

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD)

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS (DCL)

Aldina Barral^{1,2} & Manoel Barral-Netto^{1,2}

¹Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia – UFBA, BA, Brasil/ ²Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Bahia, Brasil

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara da leishmaniose tegumentar humana caracterizada pela presença de múltiplos nódulos não ulcerados, de difícil tratamento e com recaídas constantes. Os pacientes com LCD apresentam resposta imune humoral com a presença de anticorpos anti-*Leishmania* e possuem níveis elevados de IgG4. A resposta imunocelular apresenta uma anergia/hiporresponsividade específica contra antígenos de *Leishmania*, sem comprometimento da resposta contra outros antígenos. Aqui revisamos as publicações que exploram os mecanismos envolvidos na hiporresponsividade específica da resposta imunocelular, as evidências da participação do parasito na indução da baixa resposta imune e os relatos da presença de LCD em pacientes com HIV-AIDS.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose humana, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania aethiopica*.

Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) is a rare presentation of human tegumentary leishmaniasis. The presence of multiple non-ulcerated nodules characterizes DCL, a form which is resistant to standard anti-Leishmania therapeutic regimen and present frequent relapses. Immunologically, DCL patients exhibit anti-Leishmania antibodies with elevated IgG4 levels concomitant to a Leishmania-specific hypo-responsiveness in cell-mediated immunity, with preserved responses to other antigens. Herein we will review publications which explore mechanisms involved in the Leishmania-specific anergy, the possible participation of the parasite in the characteristic immunological mechanism of DCL and the relationship of DCL and AIDS.

Key words: Diffuse cutaneous leishmaniasis, human leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania aethiopica*.

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara de leishmaniose, causada por *Leishmania amazonensis*, *Leishmania aethiopica* ou *Leishmania mexicana* e caracterizada clinicamente pela presença de nódulos e placas não ulceradas em diversas partes do corpo. Esta forma representa um sério desafio ao tratamento, com recaídas constantes (os aspectos clínicos e terapêuticos da LCD são revistos em outros artigos deste número).

A evolução clínica progressiva da LCD tem sido atribuída a características do parasito, assim como, a aspectos imunogenéticos do paciente. É provável que tanto o parasito quanto o hospedeiro estejam implicados na determinação da apresentação da LCD e estes aspectos são objetos da presente revisão.

Resposta imune humoral

Os pacientes com LCD apresentam resposta humoral contra antígenos de *Leishmania*⁽¹⁾, tendo sido descrita uma predominância da subclasse IgG4^(2, 4) enquanto os pacientes com as formas de leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose mucosa (LM) não apresentam níveis elevados de IgG4. Esta expressiva produção de IgG4 indica a predominância da resposta Th2 na LCD. É atraente a

possibilidade de avaliar a atividade da resposta imunocelular através de dosagens séricas. As determinações séricas empregam metodologia mais acessível a laboratórios nas áreas onde ocorrem as doenças parasitárias e utilizam, frequentemente, menor volume de sangue. Nesta linha, Cabrera relata uma estranha semelhança entre LCD e LM quanto aos níveis séricos de IgE e CD23 solúvel, sendo esta molécula o receptor de baixa afinidade para IgE ou FcεRII. Tanto LCD quanto LM apresentam níveis mais elevados de ambas as moléculas em relação aos casos de LCL⁽⁵⁾. A ligação do CD23 pela IgE resulta na produção de óxido nítrico (NO), um produto relacionado com atividade leishmanicida. Adicionalmente, a expressão de CD23 pelos monócitos/macrófagos humanos ocorre após a ativação por IFN-γ ou IL-4. É difícil imaginar que uma via envolvida com destruição parasitária dê resultados semelhantes nos casos de LCD e LM, colocando certa cautela na interpretação destes dados.

Do ponto de vista de resposta humoral, fica evidente a presença de resposta imune e ademais demonstra a participação de resposta imune celular, visto que os anticorpos IgG4 não são produzidos sem cooperação de linfócitos T auxiliares.

Resposta imunocelular sistêmica.

