



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS  
ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL**

**FABRICIO ANDERSON CARVALHO ALMEIDA**

***IMUNOREATIVIDADE PARA TGF- $\beta$  E CASPASE-3 E SUA RELAÇÃO COM O CONTROLE DA  
RESPOSTA IMUNE TECIDUAL NAS  
FORMAS POLARES DA HANSENÍASE.***

**Belém - Pará  
2007**

**FABRICIO ANDERSON CARVALHO ALMEIDA**

***IMUNOREATIVIDADE PARA TGF- $\beta$  E CASPASE-3 E SUA RELAÇÃO COM O CONTROLE DA  
RESPOSTA IMUNE TECIDUAL NAS  
FORMAS POLARES DA HANSENÍASE.***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais. Área: Patologia. Orientador: Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma.

**BELÉM – PARÁ  
2007**

**A447**      **Almeida, Fabricio Anderson Carvalho**  
**Imunoreatividade para TGF- $\beta$  e Caspase-3 e sua**  
**relação com o controle da resposta imune tecidual nas**  
**formas polares da hanseníase. - Belém, 2007.**  
**92 f.**

**Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais -**  
**Patologia) –Universidade Federal do Pará, 2007.**

1. Hanseníase. 2. TGF- $\beta$ . 3. Apoptose. 4.  
imunopatologia. 5. *Mycobacterium leprae*. I. Título.

CDD: 616.998

**FABRICIO ANDERSON CARVALHO ALMEIDA**

**IMUNOREATIVIDADE PARA TGF-  $\beta$  E CASPASE 3 E SUA RELAÇÃO COM O CONTROLE DA  
RESPOSTA IMUNE TECIDUAL NAS  
FORMAS POLARES DA HANSENÍASE.**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais. Área: Patologia. Orientador: Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma.

**Data da aprovação: 30 de novembro de 2007.**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arival Cardoso Brito  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Brasil Xavier  
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Catarina Medeiros de Sousa  
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Aos meus avô Antonio Carvalho, a minha amada mãe Graça Carvalho, a minha linda noiva Anna Paula, aos meus queridos irmãos Marcelo Andrey, Patrícia Alyne e Leticia Ayla Carvalho Almeida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder vida, saúde e sabedoria para escolher caminhos e encontrar saídas;

Ao meu avô, Antonio Carvalho, meu amigo, meu apoio e exemplo de força e garra;

A minha mãe, por ser tudo na minha vida, luz, paz, solução e principalmente fonte de amor;

A Anna Paula, meu cais de apoio, felicidade e amor;

Aos meus irmãos, minha fonte fraterna de força;

Ao meus sogros, por terem me ajudado e apoiado nesta batalha árdua;

A meu orientador, Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma, um agradecimento mais que especial, um amigo, que no decorrer desta jornada me ajudou a crescer, conduzindo-me de forma tranqüila aos objetivos finais;

A profa. Dra. Marília Xavier Brasil, profa. Dra. Elza Baia de Brito e prof. Dr. Arival Cardoso Brito pela contribuição na coleta de dados;

A profa. Maria das Graças Carvalho Almeida, por seu apoio, deste o ingresso, até o final deste curso;

Ao Arnaldo Filho, por auxiliar na revisão deste trabalho;

A Maria do Socorro, secretária do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, pela atenção dispensada ao longo de toda esta jornada;

Ao Victor e Ana Paula Ricker, amigos de fundamental importância deste o início desta trajetória;

Ao Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, instituição que abriu as portas e me acolheu para que eu pudesse conquistar meu sonho;

Ao CNPq pelo aporte financeiro fundamental para a execução deste trabalho;

A todos que direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.



**Epigrafe**

“A busca do conhecimento é uma luta incessante entre o não saber e o querer saber. Dialética presente no coração dos cientistas, que não se contentam somente em viver, mas buscam fazer valer e acontecer tudo que sonham.”

Caio Cunha



## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica que acompanha a humanidade há muitos anos. O Brasil ocupa o segundo lugar em números de casos, sendo que o estado do Pará é o que apresenta o maior número de casos absolutos. Este estudo teve como objetivo avaliar a imunorreatividade para TGF- $\beta$  e caspase-3 nas formas clínicas virchowiana e tuberculóide do mal de hansen procurando correlacionar o padrão de imunomarcção com o controle tecidual da resposta imune do hospedeiro ao bacilo, através de um estudo de caso controle com 30 pacientes, sendo quinze apresentando na forma virchowiana e quinze com o tipo tuberculóide. Os pacientes seguiram o protocolo de diagnóstico de hanseníase segundo critérios do Ministério da Saúde do Brasil. Observou-se que a forma virchowiana da hanseníase apresentou uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0,4630$ ) entre o TGF- $\beta$  a caspase-3, evidenciando que tanto a citocina quanto o imunomarcador da apoptose aumentam gradativamente e simultaneamente nesta forma polar e que indiretamente aponta para um papel do TGF- $\beta$  no controle da resposta imunológica in situ à infecção pelo *Mycobacterium leprae*.

Palavras-chave: hanseníase, TGF- $\beta$ , apoptose, citocinas, imunopatologia, *Mycobacterium leprae*.

#### ABSTRACT

Leprosy is a chronic infect-contagious disease that accompanies the humanity for many years. Brazil occupies the second place in numbers of cases, and the state of Para is that presents the largest number of absolute cases. This study had as objective to evaluate the immunoreactivity for TGF- $\beta$  and caspase-3 in the lepromatous and tuberculoid clinical forms of the leprosy evil trying to correlate the immunomarking pattern with the tissue control of the immune response of the host to the bacillus, through a retrospective study of paraffin enclosed tissue of 30 patients, being fifteen presenting in the lepromatous form and fifteen with the tuberculoid type of disease. The patients followed the protocol of leprosy diagnosis according to criteria of Health Ministry of Brazil and histopathologic features. It was observed that the lepromatous form of the leprosy presented a significant statistically correlation ( $p=0,4630$ ) among TGF- $\beta$  to caspase-3, evidencing that as the cytokine as the imunomarking of the apoptosis increase inch by inch and simultaneously in this polar form and that indirectly appear to a role of TGF- $\beta$  in the control of the immunologic response in its place to the infection for the *Mycobacterium leprae*.

**Keywords:** leprosy, TGF- $\beta$ , apoptosis, citocines, immunopathology, *Mycobacterium leprae*.

## SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	xi
	LISTA DE ABREVEATURAS.....	xii
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>05</b>
1.1	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	05
1.2	ASPECTOS CLÍNICOS.....	10
1.3	CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS.....	15
1.4	ETIOLOGIA.....	19
1.5	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE.....	21
1.6	APOPTOSE.....	31
1.6.1	APOPTOSE COMO FENÔMENO DE MORTE CELULAR.....	31
1.6.2	APOPTOSE, SISTEMA IMUNE E DOENÇAS INFECCIOSAS....	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	41
3.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO E LOCAL DA PESQUISA .....	41
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	42
3.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	42
3.5	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	42
3.6	COLORAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	43
3.7	ANÁLISE QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA.....	45
3.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	45
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
4.1	ESTATÍSTICA DESCRITIVA.....	46
4.2	TESTE DE CORRELAÇÃO.....	49
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxa de prevalência da Hanseníase no mundo.....	08
Figura 2	Prevalência da Hanseníase na América Latina em 2004.....	09
Figura 3	Hanseníase Indeterminada.....	12
Figura 4	Hanseníase Tuberculóide.....	12
Figura 5	Hanseníase Dimorfa Tuberculóide .....	13
Figura 6	Hanseníase Dimorfa.....	13
Figura 7	Hanseníase Dimorfa Virchowiana.....	14
Figura 8	Hanseníase Virchowiana.....	14
Figura 9	Representação diagramática do Índice Bacteriológico .....	17
Figura 10	Hanseníase Indeterminada .....	18
Figura 11	Hanseníase Tuberculóide.....	18
Figura 12	Hanseníase Dimorfa Virchowiana.....	19
Figura 13	Hanseníase Virchowiana.....	19
Figura 14	Resposta imune da Hanseníase.....	30
Figura 15	TGF- $\beta$ nas formas polares da hanseníase.....	47
Figura 16	Caspase-3 nas formas polares da hanseníase.....	49
Figura 17	Caspase-3 e TGF- $\beta$ na forma virchowiana da hanseníase.....	50
Figura 18	Caspase-3 e TGF- $\beta$ na forma tuberculóide da hanseníase.....	51

### LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
a.C	antes de Cristo
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	Bordeline bordeline
BL	borderline lepromatosa
BT	borderline tuberculóide
CD95L	Ligante de CD95
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cod.	Código
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
d.C	depois de Cristo
DATASUS	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
DISC	Indução da sinalização do complexo de morte
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ENL	Eritema Nodoso
et al.	Colaboradores
FADD	Fas associado ao domínio de morte
FasL	Ligante de Fas
hab.	Habitantes
HB	hanseníase bordeline
HD	hanseníase dimorfa
HI	hanseníase indeterminada
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HL	Hanseníase lepromatosa
HLA	antígeno leucocitário humano (Human lymphocyte antigens)

