular e o estímulo de linfócitos T no linfonodo. Sabe-se que as CL em cultura *in vitro* tornam-se cada vez mais dendríticas, evoluindo de uma célula captadora de antígenos, como é a sua função na epiderme, para uma célula apresentadora de antígenos, fato que mimetiza o que ocorre *in vivo* ao contato com linfócitos T no linfonodo (CUMBERBATCH *et al.*,

2001). A análise da cultura de CL com as leishmanias resultou em duas situações distintas, sendo uma com as CL em interação com *L. (V.) braziliensis* apresentando dendritos em maior quantidade, porém mais curtos que os observados nas CL cultivadas isoladamente e outra com as CL em interação com *L. (L.) amazonensis* demonstrando um formato arredondado, aparentemente sem dendritos.

Desde 1992, Silveira *et al.* (1991) já demonstravam que os quadros clínicos dos pacientes poderiam ser espécie-dependentes, ou seja, que em razão da espécie alojada pelo hospedeiro, ele poderia desenvolver uma forma localizada ou disseminada de leishmaniose (SILVEIRA *et al.*, 1992). Têm sido observado que as duas espécies aqui utilizadas podem estimular macrófagos de modo diferente, sendo normalmente a *L. (L.) amazonensis* relacionada a uma resposta Th2 e a *L. (V.) braziliensis* a uma resposta Th1 (COURRET *et al.*, 2002). Recentemente, McDowell *et al.* (2002), observou que a liberação de IL-12 por células dendríticas é, não somente espécie-específica, mas também dependente da cepa envolvida na interação com o hospedeiro (McDOWELL *et al.*, 2002).

Em relação à morfologia das CL isoladas também pouco se sabe. Existem trabalhos demonstrando o encurtamento dos dendritos e a diminuição da rugosidade das CL relacionados à apoptose, após contato da pele com radiação ultra-violeta ou produtos químicos (RATTIS *et al.*, 1998; FORSEY *et al.*, 1998). Além disto, Tinsley *et al.* (2003) demonstrou que as células dendríticas iniciam o processo de apoptose após a estimulação de linfócitos T, o que indica que as CL podem ser estimuladas ao máximo até o contato com linfócitos T no linfonodo, para em seguida sofrerem um processo de inibição relacionado a apoptose, no sentido de dimensionar a resposta imune celular (TINSLEY *et al.*, 2003). Desta forma, correlacionando-se os dados aqui obtidos com a literatura, podemos inferir que o contato das CL com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* poderia inibir a resposta imune celular em diferentes níveis, o que é verificado pela diminuição do comprimento dos dendritos na interação com *L. (V.) braziliensis* e pela ausência dos dendritos na interação com *L. (L.) amazonensis*, o que levaria à manutenção da infecção no hospedeiro através da diminuição da resposta imune primária à *L. (V.) braziliensis* ou mesmo da inibição total da resposta imune celular contra a *L. (L.) amazonensis*, através do direcionamento das CL à apoptose.

Um outro tópico interessante refere-se a interação *leishmania*-CL pelo contato com o flagelo dos promastigotas. Em macrófagos já estão demonstrados dois modos de fagocitose da *leishmania in vitro*. O primeiro ocorre pelo contato do macrófago com o corpo da *leishmania*, que em seguida é de imediato fagocitada. O outro ocorre pelo contato inicial com o flagelo, onde no entanto não há a fagocitose imediata do parasito, mas somente após o contato com o corpo da *leishmania*, o que parece ser fundamental para a fagocitose (COURRET *et al.*, 2002) Os dados aqui obtidos demonstram um contato íntimo do flagelo com a célula, o que pode ser observado logo após o início do processo interativo.

Apesar deste contato das CL com o flagelo das *leishmanias*, não foi possível observar a fagocitose dos parasitos pelas CL, seja em cultura de 12 horas ou em cultura de 36 horas (dados não demonstrados), fato que é contrastante com a literatura, onde se verifica nos poucos trabalhos que parece existir o englobamento da *leishmania* pela CL (MOLL *et al.*, 1993). Um dos problemas na comparação com a literatura reside no fato de a *leishmania* utilizada por outros autores ser a *L. major*. Ambas as *leishmanias* aqui utilizadas são maiores que a *L. major*, o que poderia ser uma explicação para não haver a fagocitose do parasito, visto que as CL são células pequenas, medindo em torno de 7,5 μ m, o que inviabilizaria a entrada do parasito. Mais estudos são necessários para avaliar melhor esta situação.