A principal característica imunológica da LCD é a ausência específica de resposta imunocelular contra antígenos da *Leishmania*⁽⁶⁾. A resposta Th1, com produção predominante de IFN-γ, se associa com resistência em todas as formas de leishmaniose revisto em⁽⁷⁾. Os pacientes com LCD não montam uma resposta imunocelular adequada quando estimulados com

Recebido em 16/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Dra. Aldina Barral. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BAHIA); Rua Waldemar Falcão, 121. 40296-710 Salvador – Bahia Telefone: 55-71-3176-2259; FAX 55-71-3176-2279. Endereço eletrônico: barral@ufba.br.

Gazeta Médica da Bahia

2009;79 (Supl.3):35-39

© 2009 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

antígenos de *Leishmania*. Isto é evidenciado pela ausência de proliferação linfocitária⁽⁶⁾ assim como, pela baixa produção de IFN- γ com produção elevada de IL-10^(1,8). A ausência de resposta imunocelular abrange também as células citotóxicas CD8+, os pacientes com LCD não apresentam atividade citotóxica contra macrófagos autólogos infectados⁽⁹⁾.

Embora o teste de hipersensibilidade cutânea tardia para *Leishmania* (intradermoreação de Montenegro-IDRM) seja negativo em todos os pacientes com LCD, nem todos apresentam uma total ausência de resposta *in vitro*, evidenciando diferentes graus de hiporresponsividade⁽¹⁾. A resposta positiva no IDRM provavelmente reflete o conjunto de vários mecanismos que são explorados individualmente em testes *in vitro*, assim não é de se estranhar que indivíduos com IDRM negativo possuam alguns testes *in vitro* positivos. A evidência de resposta imunocelular *in vitro* em pacientes com LCD mostra que a deficiência desta resposta não é homogênea nestes indivíduos o que levou ao uso do termo forma polar, para aqueles sem qualquer resposta imuno-celular, e subpolar, para aqueles, a despeito de terem uma IDRM negativa possuem alguma evidência de resposta imunocelular⁽¹⁾.

A ausência de proliferação linfocitária se relaciona fortemente com a produção de IFN- γ , ou seja, são ambos baixos nos pacientes com LCD⁽¹⁰⁾. A inibição da proliferação linfocitária em resposta aos antígenos de *Leishmania*, nos pacientes com LCD, se deve à ação de monócitos/macrófagos por mecanismos que são inibidos pela adição de indometacina^(6,11). Os linfócitos de pacientes com LCD também não apresentam o receptor de IL-2⁽¹²⁾ em resposta ao estímulo pelo antígeno de *Leishmania*. Sendo a IL-2 uma molécula fundamental para a proliferação linfocitária, isto explica a ausência de multiplicação linfocitária. Embora não haja resposta ao antígeno total de *Leishmania*, há uma resposta a um pequeno número de moléculas, segundo revelado por imunoblot⁽¹³⁾.

A avaliação dos níveis de IFN- γ isoladamente não permite uma visão funcional do sistema imune. Há várias citocinas que podem cooperar e potencializar a atuação do IFN- γ , enquanto outras têm um efeito contrário e neutralizam o seu efeito. O TNF- α , uma molécula capaz de potencializar o IFN- γ , apresenta níveis séricos nos pacientes com LCD muito menores que os níveis observados em pacientes com LM⁽¹⁴⁾. No campo das moléculas capazes de inibir a resposta imunocelular, o TGF- β , uma molécula implicada na sobrevivência da *Leishmania*⁽¹⁵⁾ é um forte candidato a explicar a imunossupressão da LCD. Embora não tenha sido explorada a sua produção por linfócitos circulantes, ele está presente nas lesões^(16,17). O receptor solúvel de IL-2, ou sIL-2R, que é um fator implicado na imunossupressão da leishmaniose visceral⁽¹⁸⁾, não parece implicado na supressão da LCD⁽¹⁹⁾. A molécula CTLA-4 é um receptor inibitório, expresso pelas células T ativadas e por células T reguladoras, e elemento normal no controle da resposta imune. Foi descrito um polimorfismo de A/G no seu gen que altera a produção de IL-

2 e conseqüentemente a proliferação linfocitária. Os pacientes com LCD apresentam um aumento na freqüência do polimorfismo +49 A/G quando comparados com pacientes de LCL⁽²⁰⁾.