HLA-DQ	antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DQ
HLA-DR	antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR
HT	hanseníase tuberculóide
HV	hanseníase virchowiana
H0	Hipótese nula
H1	Hipótese alternativa
I	Indeterminada
IAP	Inibidor de proteínas apoptóticas
IB	Índice bacteriológico
IFN- $\gamma$	interferon <i>gama</i>
IgM	imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
L	Lepromatosa
LL	Lepromatosa
MB	Multibacilar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHT	Hanseníase Tuberculóide
MHV	Hanseníase Virchowiana
mL	Mililitro
ML-LBP21	<i>Mycobacterium leprae</i> -laminin binding protein 21
MS	Ministério da Saúde
NK	células natural <i>killer</i>

O <sub>2</sub>	Oxigênio
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
OMS	Organização Mundial da saúde
PB	Paucibacilar
PBS	Estreptavidina-Biotina Peroxidase
PDIM	Fticerol Dimicocerosado
PGL-1	glicolípídeo – fenólico 1
Ph	Potencial de hidrogênio
R. Domin.	República Dominicana
SABC	Estreptavidina-Biotina Peroxidase
Sta. Lúcia	Santa Lúcia
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
TCLE	Termo de consentimento Livre e esclarecido
TGF- $\beta$	fator transformador do crescimento-beta
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral - alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRADD	Proteínas adaptadoras do receptor do TNF com o domínio de morte
TT	Tuberculóide
UFPa	Universidade Federal do Pará
X	Vezes
WHO	Organização mundial da saúde
$\kappa$ Da	Quilo Daltons
$\mu$ m	Micrometro

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica que acompanha a humanidade há muitos anos, existindo relatos bíblicos que ratificam esta afirmação como nos capítulos 14 e 15 de Levítico, um dos livros que compõem o antigo testamento. Outras referências históricas importantes são a presença da hanseníase notificada em tratados médicos chineses, o Nei Ching Su Wen, nas proximidades dos anos 2600 a.C. e escrituras na Índia, evidenciado nos livros sagrados, Regveda Samhita, em 1500 a.C., que denomina a doença de kushita (OPROMOLLA, 2000; HELMER et al., 2004; TRALÉ et al., 2005).

No antigo testamento, há relato sobre esta moléstia como a praga da “lepra”, através da tradução grega da palavra tsaraath, de “lepros” em grego, que significa uma condição anormal da pele dos indivíduos, das roupas ou das casas, que necessitavam de “purificação”. (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002).

Na Europa em torno de 300 a.C., evidências do aparecimento da doença ocorreram com o regresso de militares contaminados, remanescentes das batalhas ocorridas na Índia, liderados por Alexandre, o Grande, sendo, portanto, considerados os responsáveis pela disseminação da doença no continente. Somente em 1500 d.C. a hanseníase passou a ser bem conhecida. Areteo da



Capadocia e Galeno denominavam a doença de elefantíase ou “elephas”, sem fazer referência a distúrbios de sensibilidade, como faziam os autores chineses, que citavam em seus escritos os distúrbios neurológicos. Nesse período, Areteo foi o primeiro a observar a face infiltrada do paciente com hanseníase virchowiana, denominando estas manifestações de “face leonina” (CUNHA, 2002).

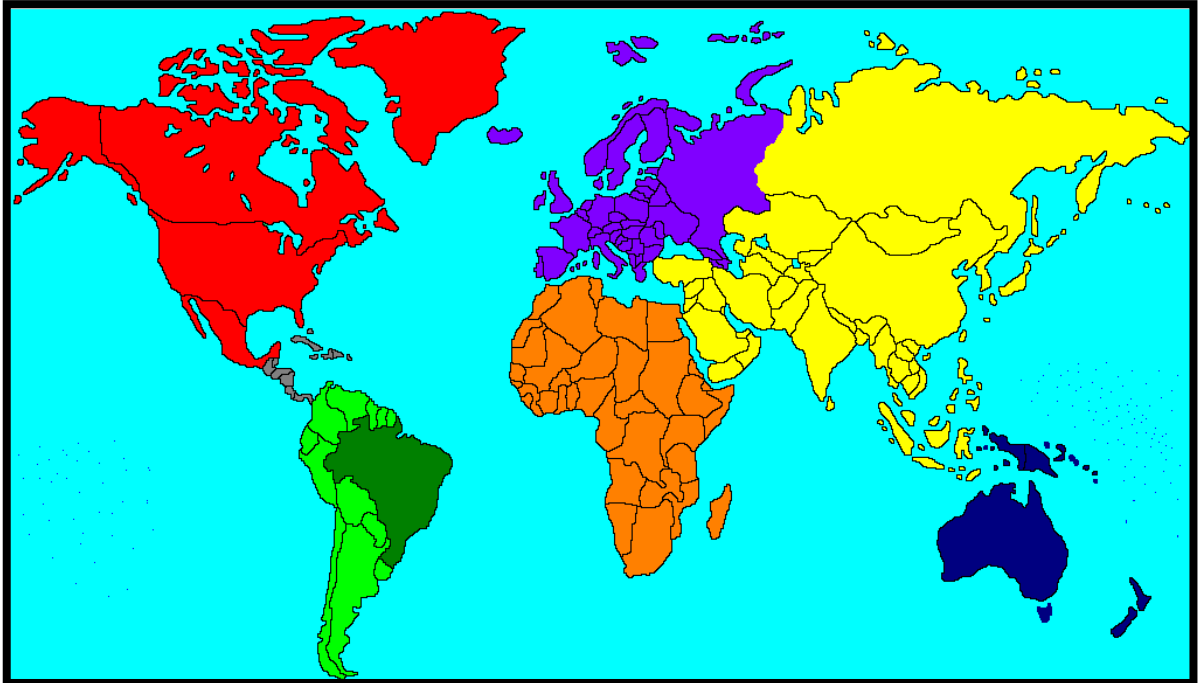
Na África, a ocorrência da hanseníase se deu ao longo das rotas comerciais, durante a Idade Média. Há referências desta doença, no Egito, desde 1350 a.C. e de que, provavelmente ela teria sido introduzida pelos escravos negros do Sudão (MUIR, 1974). Nas Américas a hanseníase foi introduzida na metade do século XVI por imigrantes europeus, franceses, espanhóis e portugueses e posteriormente escravos africanos; especialmente no Brasil. Os casos registrados, atualmente nos Estados Unidos, são de veteranos da II Guerra Mundial e de imigrantes recentes, principalmente, dos países asiáticos (YAWALKAR, 2002).

Gerhard Henrik Armauer Hansen, em 1874, descobriu o bacilo álcool-ácido-resistente e Gram-positivo, denominado atualmente de *Mycobacterium leprae*, agente etiológico desta doença, sendo desta forma o primeiro a correlacionar a hanseníase a um microorganismo. Devido a isso, esse pesquisador sofreu perseguições e calúnias, sendo afastado do leprosário e não pôde dar continuidade ao seu trabalho experimental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; BEIGUELMAN, 2002).

Em 1600 foram identificados os primeiros casos de hanseníase no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro. Na época, a exemplo da Europa, foi utilizada

como método de controle a segregação de contaminados. No início do século XX, esta moléstia foi reconhecida como problema de saúde pública por Oswaldo Cruz, Emílio Ribas e Alfredo da Mata e devido a este fato, foi criado, em 1941, o Serviço Nacional de Hanseníase visando analisar o problema mais especificamente (OPROMOLLA, 2000).

O número de novos casos de hanseníase detectados e registrados no mundo em 2004, segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, foi de 407.791, sendo o sudeste da Ásia, o maior detentor de casos, com 298.603 (18,3), seguido pela África com 46.918 (6,5), Américas com 52.662 (6,0), Pacífico Ocidental com 6.612 (0,4), e o Leste Mediterrâneo com 3.392 (0,7) (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2005). O Brasil ocupa o segundo lugar em números de casos, sendo superado apenas pela Índia e considerado pela OMS como área de alta endemicidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2005), embora tenha apresentado redução significativa de sua prevalência de 16,4 por 10.000 habitantes em 1985 para 1,48 por 10.000 habitantes em 2005, aproximando-se da meta de eliminação proposta do Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010 com a redução de sua prevalência para 1 caso por 10.000 habitantes no período de 2006 a 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).