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho, em comparação com a literatura, podemos concluir que: 1) A resposta imune primária das CL contra as *leishmanias* são reguladas de modo diferente *in vitro* na interação com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*; 2) Parece haver uma inibição importante da resposta imunológica das CL em interação com *L. (L.) amazonensis* e; 3) Apesar de existir um contato íntimo entre as CL e o flagelo das *leishmanias*, não encontrou-se fagocitose destas duas espécies pelas CL de camundongos BALB/c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRIGHI, JF *et al.* TNF- α induces the generation of Langerin (CD207)⁺ immature Langerhans - type dendritic cells from both CD14⁻ CD1a⁺ and CD14⁺ CD1a⁻ precursors derived from CD34⁺ cord blood cells. **Journal of Immunology**. 33 (7): 2053-63, jul. 2003.

BLANK, C *et al.* Parasitism of Epidermal Langerhans cell in experimental cutaneous Leishmaniasis with *Leishmania major*. **The Journal of Infectious Diseases**. Chicago, v167, p 418-25, 1993.

BERNATECK, M; JONAS, L & DIEZEL, W. Histochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies on the action of glucocorticoids on epidermal Langerhans Cells (ELC) of murine skin. **Acta Histochemica**. New York, (Jena) 98, 101-106, 1996.

CACERES-DITTMAR, G *et al.* Epidermal compromise in American cutaneous Leishmaniasis. **The Society for Investigative Dermatology**. Nº 5, supplement, november, 1993.

CUMBERBATCH, M *et al.* Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor- α . **Immunology**. 102 (3): 323-330). 2001.

COURRET, N *et al.* Biogenesis of *Leishmania* - harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stage of the parasites. **Journal of Cell Science**. 115(pt 11): 2303-16, jun. 2002.

DEMIDEM A *et al.* Comparison of effects of transforming growth factor-beta and cyclosporin A on antigen-presenting cell of blood and epidemis. **Journal for Investigative Dermatology**, 96 (4), 401-407, 1991.

DE PANFILIS G. Paul Langerhans' death centennial. **Journal for Investigative Dermatology**. 91 (3), 283, July 20, 1988.

FLOHÉ, SB; BAUER, C & FLOHÉ, S. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cell protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *L. major*. **Journal of Immunology**. V 28, p 3800-3811, 1998.

FLOHÉ, S; LANG, T & MOLL, H. Synthesis, stability, and subcellular distribution of Major Histocompatibility Complex class II molecules in Langerhans cells infected with *Leishmania major*. **Infection and Immunity**. p. 3444-3450, 1997.

FORSEY, R J *et al.* Epidermal Langerhans cell apoptosis is induced in vivo by nonanoic acid but not by sodium lauryl sulphate. **Journal of Dermatology**. v 139, p 453-461, 1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. VII, p. 501-524, 2002.

GONTIJO, B & CARVALHO, MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36 (1): 71-80, jan-fev, 2003.

KAWAMURA, T *et al.* Fas/Fas ligand-mediated apoptosis of murine Langerhans cells. **Journal of Dermatologic Science**. V 22, p96-101, 2000.

KOYAMA, Y *et al.* Isolation and culture of panning method-enriched Langerhans cell from dispase-dissociated epidermal cells of the mouse. **The Journal of Dermatology**. v 17, p 211-217, 1990.

LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH – Center for Disease Control (CDC). Leishmaniasis. Disponível em www.dpd.cdc.gov. Último acesso em 22 de dezembro de 2003.

LAINSON, R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência a Região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**. Vol 11, jan/jun, 1997.

MARCHESE, LM; MARCHESE, AJT & RIVITI, E. In **VERONESI, R; FOCACCIA, R.** Leishmaniose Tegumentar Americana. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. cap 96, p 1221-1233.

MCDOWELL, MA *et al.* Leishmania priming of human dendritic cell for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. **Infection and Immunity**. 70(8): 3994-4001, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. **Guia de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2001.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cell are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**. v 14, nº 8, 1993.

MOLL, H *et al.* Langerhans cells transport *L. major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Journal of Immunology**. Erlangen, v 23, p 1595-1601, 1993.

MOLL, H; FLOHÉ, S & BLANK C. In **the immune functions of epidermal Langerhans cells**. Saringer- Verlay, London, 1995.