Um relato sugere que pode haver resposta a certos antígenos parasitários, como a gp46, com ausência de resposta ao antígeno bruto e contra vários outros antígenos purificados⁽²¹⁾. É possível que haja competição antigênica com predomínio dos antígenos que levam a uma resposta com predomínio da produção de citocinas antagonicas ao IFN- γ , como a IL-10.

Todos os estudos são concordantes quanto à demonstração da ausência de uma resposta Th1 e da produção de IFN- γ por linfócitos circulantes de pacientes com LCD após estímulo pelo antígeno de *Leishmania*. Quanto aos mecanismos responsáveis por tal incapacidade ainda há necessidade de maior aprofundamento. Há indicações da predominância na produção de moléculas capazes de inibir a ação do IFN- γ , mas pouco se sabe a causa deste desequilíbrio.

Aspectos imunológicos das lesões

As primeiras observações, por imunohistoquímica, nas lesões de pacientes com LCD descreveram que as lesões de LCL e LCD apresentavam a mesma relação entre células auxiliaadoras e supressoras, e a mesma distribuição espacial, mas que a expressão de IL-2 era reduzida nas lesões de LCD em relação às de LCL⁽²²⁾, sugerindo que o defeito é mais funcional que no número de células ou sua localização. Posteriormente, foi demonstrada a escassez de células T γ - δ e que as lesões de LCD apresentavam uma expressão elevada da proporção de células LFA-1 α +⁽²³⁾. O antígeno associado à função linfocitária 1 (LFA-1) é uma integrina encontrada em linfócitos T e B, além de macrófagos e neutrófilos estando envolvida em recrutamento para o local de infecção. O LFA-1 se liga ao ICAM-1, presente em células apresentadoras de antígeno (APC), e funciona como molécula de adesão. Embora seja uma molécula envolvida na interação inicial T-APC ela estabelece uma ligação fraca. A presença abundante de LFA-1 em lesões de LCD indicaria que o defeito de ativação dos linfócitos T não ocorre por defeito na interação inicial destas células com as células apresentadoras de antígeno.

Adicionalmente, as lesões de pacientes com LCD apresentam uma alta expressão de citocinas Th2⁽²³⁾ e pouca expressão de NOS2 nas lesões⁽²⁴⁾ apontando para a ineficiência de uma resposta local do tipo Th1. Nas lesões de LCD há uma baixa expressão de RNA mensageiro (mRNA) para IL-1 β ao lado de elevada expressão de mRNA para IL-5 e IL-10⁽²⁵⁾ confirmando a predominância de citocinas Th2 neste casos.

Há, também, uma expressão diferenciada de quimiocinas nas lesões de LCL e LCD. A expressão da proteína quimioatraente para macrófagos (MCP-1) foi baixa e a expressão da proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) foi predominante na LCD. Nos casos de LCL, a expressão de MCP-1 foi elevada e a expressão de MIP-1 α moderada. As

demais citocinas testadas (MIP-1 β , RANTES, I-309 e IL-8 foram ausentes ou tiveram expressão muito baixa nos casos de LCD⁽²⁶⁾. O mesmo grupo, complementou estas observações demonstrando que na LCD há um predomínio da expressão de CCL3/MIP-1 α , enquanto na LCL há elevada expressão de CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10. Eles sugerem que CCL2/MCP-1 contribui para a atividade leishmanicida e para o processo de cicatrização, em contraste com a atividade de CCL3/MIP-1 α ⁽²⁷⁾.