FONTE: WHO, 2005







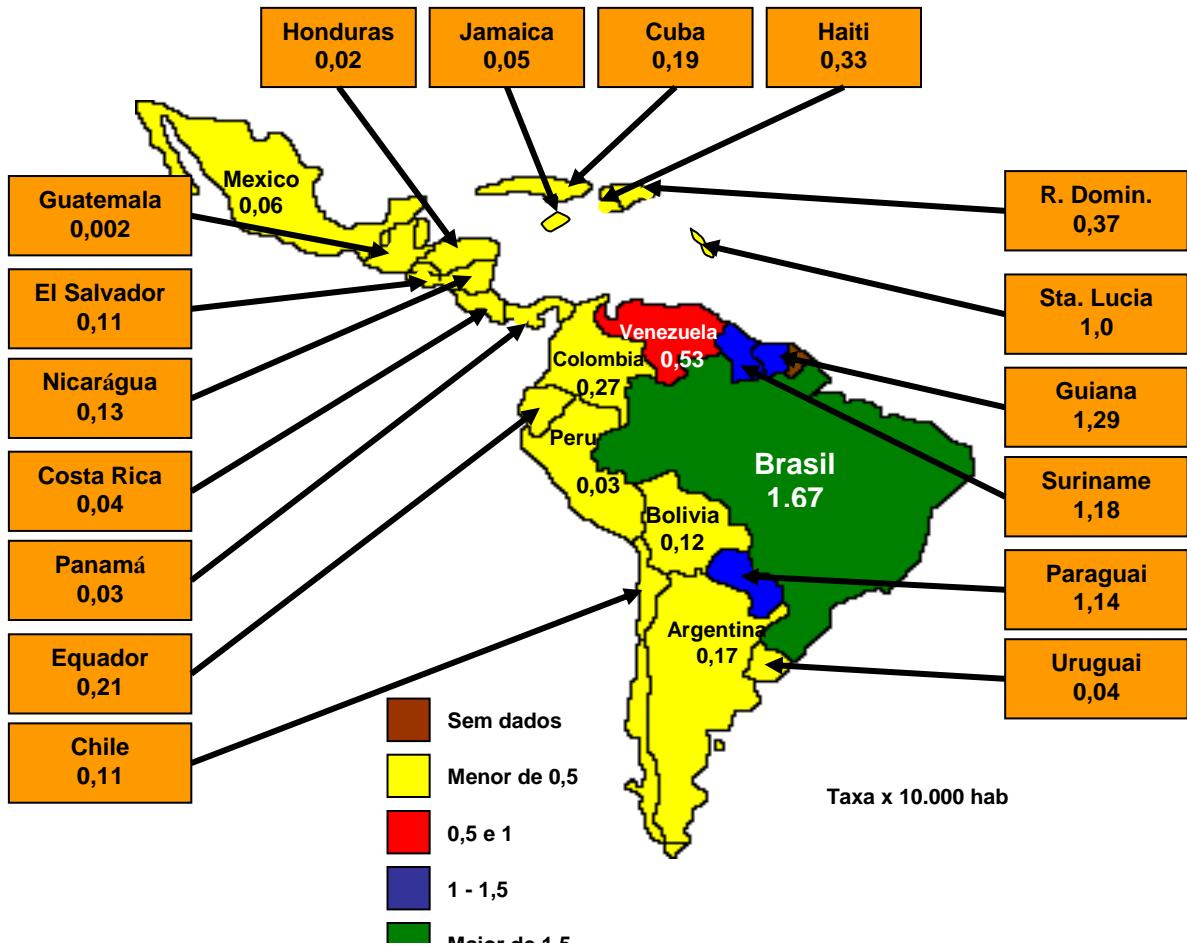
	Ásia – 186.182 (1.14) / 10.000 hab.		Pacífico Ocidental – 10.010(0.06) / 10.000 hab.
	Américas – 36.877 (0.42) / 10.000 hab.		África – 47.596 (0.66) / 10.000 hab.
	Brasil – 30.693 (1.7) / 10.000 hab.		Mediterrâneo Oriental – 5.396 (0.12) /10.000

FIGURA 1: Taxa de prevalência da hanseníase no mundo.



FONTE: Adaptado da Organização Pan Americana de Saúde - OPAS, 2005.  
 FIGURA 2: Prevalência da hanseníase na América Latina 2004.

As taxas de prevalência de 2004 as regiões Sul e Sudeste já alcançaram a meta de eliminação, porem apesar da redução dos coeficientes de prevalência da hanseníase no Brasil, observam-se algumas áreas de alta endemicidade. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O quadro abaixo revela a realidade das regiões brasileiras em 2005, ele revelava que a região sul e a sudeste apresentam um parâmetro de endemicidade médio. No nordeste, observa-se um quadro de alta endemicidade, enquanto que as regiões norte e centro-oeste apresentam o maior índice observado, sendo classificados com o parâmetro hiperendêmico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

**TABELA 1:** Prevalência e detecção da hanseníase 2005, por região.

<b>Região</b>	<b>Prevalência</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Detecção</b>	<b>Parâmetro</b>
Norte	4,02	Médio	5,63	Hiperendêmico
Nordeste	2,14	Médio	3,07	Muito alto
Sudeste	0,60	Médio	0,88	Médio
Sul	0,53	Baixo	0,69	Médio
Centro-Oeste	3,30	Médio	4,41	Hiperendêmico
Brasil	1,48	Médio	2,09	Muito alto

Fonte: SINAN/DATASUS/MS, 2006.

O Pará é foi primeiro do Brasil em números absolutos de casos (5.814) no ano de 2003, e é considerado o detentor do maior número de casos de hanseníase na região Norte, apresentando um complexo hiperendêmico da doença, considerado como um grande problema de saúde pública, principalmente na região sudeste do Pará, nos municípios de Jacundá e Eldorado dos Carajás, aonde o número de casos vem aumentando a cada ano devido ao elevado fluxo migratório de garimpeiros e trabalhadores rurais vindos do nordeste do País (MINISTERIO DA SAUDE, 2005; SECRETARIA DE VIGILANCIA A SAUDE, 2004).

## 1.2. ASPECTOS CLÍNICOS

A resposta imunológica está diretamente relacionada com os aspectos clínicos da hanseníase, tendo variações individuais correlatas à carga bacteriana, do percurso do bacilo e da natureza da célula apresentadora de antígeno. As manifestações clínicas têm foco de ação de lesão nos nervos periféricos e na pele, concomitantemente ou não.

Inicialmente o quadro infeccioso caracteriza-se classicamente pela

forma indeterminada (HI), tendo como sinal evidente, máculas hipocrômicas com alteração na sensibilidade do tipo hipohidrose, podendo apresentar alopecia focal, porém não há comprometimento de troncos nervosos e, por isso, não ocorrem alterações motoras ou sensitivas que possam causar incapacidade. (OMS/OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

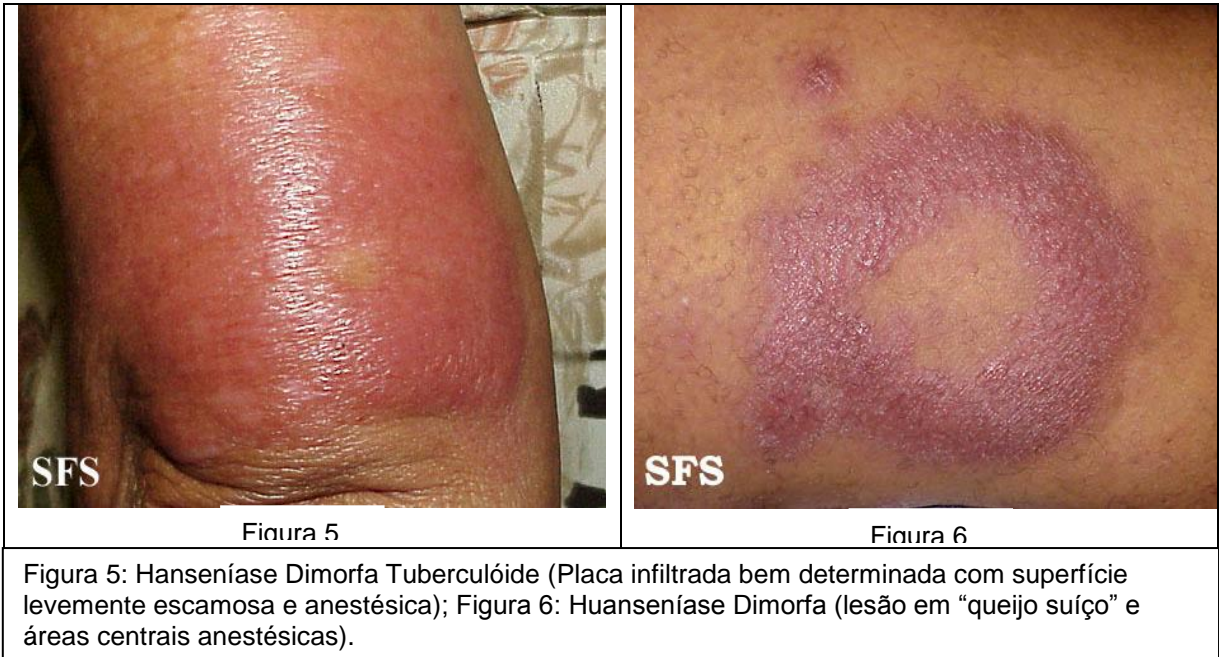
A forma indeterminada (HI) é o aspecto clínico inicial da doença e um fator determinante de sua evolução. A imunidade do hospedeiro e a não intervenção terapêutica. São determinantes para a evolução da doença para forma tuberculóide (HT), que tem como características clínicas o aparecimento de lesões tuberculóides maduras planas ou elevadas, formando placas bem individualizadas, com limites nítidos com a pele normal; não apresenta tendência à disseminação e, em alguns casos, podem evoluir para a cura espontânea. A sensibilidade térmica dolorosa está alterada, as lesões mais antigas apresentam alterações na sensibilidade tátil, alopecia, hipohidrose ou anidrose e dor nos nervos periféricos, que são em geral unilaterais. (TALHARI; NEVES, 1997; OPROMOLLA, 2000; YAWALKAR, 2002).