MOLL, H; SCHRNER, A & KAMPGEN, E. Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4 induced decrease in IL-12 production by Langerhans cell infected with *Leishmania Major*. **Infection and Immunity**. p. 1627-1630, 2002.

MOLL, H. Dendritic cells and host resistance to infection. **Cell Microbiology**. 5 (8): 493-500, aug. 2003.

MOMMAOS, AM *et al.* Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ. **Journal of Immunology**. V 25, p 520-525, 1993.

PEARSON, RD & SOUSA, AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**. 22:1-13, 1996.

PÉGUET-NAVARRO, J *et al.* Dissection of human Langerhans cell allostimulatory function: the need for an activation step for full. **Journal of Immunology**. V 23, p 376-382, 1993.

PICKER, LJ & SIEGELMAN, M. Lymphoid Tissues and Organs. In Paul, W. E. (eds). **Fundamental Immunology**. (Third ed.). Raven Press, Ltda, New York, 1993.

PONTE-SUCRE, A; HEISE, D & MOLL, H. *Leishmania Major* liposphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine langerhans cells. **Immunology**. P. 462-467, 2001.

RATTIS, FM *et al.* Effects of ultraviolet B radiation on human Langerhans cell: functional alteration of CD86 upregulation and induction of apoptotic cell death. **Journal for Investigative Dermatology**. V 111, p 373-379, 1998.

RICHTERS, CD *et al.* Migratory properties and functional capacities of human skin dendritic cell. **British journal of Dermatology**. v 133, p 721-727, 1995.

ROGERS, AK *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**. 209. P. 1-7, 2002.

ROSANEN, L *et al.* Enrichment of human epidermal Langerhans cells by attachment to erythrocyte monolayers. **Journal for Investigative Dermatology**. 86(1): 9-12). 1986.

SALGADO, CG *et al.* Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1 and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans Cells. **Journal for Investigative Dermatology**. 113:1021-1027, 1999.

SCHECHTER, M & MARAGONI, DV. Leishmaniose Tegumentar Americana **Doenças Infecciosas e Parasitárias Conduta Terapêutica e Diagnóstica**. Rio de Janeiro; Editora Guanabara Koogan, 1998. p 243-244.

SILVEIRA, FT *et al.* Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 85 (6): 735-8, nov-dec. 1991.

SILVEIRA, FT. Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica da Leishmaniose Cutânea Disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Tese de doutorado. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.

SILVEIRA, FT *et al.* T cell responses to crude and defined leishmanial antigen in patients from the lower Amazon Region of Brazil infected with different species of the subgenera *Leishmania* e *Viannia*. **Parasitology Immunology**. V 20, p19-26, 1998.

SILVEIRA, FT *et al.* An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**. 9 (1). P. 43-50, 2001.

SILVEIRA, FT *et al.* Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, RNQ. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Editora CEJUP, p. 619-630, 1997.

SOARES, MBP; DAVID, JR & TITUS, RG. An in vitro model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. **Infection and immunity**. P 2837-2845, july 1997.

STEINMAN, RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annual Review in Immunology**. 9: P. 271-296, 1991.

STEINMAN, RM & NUSSENZWEIG, MC. Dendritic cell : features and functions. **Immunology Review**. V 53, 1998.

STINGL, G; TAMAKI, K & KATZ, SI. Origen and function of epidermal Langerhans cells. **Immunology Review**. V53, 1980.

STRUNK, BD *et al.* A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. **Journal of Experimental Medicine**. January, 1997.

TAMAKI, K *et al.* Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cell. **Journal of Immunology**. 123(2), 784-787,1979.

TINSLEY, KW *et al.* Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cell. **Journal of Immunology**. 171(2): 909-14), jul15. 2003.

VALLADEAN, J; DEZUTTER-DAMBUYANT, C & SAELAND, S. Langerin/CD207 sheds light on formation of Birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. **Immunology Review**. 28(2): 93-107. 2003.

VON STEBUT, BE *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of Anti-*Leishmania* immunity. **The Journal of Experimental Medicine**. V 188, n 8, p. 1547-1552, october 19, 1998.

WILL, A *et al.* Murine epidermal Langerhans cell are potent stimulators of antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**. Erlangen. v 22, p 1341-1347, 1992.

XAVIER, MB. Leishmaniose Tegumentar Americana: uma análise quantitativa das células de Langerhans em pacientes virgens de tratamento. [Tese Mestrado]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2001.