Entre as moléculas envolvidas com atividade leishmanicida, demonstrou-se a expressão diminuída da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) nas lesões de pacientes com LCD^(8,16). Como o óxido nítrico (NO) é uma molécula envolvida na atividade leishmanicida, este dado é interpretado como relacionado à elevada carga parasitária encontrada nas lesões de pacientes com LCD. Embora as indicações da participação do NO sejam muito mais claras em camundongos que no homem, é possível que outras vias relacionadas com a iNOS, como a nitrosilação de proteínas, sejam responsáveis pela proteção contra *Leishmania* no homem.

Em conjunto, os dados indicam que na lesão, assim como nas células circulantes, predomina uma resposta Th2 e mecanismos contrários à ação do IFN- γ .

Resposta imune pós-tratamento

A incapacidade de montar uma resposta Th1 contra a *Leishmania* não é geneticamente determinada, visto que após o tratamento ocorre positividade da resposta imunocelular⁽²⁸⁾. Esta positividade coincide com a melhora do quadro clínico e é demonstrada positividade da intradermoreação de Montenegro em um terço dos pacientes com Paralelamente, há redução dos níveis de anticorpos⁽²⁹⁾. Após o tratamento, ocorre também aumento da expressão de RNA para produção de IFN- γ e redução da expressão de IL-10⁽²⁸⁾. Digno de nota é o fato que esta resposta não se mantém e progressivamente ocorre uma redução na produção de IFN- γ e ocorre recaída clínica.

Não sendo geneticamente incapazes de responder aos antígenos de *Leishmania*, porque os pacientes com LCD não montam e mantêm uma resposta Th1 protetora? É possível que haja um conjunto de pequenos defeitos que mesmo sem levar à incapacidade absoluta de resposta levem a uma resposta facilmente inibível. É também possível que o parasito causador da LCD seja capaz de passar mais despercebido pelo sistema imune ou tenha a capacidade de induzir mecanismos inibitórios da resposta Th1.

Papel do parasito

Diversos estudos apontam que características dos parasitos são responsáveis, pelo menos parcialmente, pela apresentação clínica da LCD. Os isolados de *Leishmania aethiopica* obtidos de pacientes com LCD induzem uma produção menor de IL-2 e de IFN- γ que os isolados obtidos de pacientes com LCL⁽³⁰⁾. Adicionalmente, promastigotas obtidas de parasitas vindas de pacientes com LCD expressam epitopos que preferencialmente estimulam atividades

supressoras, enquanto estes epitopos são pouco frequentes ou ausentes nos isolados de pacientes com LCL, sugerindo que o parasito pode estimular células regulatórias⁽³¹⁾, aparentemente através do estímulo à produção de IL-10⁽³²⁾.

Quando testados, por western blot, soros de pacientes contra antígenos de diferentes parasitas, incluindo amostras obtidas de casos de LCD, observam-se diferenças entre os isolados obtidos de casos de LCD em relação aos demais isolados mas não um padrão definido para o grupo LCD⁽³³⁾. O uso de anticorpos monoclonais anti-*Leishmania* capazes de reconhecer diferentes complexos do parasito, em substituição aos soros de pacientes no western blot, confirmou as diferenças dos isolados obtidos de LCD em relação aos parasitos obtidos de outros casos, mas também não identificou um padrão específico⁽³⁴⁾.

Adicionalmente, há indicações que a *L. amazonensis* pode levar a apresentação antigênica não efetiva e induzir apoptose, também com possível envolvimento na hiporresponsividade da produção de citocinas implicadas na atividade leishmanicida⁽³⁵⁾.

LCD e infecção por HIV-AIDS

Há vários relatos na literatura sobre o desenvolvimento de leishmaniose em pacientes com infecção pelo HIV-AIDS. Muitas destas observações se referem aos casos de leishmaniose visceral, mas há também casos de LCD^(36,38). Em muitos destes relatos se utiliza a designação leishmaniose cutânea disseminada, mas parece tratar-se realmente da leishmaniose cutânea difusa, e estas são entidades clínicas distintas⁽³⁹⁾. Na leishmaniose cutânea disseminada a imunidade celular contra *Leishmania* está presente, enquanto nos casos de AIDS ocorre um comprometimento acentuado da resposta mediada por células CD4+. Experimentalmente, a infecção pelo vírus da imunodeficiência murina leva ao comprometimento da resposta Th1 e aumento da resposta Th2 e leva a uma forma de doença mais semelhante à LCD⁽⁴⁰⁾.