Figura 3: Hanseníase Indeterminada (Mácula com leve hipocrômica e perda parcial da sensibilidade); Figura 4: Hanseníase Tuberculóide (Lesão circinada com bordas róseas, elevadas e granulosas; área central insensível ao toque e á dor).

Fonte: GUINTON, 1990

A hanseníase dimorfa ou “borderline” (HD ou HB) é conseqüência da evolução da forma indeterminada, sendo muito instável, apresentando lesões geralmente em forma de placas, faixas e nódulos. As placas apresentam-se com bordas irregulares, com limites de difícil identificação e colorações ferruginosas. As características marcantes destas lesões é o centro circular, hipocromia, em geral são planas, bem delimitadas e com a periferia infiltrada formando um bordo espesso que se difunde gradativamente para a pele, aparentemente, são circunvizinha. Os nervos periféricos podem estar comprometidos de maneira extensa e intensa principalmente quando sofrem reagudização da doença, denominada de reação tipo I ou reação reversa (OMS/OPAS, 1989; VAN BEERS et al., 1999; YAWALKAR, 2002).



Fonte: GUINTON, 1990

A forma clínica Indeterminada pode se apresentar com resistência imunológica ineficaz e evoluir para a forma virchowiana. Suas lesões podem se manifestar como um surto de eritema nodoso ou uma infiltração difusa com formação de pápulas, tubérculos, nódulos e placas, denominadas genericamente de hansenomas, que ocorrem por total ausência de resistência imune ao bacilo. Outra característica desta forma clínica é o infiltrado nasal, com lesões tonsilares, linguais, pregas palatinas, mucosa oral, palato duro e mole, bulbo ocular, tendo um comprometimento neural brando na fase inicial se enfatizando com a progressão do quadro clínico (TALHARI & NEVES, 1997; MARCUCCI et al., 2000; YAWALKAR 2002).





Figura 7: Hanseníase Dimorfa Virchowiana (Numerosas placas disseminadas lesões anulares, pápulas e máculas, com baixa perda de sensibilidade); Figura 8: Hanseníase Virchowiana (acentuado infiltração difusa, madarose e perdas se cílios).

Fonte: GUINTON, 1990

A maior seqüela que a hanseníase esta doença acarreta são as alterações neurais, desta forma, o diagnóstico histopatológico é primordial para a detecção do *Mycobacterium leprae* e dos danos neurais e cutâneos. As seqüelas dermatológicas e neurológicas podem ocorrer em todas as fases da doença, porém na forma indeterminada ocorrem nos ramúsculos nervosos da pele, mas são raríssimos nos troncos nervosos periféricos normalmente comprometidos a partir da forma tuberculóide. A lesão nos nervos periféricos provoca parestesias e /ou paralisias, tendo como efeito progressivo infecções freqüentes, osteomielite, reabsorção óssea com perda de dígitos ou deformidades resultantes de traumas devido à perda da sensibilidade (SAMPALIO et al., 2002; HAHN, 2004).

A hanseníase, devido as suas seqüelas neurais e motoras, é classificada como uma doença incapacitante, marginalizando e levando à diminuição ou à interrupção da capacidade produtiva de milhares de pacientes (OPROMOLLA, 2000; WHO, 2000).

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS

Ao longo dos anos, várias classificações foram propostas, sendo as seguintes as mais usuais:

- Classificação de Madri: Ocorreu em Madri, em 1953, o VI Congresso Internacional de Leprologia, onde foi exposta uma classificação baseada em quatro critérios: Clínico, Imunológico, histológico e o bacteriológico. Hoje, nas unidades de saúde coletiva no Brasil, esta classificação é a mais utilizada para realização de diagnóstico, tendo como ponto de organização duas formas imunológicas polares estáveis – forma tuberculóide (HT) e a forma virchowiana (HV) – e dois grupos imunológicos centrais instáveis – o grupo indeterminado (HI) e o grupo dimorfa (HD) (OMS; OPAS, 1989; GALLO et al., 2003).

- Classificação Ridley e Jopling: Esta classificação foi elaborada em 1966 por dois médicos Ingleses, Ridley e Jopling e tem como foco principal de seleção a análise histopatológica, aceitando a possibilidade de formas evolutivas, tomando uma forma espectral, podendo migrar para o pólo de resistência (TT), ou para o pólo anérgico (LL). Os subtipos são os seguintes: I – TT – BT – BB – BL – LL.

- Classificação da OMS (Organização Mundial de Saúde): Esta classificação foi elaborada em 1989 e fundamentada no número de lesões que o indivíduo apresenta. Se o paciente apresentar seis ou mais lesões, serão considerados multibacilares (MB - formas HD e HV e os, com menos de 6 lesões,

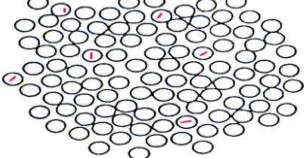
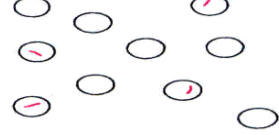
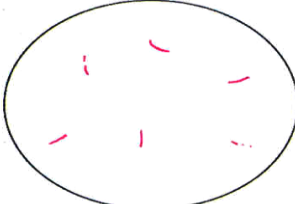
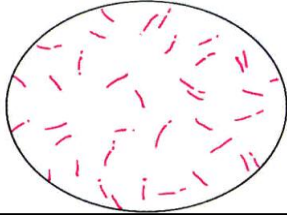
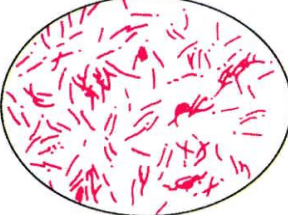
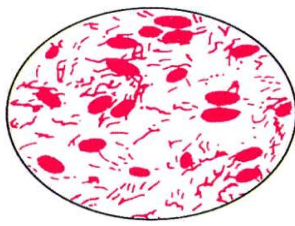
serão considerados paucibacilares (PB) - HI e HT).

- A classificação pelo Índice Baciloscópio: Esta classificação é baseada na avaliação da densidade de bacilos vivos e mortos em esfregaços de lesões cutâneas, coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, são mensurados por uma escala de logaritmo de Ridley observado em campo microscópico médio pela objetiva de imersão em óleo. Esta classificação foi elaborada por Ridley (RIDLEY & JOPLING, 1966).

O método baciloscópio, para ser realizado, necessita de alguns critérios, como: apenas realizar a coleta através do raspado celular em pacientes que apresentam sinais e/ou sintomas dermatológicos e neurológicos compatíveis com hanseníase e devem ser coletados de quatro locais distintos, que segundo o Ministério da Saúde, são: lóbulo da orelha direita; lóbulo da orelha esquerda; cotovelo direito ou esquerdo se houver lesão a ser coletada do lado esquerdo ou direito do corpo do paciente respectivamente; e lesão propriamente dita (OMS/OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

Quando o indivíduo não apresenta evidência de lesões cutâneas, opta-se pela coleta dos cotovelos direito e esquerdo. O Método de Ziehl-Neelsen é a técnica de escolha, sendo útil para o diagnóstico e classificação dos pacientes para fins de tratamento em multibacilares, formas clínicas Dimorfa e Virchowiana, que apresentam Índice baciloscópio diferente de zero em qualquer um dos sítios de coleta. Paucibacilares, formas clínicas Indeterminada e Tuberculóide com índice baciloscópio igual a zero em qualquer dos sítios examinados. A multidrogaterapia é

administrada durante 12 meses para os pacientes multibacilares e de seis meses para os paucibacilares. (OMS/OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

<p><b>IB 1 + = 1-10 bacilos em média em 100 campos examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão).</b></p> 	<p><b>IB 2 + = 1-10 bacilos em média em 10 campos examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão).</b></p> 
<p><b>IB 3+ = 1-10 bacilos, em média por campo, examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão).</b></p> 	<p><b>IB 4+ = 10-100 bacilos, em média por campo, examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão).</b></p> 
<p><b>IB 5+ = 100-1000 bacilos, em média por campo, examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão).</b></p> 	<p><b>IB 6+ = Mais de 1000 bacilos, em média por campo, examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão).</b></p> 

FORNE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002.