O desenvolvimento de LCD também tem sido associado à síndrome inflamatória de reconstituição imune em pacientes com AIDS após o início da terapia antiviral^(41,42).

Perspectivas de estudo

Apesar do progresso recente no estudo dos aspectos imunológicos da LCD ainda há muitos aspectos a serem esclarecidos na imunopatogênese desta enfermidade. A própria raridade da doença limita as investigações já que o reduzido número de pacientes dificulta comparações.

A ausência de resposta imunocelular, com comprometimento da produção de IFN- γ , pode estar relacionada a aspectos externos ao sistema imune, como a influência de hormônios. Os pacientes com LCD possuem níveis séricos de dehidroandrosterona (DHEA) e cortisol mais baixos que pacientes com LCL⁽⁴³⁾. Níveis baixos de DHEA e cortisol têm sido associados a enfermidades que se apresentam com inflamação crônica, baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-6⁽⁴⁴⁾.

O direcionamento da resposta imune para o polo Th1 é bastante influenciado pela produção prévia de IL-12 e esta citocina é importante para a resistência contra *Leishmania*^{45, 46}. O reconhecimento da *Leishmania* é uma etapa crítica para que ocorra a produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígeno. Vários receptores de *Leishmania* foram descritos. É possível que alterações estruturais ou funcionais de alguns destes receptores ocorram em alguns indivíduos e favoreça o desvio para a resposta Th2. Será necessário explorar a expressão e funcionamento destes receptores nos pacientes com LCD.

Além de aprofundar nos mecanismos já investigados, deve-se expandir para avaliar vários outros aspectos que permitam uma compreensão mais adequada dos mecanismos imunológicos da LCD.

Referencias

- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol* 34: 474-479, 1995.
- Ulrich M, Rodriguez V, Centeno M, Convit J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol* 100: 54-58, 1995.
- Rodriguez V, Centeno M, Ulrich M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol* 18: 341-345, 1996.
- Skeiky YA, Benson DR, Costa JL, Badaro R, Reed SG. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Inf Imm* 65: 5368-5370, 1997.
- Cabrera M, Rodriguez O, Monsalve I, Tovar R, Hagel I. Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 88: 145-151, 2003.
- Petersen EA, Neva FA, Oster CN, Bogaert Diaz H. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 306: 387-392, 1982.
- Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho EM, Barral A. Human leishmaniasis/cytokines.bahia.br. *Braz J Med Biol Res* 31: 149-155, 1998.
- Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70: 4638-4642, 2002.
- Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Imm* 29: 671-678, 2007.
- Rada E, Trujillo D, Castellanos PL, Convit J. Gamma interferon production induced by antigens in patients with leprosy and American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 37: 520-524, 1987.
- Petersen EA, Neva FA, Barral A, Correa-Coronas R, Bogaert-Diaz H, Martinez D, Ward FE. Monocyte suppression of antigen-specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patients from the Dominican Republic. *J Immunol* 132: 2603-2606, 1984.
- Castes M, Cabrera M, Trujillo D, Convit J. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 26: 1207-1213, 1988.
- Melby PC, Neva FA, Sacks DL. Profile of human T cell response to leishmanial antigens. Analysis by immunoblotting. *J Clin Invest* 83: 1868-1875, 1989.
- Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 26: 233-238, 1993.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548, 1992.
- Diaz NL, Arvelaez FA, Zerpa O, Tapia FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 31: 114-117, 2006.
- Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, Bittencourt AL, Reed S, Carvalho EM, Barral-Netto M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 147: 947-954, 1995.
- Barral-Netto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H, Reed SG, Johnson WD, Jr. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J Immunol* 147: 281-284, 1991.
- Akuffo H, Maasho K. High serum-soluble interleukin-2 receptor is not associated with the immunosuppression in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol* 39: 505-511, 1994.
- Fernandez-Mestre M, Sanchez K, Balbas O, Gendzekhadze K, Ogando V, Cabrera M, Layrisse Z. Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases. *Hum Immunol*, 2009.
- Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga R, Shaw JJ, Quinnell RJ, Soong L, Kima P, McMahon-Pratt D, Black GF, Shaw MA. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunol* 20: 19-26, 1998.
- Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, Rea TH, Convit J. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 60: 241-248, 1985.
- Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez AE, Convit J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res* 26: 239-247, 1993.
- Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Perez-Torres A, Perez-Montfort R, Dominguez JD, Velasco-Castrejon O, Crippa M, Becker I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 4: 801-811, 1999.
- Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91: 500-505, 1993.
- Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 699-709, 1996.
- Ritter U, Korner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24: 295-301, 2002.
- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 84: 188-194, 1996.
- Convit J, Ulrich M. Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 26: 159-166, 1993.