FIGURA 9: Representação diagramática do Índice bacteriológico de esfregaços de pele de acordo com a escala de Ridley e Jopling.

Com base nos critérios histológicos da classificação de Ridley e Jopling, originariamente planejada em 1962 com a finalidade de averiguar as modificações que ocorrem nos tecidos de indivíduos portadores de hanseníase, podemos observar um espectro de lesões histológicas que difere entre os diferentes grupos considerados. Na forma indeterminada há ausência de infiltrado ou apresenta pequeno infiltrado celular incipiente composto unicamente de linfócitos que circundam os ramos nervosos e anexos da pele, enquanto que na forma

Tuberculóide (TT), os BAAR (bacilos álcool ácido resistente) são pouco observados no infiltrado, e este consiste de ilhas de células epitelióides rodeado por uma densa massa de linfócitos, os quais pressionam a epiderme mostrando ausência de zona livre subepidérmica, com presença das células gigantes de langhans com infiltração e destruição dos ramos nervosos, o que dificulta o seu reconhecimento.

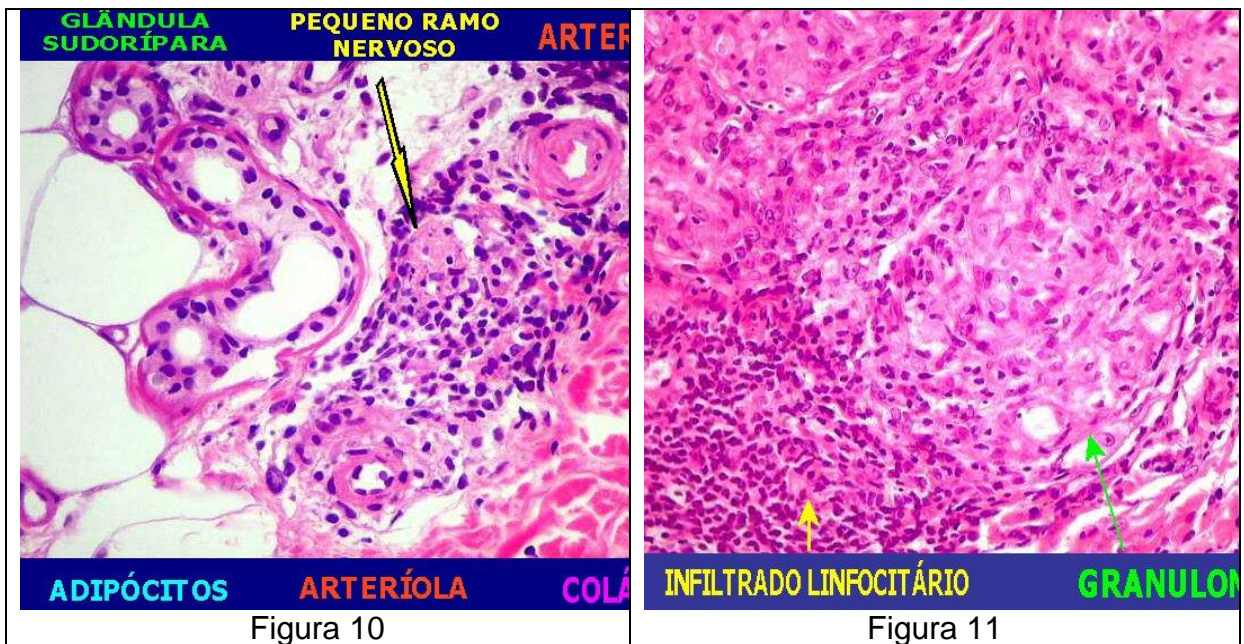


Figura 10: Hanseníase Indeterminada (Epiderme preservada. Na derme há focos de infiltrado inflamatório crônico inespecífico e linfomonocitário em torno de vasos, glândulas e filetes nervosos); Figura 11: Hanseníase Tuberculóide (Granuloma epitelióide constituídos de grande número de células epitelióides).

Fonte: Departamento de Anatomia Patológica Especial (2007)

A forma instável Borderline-tuberculóide (BT) apresenta uma zona livre de infiltração, rica em colágeno, que contém células epitelióides e uma quantidade reduzida de linfócitos comparada à forma tuberculóide e provável ausência de células de Langhans. A zona livre limita e separa, parcialmente ou completamente, o infiltrado inflamatório da epiderme. Na forma Borderline-borderline (BB) há um número bem reduzido de bacilos presentes nos histiócitos e o infiltrado é



visivelmente separado da epiderme por uma zona livre, sendo o infiltrado constituído de células epitelióides semelhantes a histiócitos. (WHO, 1989; OMS/OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002; PIMENTEL et al., 2003).

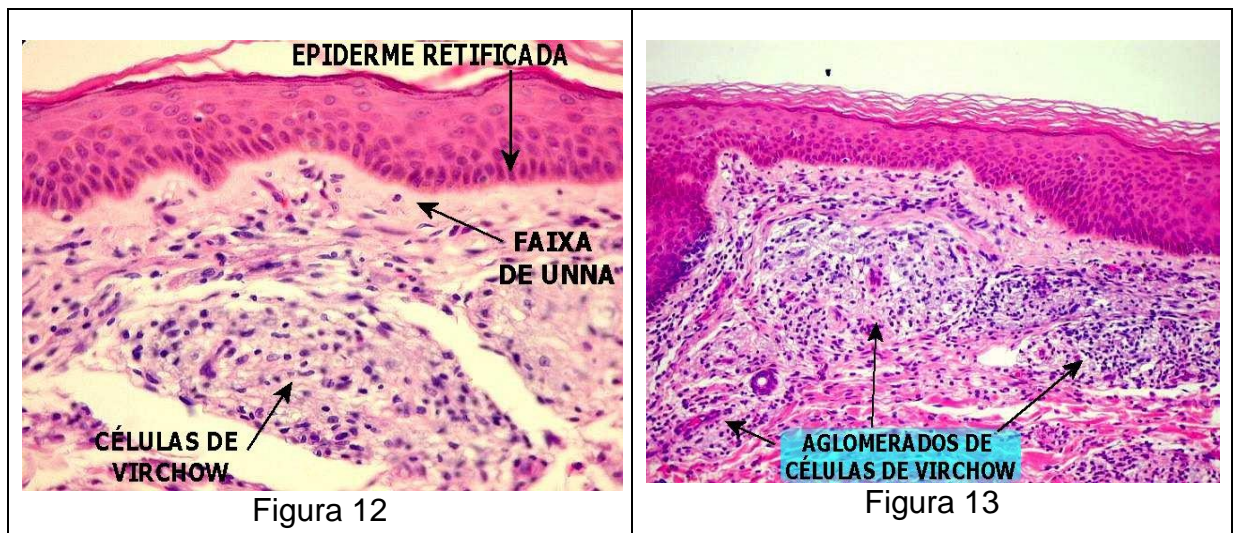


Figura 12: Hanseníase Dimorfa Virchowiana (Granuloma histiocitário com grande infiltrado de linfócitos e faixa clara subepidérmica); Figura 13: Hanseníase Virchowiana (Granuloma histiocitário com várias células gigantes e alguns linfócitos e plasmócitos difusamente espalhados, com faixa clara subepidérmica).

Fonte: Departamento de Anatomia Patológica Especial (2007)

A forma Borderline-lepromatosa (BL) apresenta reduzidos macrófagos vacuolizados com número elevado de bacilos fagocitados e dispersão linfocitária sem evidência de globias. Na forma Lepromatosa (LL) tem como característica marcante um grande volume de bacilos no infiltrado celular com macrófagos dispersos com ausência de linfócitos. (OMS/OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

#### 1.4. ETIOLOGIA

O *Mycobacterium leprae* é um parasita de crescimento lento com tempo de geração em média, de 12 a 21 dias, intracelular obrigatório,

predominantemente em macrófagos, aeróbio e com tropismo para a célula de Schwann, onde induz necrose caseosa; causa principal das deformidades características desta doença. Esta localização intracelular obrigatória no sistema fagocítico-mononuclear imprime característica de doença crônica à hanseníase. Apresenta reprodução por fissão binária, é álcool-ácido resistente, quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen e mantém-se viável, fora do organismo, por até 10 dias a 4°C, em fragmentos de biopsias e\ou suspensão. Em secreções nasais, podem sobreviver por até 7 dias a 20,6 °C e umidade de 43,7%, entretanto, o aumento da temperatura e da umidade leva a diminuição de sua viabilidade, os pacientes apresentam lesões hansênicas localizadas na pele, mucosas e nervos periféricos o que indica que esta bactéria tem preferências por locais com temperaturas menores que 37°C (NUNZI & LEIKER, 1981; MADEIRA, 2000).

O bacilo de Hansen, assim como em outras espécies de mycobactérias patogênicas, possui superfície externa caracterizada pela presença de uma grande quantidade de componentes lipídicos, os quais são provavelmente responsáveis pela, “zona elétron transparente”, e pelo aspecto espumoso do material visto no interior dos macrófagos de pacientes virchowianos. Entre eles, os mais importantes são o Ptiocerosol dimicocerosado (PDIM), quimicamente distinto dos encontrados nas outras espécies de mycobactérias; e o Glicolípídeo Fenólico I (PGL-I) que apresentam um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e aparentemente único para o *Mycobacterium leprae*. Estes lipídios podem ser encontrados nos tecidos de seres humanos e de tatus infectados, mesmo após a bactéria ter sido eliminada, indicando sua permanência por longos períodos. A especificidade da resposta humoral, durante o processo de infecção é devido à

porção terminal 3,6-di-O-metil glucose do PGL-1, que ainda não foi detectado em nenhuma outra molécula natural (NUNZI & LEIKER, 1981; BUHRER, 1998; MADEIRA, 2000; YAWALKAR, 2002).

### 1.5. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE

O hospedeiro expressa suas defesas ao *Mycobacterium leprae*, tomando como base dois sistemas de bloqueio, um específico (Imunidade Adaptativa) e outro inespecífico (Imunidade Inata). Porém a resposta imunológica específica tem base de ação celular e humoral (RAMBUKKANA, et al. 1998; SAMPAIO et al., 2002).

O *Mycobacterium leprae* utiliza como mecanismo de adesão à célula hospedeira as adesinas bacterianas e o conjunto dos antígenos mycobacterianos de superfície, como o PGL-1 e ML-LBP21 (*Mycobacterium leprae* – Laminin binding protein 21) e receptores da célula hospedeira, especialmente o  $\alpha$ -dístroglicano, que serve como receptor para o *Mycobacterium leprae*. Porém, de forma indireta pode sofrer absorção sobre a superfície bacteriana da célula original do hospedeiro (RAMBUKKANA, et al. 1998; SAMPAIO et al., 2002).

Na Hanseníase, os bacilos são fagocitados por células apresentadoras de antígeno que secretam IL-1 que ativa os linfócitos T. Paralelamente, os antígenos contidos no Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II (MHC, Major Hitocompatibility Complex) são reconhecidos pelos linfócitos T que sofrem proliferação clonal gerando células efetoras e de memória. A subpopulação TH1



secreta preferencialmente IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\gamma$ , citocinas que estimulam a resposta celular e as reações de hipersensibilidade. A subpopulação TH2 secreta predominantemente IL-4, IL-5 e IL-10 que promovem basicamente resposta humoral. Neste contexto, a resposta imune com predomínio do perfil de citocinas Th1 corresponde clinicamente às formas benignas da doença (T, BT) e resposta com predomínio de Th2 às formas malignas (BL, LL), ressaltando a instabilidade das formas boderlines ou dimorfas (VAN BEERS et al., 1996; ANTUNES et al., 2003; JANES et al., 2006).

Na forma virchowiana, há uma depressão seletiva de linfócitos T CD4+ do tipo Th1, produtores de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), importantes citocinas envolvidas na ativação da resposta imune celular, contra patógenos intracelulares. Por outro lado, nestes pacientes, observa-se uma exacerbação da resposta de linfócitos T CD4+ do tipo Th2 produtores de interleucinas 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5), que ativam a produção de anticorpos e ainda apresentam efeitos inibidores sobre a resposta Th1 (NOMELINI et al., 1998).

No desenvolvimento da resposta imune logo após a entrada da mycobactéria nos macrófagos, o próprio Mycobacterium induz a produção de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  pelos macrófagos infectados. De um lado, o TNF- $\alpha$  promove a ativação de macrófagos para a destruição intracelular do agente infeccioso e potencializa o efeito TH1, por outro lado TGF- $\beta$  desativa macrófagos, aumenta a proliferação bacilar e contrapõe os efeitos de TNF- $\alpha$ , com predomínio de resposta TH2. Na hanseníase é possível que haja dualidade e fatores outros que determinam a definição da predominância de resposta e conseqüentemente a forma clínica

(YAMAMURA et al., 1991).

O TNF- $\alpha$  tem sido considerado como molécula chave na complicada rede de interação entre leucócitos sanguíneos e células teciduais, sendo considerada uma potente citocina pró-inflamatória e imunoestimulatória, um fator importante mediador em uma ampla variedade de estados inflamatórios agudos e crônicos, dependendo da quantidade e do tempo de produção. Pacientes com ENL apresentam aumentados níveis de TNF- $\alpha$ , e IL-1 sugerindo que TNF- $\alpha$ , poderia ser um mediador chave na imunopatogenia do dano tecidual que ocorre no eritema nodoso (SAMPAIO et al, 1998; PENNA et al., 2005). O TGF- $\beta$  é uma citocina cujas ações são altamente pleiotrópicas, inibe o crescimento de alguns tipos celulares e estimula o crescimento de outros. Embora considerada em parte, um regulador negativo da imunidade, orchestra eventos vitais, para iniciação, progressão e resolução da resposta inflamatória imune mediada. Esses efeitos opostos são provavelmente controlados por produção e latência seletiva desta citocina (WAHL,1992).

A resposta imune da doença depende de dois fatores: da subpopulação de linfócitos T e de sua atividade macrófágica, podendo ter predominância do mecanismo de defesa ou disseminação da doença, que clinicamente apresenta-se na forma tuberculóide (TT) ou lepromatosa (LL). Um dos fatores importantes na diferenciação destas formas clínicas é a presença de citocinas como, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e os mediadores de oxidação como reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) que são componentes primordiais para debelar os bacilos fagocitados pelos macrófagos (FOSS, 1997;

GOULART et al., 2002).

Na resposta humoral, a eliminação do bacilo é ineficaz, o que pode ser avaliado pela detecção do anticorpo específico (Anti-PGL-1) para o glicolípido fenólico da parede do *M. leprae*, que não apresenta reação cruzada com outras mycobactérias. Altas concentrações de anticorpos no sangue periférico estão relacionadas à acentuada carga bacilar, encontrada nas formas borderline lepromatosa (BL) e lepromatosa (L), diferente dos pacientes tuberculóides que apresentaram títulos semelhantes aos controles sadios (FOSS & CALLERA, 1993; ABULAFIA & VIGNALE, 2001).

O glicolípido fenólico (PGL-1) é uma molécula que contém uma porção trissacarídica não encontrada em nenhuma outra mycobactéria e que, ligada ao fenol, parece ser um potente captador de radicais O<sub>2</sub>. Estudos demonstram títulos elevados de IgM anti-PGL1 por ocasião do diagnóstico e queda desses títulos após tratamento com poliquimioterapia. Os principais obstáculos em se obter grandes quantidades de moléculas de PGL-1 é a dificuldade de cultivo do *M. leprae*. A produção sintética do glicídeo terminal da molécula, conjugada a uma molécula carreadora resultou em compostos mono, di e trissacarídeos, que reagem com soro de doentes. A possibilidade de produção dos antígenos possibilitou estudos clínico-laboratoriais (VAN BEERS et al., 1996; BRASIL, 2003; CALADO et al., 2005).

A destruição ou a multiplicação do bacilo no interior dos macrófagos pode ser determinada por mecanismos imunológicos que envolvem a apresentação do antígeno (complexo MHC) e do antígeno de histocompatibilidade HLA, ambos geneticamente determinados. Na forma tuberculóide predomina o fenótipo HLA-DR2

e HLA-DR3, padrão de não suscetibilidade à doença. Na hanseníase virchowiana e dimorfo-virchowiana predominam o fenótipo HLA-DQ1, relacionado à suscetibilidade (FOSS, 1999).

O MHC no ser humano está localizado no braço curto do cromossomo 6, e, didaticamente, esses genes podem ser reunidos em 3 grupos, denominados genes de classe I, II e III. Os genes de classe I codificam as moléculas de histocompatibilidade HLA-A, B e C, os de classe II as moléculas HLA-DR, DQ e DP. Os genes de classe III, embora estejam incluídos dentro do MHC, não codificam moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, algumas delas fazendo parte do sistema imune outras não. Assim, as proteínas C4 e C2 da via clássica e o fator B da via alternativa do complemento, os fatores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ), a proteína do choque térmico (Hsp 70) e as enzimas 21-hidroxilase são moléculas incluídas na região de classe III (FERNANDES et al, 2003).