30. Akuffo H, Schurr E, Andersson G, Yamaneberhan T, Britton S. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. *Scand J Immunol* 26: 717-721, 1987.
31. Akuffo HO, Fehniger TE, Britton S. Differential recognition of *Leishmania aethiopica* antigens by lymphocytes from patients with local and diffuse cutaneous leishmaniasis. Evidence for antigen-induced immune suppression. *J Immunol* 141: 2461-2466, 1988.
32. Akuffo H, Maasho K, Bløstet M, Hojeberg B, Britton S, Bakhiet M. *Leishmania aethiopica* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon-gamma. *J Infect Dis* 175: 737-741, 1997.
33. Leon LL, Machado GM, Paes LE, Grimaldi Junior G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 678-680, 1990.
34. Leon LL, Machado GM, Barral A, de Carvalho-Paes LE, Grimaldi Junior G. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 229-234, 1992.
35. Pinheiro RO, Pinto EF, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *An Acad Bras Cienc* 76: 519-527, 2004.
36. Coura JR, Galvao-Castro B, Grimaldi Junior G. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 581-582, 1987.
37. Calza L, D'Antuono A, Marinacci G, Manfredi R, Colangeli V, Passarini B, Orioli R, Varoli O, Chiodo F. Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS. *J Am Acad Dermatol* 50: 461-465, 2004.
38. Manfredi R, Marinacci G, Calza L, Passarini B. Diffuse cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis during human immunodeficiency virus (HIV) infection, despite negligible immunodeficiency: repeated failure of liposomal amphotericin B administration, followed by successful long-term pentamidine and paromomycin administration. *Int J Antimicrob Agents* 31: 590-592, 2008.
39. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89: 319-323, 1986.
40. Barral-Netto M, da Silva JS, Barral A, Reed S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *Am J Pathol* 146: 635-642, 1995.
41. Posada-Vergara MP, Lindoso JA, Tolezano JE, Pereira-Chioccola VL, Silva MV, Goto H. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *J Infect Dis* 192: 1819-1822, 2005.
42. Sinha S, Fernandez G, Kapila R, Lambert WC, Schwartz RA. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol* 47: 1263-1270, 2008.
43. Galindo-Sevilla N, Soto N, Mancilla J, Cerbulo A, Zambrano E, Chavira R, Huerto J. Low serum levels of dehydroepiandrosterone and cortisol in human diffuse cutaneous leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg* 76: 566-572, 2007.
44. Leng SX, Cappola AR, Andersen RE, Blackman MR, Koenig K, Blair M, Walston JD. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), and their relationships with serum interleukin-6, in the geriatric syndrome of frailty. *Aging Clin Exp Res* 16: 153-157, 2004.
45. Mattner F, Di Padova K, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun* 65: 4378-4383, 1997.
46. Sato AR, Rodig S, Telford SR, 3rd, Sato AA, Ghosh SK, von Lichtenberg F, David JR. IL-12 gene-deficient C57BL/6 mice are susceptible to *Leishmania donovani* but have diminished hepatic immunopathology. *Eur J Immunol* 30: 834-839, 2000.