As moléculas de classe I estão constitutivamente expressas nas superfícies de todas as células nucleadas, sendo compostas por 2 cadeias diferentes (heterodímeros). A cadeia pesada  $\alpha$ , polimórfica, é codificada pelos locus HLA-A, -B, ou -C do MHC, situados no cromossomo 6, e a cadeia leve, a  $\beta$ 2-microglobulina, não polimórfica, é codificada por gene situado fora do MHC, no cromossomo 15. A cadeia pesada contém 3 domínios:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3, sendo que o grande polimorfismo dessas moléculas ocorre nos domínios  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2. Esses domínios são extracelulares e contêm cerca de 90 resíduos de aminoácidos cada. Os peptídeos que vão se ligar às moléculas de classe I são gerados no citosol, pela ação de algumas proteínas chamadas proteassomas (genes LPM 2 e 7, situados no MHC) e transportados ao retículo endoplasmático pelas proteínas TAP 1 e 2 (genes

também situados no MHC). Uma vez formado, o peptídeo com cerca de 8 a 12 aminoácidos se encaixa no sulco de ligação ao peptídeo da molécula HLA de classe I ainda no retículo endoplasmático e, então, a molécula HLA ligada ao peptídeo é transportada até a membrana da célula, sendo apresentada ao linfócito T CD8 (EREN & TRAVERS, 2000).

As moléculas HLA de classe II estão presentes constitutivamente apenas nas superfícies de alguns tipos celulares como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, coletivamente denominadas de células apresentadoras de antígenos. Essas moléculas também são heterodímeros formados por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$ , ambas codificadas por genes situados no MHC, ou seja, no cromossomo 6, contendo 2 domínios  $\alpha 1/ \alpha 2$  e  $\beta 1/\beta 2$ . Os domínios que apresentam maior polimorfismo são o  $\alpha 1$  e o  $\beta 1$  (cada domínio contém cerca de 90 resíduos de aminoácidos) para as moléculas HLA-DQ e DP. Em contraste, para as moléculas HLA-DR, o polimorfismo ocorre no domínio  $\beta 1$  (FERNANDES et al, 2002).

Os peptídeos apresentados pelas moléculas HLA de classe II têm cerca de 15 a 24 aminoácidos e são processados nos compartimentos endolisossomais, sendo que as moléculas HLA-DM (presentes somente no interior da célula) permitem que o peptídeo se una ao sulco de ligação ao peptídeo da molécula de classe II. As moléculas contendo os peptídeos tornam-se estáveis, sendo então transportadas até as superfícies celulares, facilitando, assim, a apresentação do peptídeo ao receptor do linfócito T CD4 (McDEVITT, 2000).

O padrão clínico da doença está associado aos genes ligados ao HLA,

pois há evidências, ainda não comprovadas, que sugerem que os indivíduos suscetíveis aos alelos HLA-DR2 e HLA-DR3, apresentam mais resistência à doença e desenvolvem com mais frequência hanseníase tuberculóide (HT), enquanto que os com HLA-DQ1 apresentam mais susceptibilidade à doença e desenvolvem hanseníase lepromatosa (HL) (HASTINGS & OPROMOLLA, 1994; TALHARI & NEVES, 1997; GOULART et al., 2002).

Durante os episódios reacionais, onde há um processo inflamatório agudo, os sinais e sintomas apresentados pelo paciente exacerbam-se, sabendo-se que isso significa mudanças súbitas na sua resposta imune aos fragmentos do bacilo. Ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos imunes regulatórios capazes de desencadear ou controlar tais reações. A reação tipo I, reação reversa, parece estar associada a aumento súbito da resposta imune mediada por células contra os antígenos do bacilo. É considerada reação de hipersensibilidade tardia e é associada a mudanças clínicas e histopatológicas em direção ao pólo Th1. Na reação tipo II, os mecanismos parecem ser mais complexos. Nos últimos anos, alguns estudos têm sugerido a contribuição da resposta celular durante o eritema nodoso da hanseníase (ENH) em desacordo com trabalhos anteriores que atribuíam significativa participação dos imunocomplexos (LAAL et al., 1985). No entanto, estudos in vitro confirmam a presença de TH1 (UETA et al, 1993).

Os surtos reacionais representam episódios inflamatórios que se intercalam no curso crônico da hanseníase. Devem ser prontamente diagnosticados e tratados. Os tipos de reação mais importantes são: a reação reversa ou reação do tipo 1 e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso da hanseníase (ENH). As reações

seguem-se a fatores desencadeantes, tais como: infecções intercorrentes, vacinação, gravidez e puerpério, medicamentos iodados, estresse físico e emocional. Os quadros reacionais, às vezes, antecedem o diagnóstico da hanseníase, surgem durante o tratamento ou após a alta (GOULART et al., 2002).

A reação do tipo 1 tende a surgir mais precocemente no tratamento, entre o 2º e o 6º meses, caracteristicamente na hanseníase dimorfa. É considerada reação mediada pela imunidade celular e representa melhora (up-grading) ou piora (down-grading). Clinicamente são indistinguíveis e se caracterizam por exacerbação das lesões pré-existentes, que se tornam edemaciadas, eritematosas, brilhantes, podendo chegar à ulceração. Os sintomas sistêmicos variam. Surgem lesões novas a distância e as neurites mostram-se freqüentes, podendo ser a única manifestação clínica. As neurites podem ser silenciosas, ou seja, o dano funcional do nervo se instala sem quadro clínico de dor e espessamento do nervo. Os nervos mais comprometidos são os ulnares e medianos nos membros superiores, fibular comum e tibial posterior nos membros inferiores e facial e grande auricular no segmento cefálico (TALHARI & NEVES, 1997; NERY et al, 1999).

A reação do tipo 2 ou eritema nodoso da hanseníase (ENH) nas formas virchowianas e dimorfas, em geral, após seis meses de tratamento. Trata-se de síndrome desencadeada por imunocomplexos, mas a imunidade celular possui importância em etapas iniciais do processo. Há aumento de citocinas séricas, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  sem, contudo, haver mudança definitiva da condição imunológica do paciente (FOSS, 1999; NERY et al, 1999). Na pele, a lesão típica é o eritema nodoso da hanseníase (ENH) que se caracteriza por lesões eritematosas, dolorosas,

de tamanhos variados incluindo pápulas e nódulos localizados em qualquer região da pele. Ainda na pele, descreveu-se o eritema nodoso necrotizante e o eritema polimorfo. Em alguns casos, o quadro reacional evolui com neurite, orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, mão e pé reacionais, linfadenite, proteinúria e dano hepático. Edema de membros inferiores, pré-tibialgia e febre acompanham esta reação. Às vezes, a febre alta e prolongada domina o quadro clínico. As reações do tipo 2 repetem-se e evoluem indefinidamente em surtos subentrantes (TALHARI & NEVES, 1997).

A destruição dos nervos na hanseníase se deve principalmente pela interferência bioquímica do bacilo com o metabolismo da célula hospedeira; destruição mecânica, devido ao intenso fluxo de células e fluidos e/ou deterioração imunológica. Quanto ao aspecto imunológico, temos o mediador químico TNF $\alpha$  como a principal citocina envolvida neste processo e foi detectada no soro de pacientes multibacilares (MB) com reação tipo II ou ENH e reação tipo I ou reação reversa (RR) e em pacientes paucibacilares (PB) com neurite isolada, entretanto como esperado, em índices mais baixos que no ENH (SAMPAIO et al., 2002).

Evidenciaram-se altos níveis de TNF- $\alpha$  em soro de pacientes com ENH, associados ou não a níveis elevados de IL-1, IL-6 e IL-8 (SARNO et al, 1991). A relação do quadro de ENH com TNF- $\alpha$  foi confirmada, quando se demonstrou o efeito da talidomida em inibir a produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares do sangue (PENNA et al., 2005).



O fator transformador de crescimento (TGF- transforming growth factor), foi assim chamado por sua capacidade de induzir células normais em cultura ao crescimento independente de ancoragem, que uma das propriedades de transformação celular. Como foram isolados do meio de cultura de células de um sarcoma, foram chamados inicialmente de fator de sarcoma. Mas tarde, verificou-se tratar-se de dois fatores distintos, que passaram a ser denominados TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . O TGF- $\alpha$  é produzido por diversas células embrionárias ou da placenta, enquanto que o TGF- $\beta$  é sintetizado por uma grande variedade de células (placentária, linfócitos T, endotélios e macrófagos) e pode tanto estimular como inibir o crescimento das células (BENJAMINI et al, 2002)

O TGF- $\beta$  pode ter diferentes papéis na hanseníase: mediando uma ação supressiva localmente associada com a presença de PGL-1, e induzir efeitos pró-inflamatórios, quando secretados sistematicamente por monócitos, desta forma atuando como uma citocina moduladora na reação ENH, associada com a resposta imune Th2 nas formas multibacilares da hanseníase (GOULART et al., 2002).

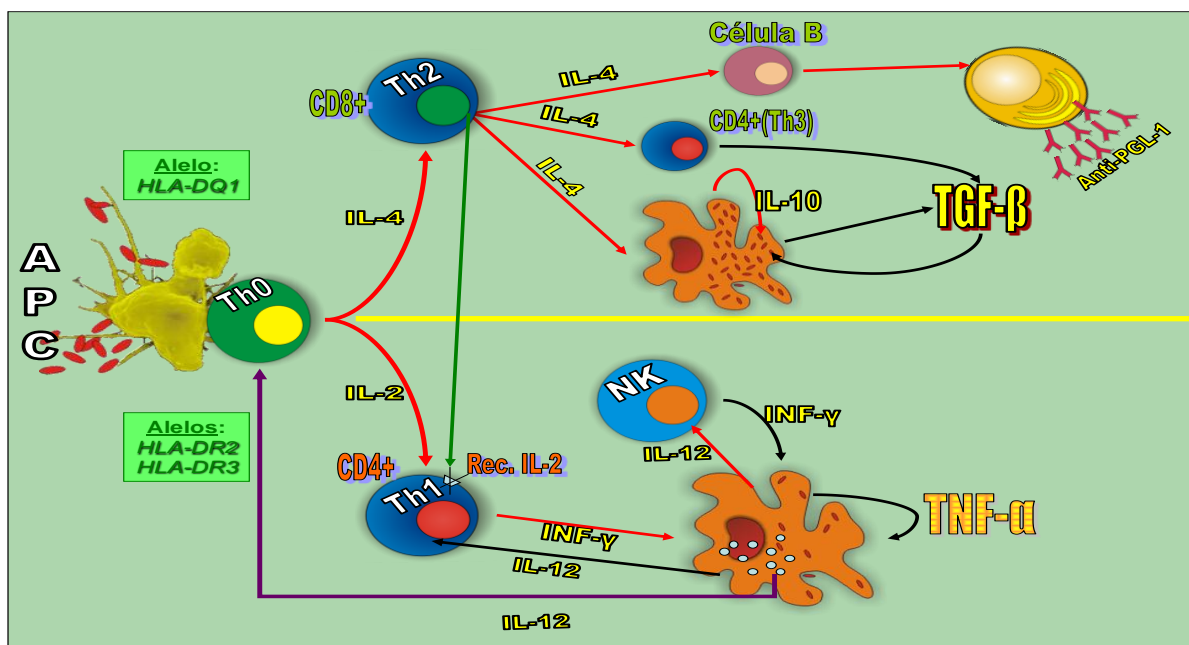


FIGURA 14: Representação diagramática da resposta imune da Hanseníase

## 1.6. APOPTOSE

### 1.6.1. APOPTOSE COMO FENÔMENO DE MORTE CELULAR

A apoptose tem como definição etimológica de origem grega, o prefixo *apo* significa fora, enquanto *ptose* indica cair. Este fenômeno celular condiz em uma programação de morte celular, através de um processo de fragmentação e posterior fagocitose de seus fragmentos por células vizinhas. Podemos encontrar a apoptose em eventos fisiológicos e patológicos, como: A destruição programada de células durante a embriogênese, deleção celular em populações de célula sem proliferação, Morte celulares em tumores, morte de neutrófilos durante a resposta inflamatória aguda, morte das células imunes (linfócitos B e T após a depleção de citocinas, bem como a deleção de células T auto-reativas), morte celular induzida por células T citotóxicas, lesão celular em certas doenças virais, entre outras (PERREIRA, 1998; CONTRAN et al, 2000; VENDITTI et al, 2001).

Podemos observar no processo apoptótico modificação celulares tanto no aspecto morfológico, quanto no aspecto bioquímico, como: retração celular devido à perda de água e acúmulo de proteínas desnaturadas; condensação da cromatina; clivagem de proteínas através de cisteínas-proteases denominadas caspases; entrecruzamento de proteínas por ativação das transglutaminases; reconhecimento fagocítico que se expressa pro intermédio fosfatidilserinas na superfície da membrana plasmática, permitindo um reconhecimento por macrófagos e células adjacentes para a fagocitose, sem liberação de componentes pró-

inflamatórios (PERREIRA, 1998; FABRIS, 1999; PAROLIN & REOSAN, 2001).

O mecanismo de execução se caracteriza por ter forma heterogenias de sinalização e regulação para convergência de cascata proteolítica. As proteases que deflagram e mediam este mecanismo são conhecidas como caspases, que podem ser divididas em iniciadoras e executoras, dependendo da ordem que são ativadas antes da morte celular, sendo responsáveis pelas alterações morfológicas características da apoptose. O TNF- $\alpha$  é um indutor do efeito citotóxico em algumas doenças, induzindo a ativação das cisteínas-proteases caspases-8 e caspases-3 (PERREIRA, 1998; VESCOVO et al, 2002; JANES et al., 2006).

As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica. Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalizar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores, enquanto outros como a caspase-3 são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (PATEL & GORES, 1998).

A regulação fisiológica da atividade da caspase 3 ocorre predominantemente ao nível de processamento da pró-enzima e maturação na cascata proteolítica, quando algumas caspases ativam seqüencialmente outras e eventualmente ativam a si mesmas por autoproteólises intramolecular. No modelo hierárquico, o iniciador protease, como caspase -8 ou -10, fica ativado por estímulo apoptótico, então ativa um amplificador protease como caspase-1, que voltam a

ativar a maquinaria protease, como caspase-3 ou -7. Outro importante aspecto da apoptose é em relação à família das proteínas de transmembrana, próprio de receptores de fator de necrose tumoral (TNFR) que atualmente inicia o sinal da cascata de transdução durante o efeito final da função. CD95 (fas) próprio desta família que ligado a CD95L (FasL) induz /ativa o programa de morte apoptótica (BISHT et al, 2005).

O processo é regulado por inúmeros fatores inibidores e ativadores. Entre os inibidores estão algumas proteínas da família Bcl-2 (bcl-2, bcl-xL, mcl-1, a1 e bcl-w) e da família IAP (*inhibitor of apoptosis protein*). Entre os ativadores estão o Fas, o DR4, o DR5, IFN- $\gamma$  e outras proteínas membros da família Bcl-2 (bad, bak, bax, harakiri e boK) (HALE et al., 1996). O sistema Fas-FasL é constituído pelo receptor Fas (APO-1 ou CD95) e seu ligante, FasL, membros da família do TNF- $\alpha$  (SUDA et al, 1993; POLAKI et al, 2001; WOOD et al, 2003).

A sinalização apoptótica viabiliza-se pela família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), destacando duas subfamílias o Fas e TNFR1, que possuem domínios de reconhecimento de morte citoplasmática. A sinalização da morte envolve o grupamento dos receptores por ligantes e ligações de receptores das proteínas adaptadoras do citoplasma através da interação entre domínio de morte encontrado tanto nos receptores, quanto nos adaptadores. Contudo, os domínios efetores de morte nas proteínas adaptadoras e caspases iniciadoras interagem, e a ativação autocatalítica deflagra a etapa de execução (CONTRAN et al, 2000; JAINU & DEVI, 2006; WONG & TSOKOS, 2006).

O FasL (ligante de Fas) é uma citocina que se liga com receptores específicos denominados Fas, e ativa um programa de morte nos linfócitos eliminando das células ativadas da resposta imune, desta forma, limita a resposta do hospedeiro. A apoptose via Fas-FasL é desencadeada pela interação entre Fas e FasL. Quando ela ocorre, os receptores formam agregados que, na forma de trímeros, ligam-se à proteína adaptadora FADD (Fas-associated death domain) presente no citoplasma. Ocorre, então, a ligação dessas moléculas à pró-caspase-8, resultando na formação de um complexo denominado DISC (Death Inducing Signaling Complex), que culmina na auto-clivagem e ativação da caspase-8. A caspase-8 pode, assim, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 efetora, o que resulta na apoptose celular. O TNFR quando ativado pelo TNF- $\alpha$  pode resultar em apoptose ao induzir associações de receptores com proteínas adaptadoras TRADD (proteínas adaptadoras do receptor do fator de necrose tumoral com um domínio de morte). (FAUBION & GORES, 1999; LEE & GOODMAN, 2006; WONG & TSOKOS, 2006).

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intra-celular. Paradoxalmente, a mitocôndria guarda no espaço intermembranoso substâncias letais, capazes de deflagrar o processo de morte celular, entre as quais figura o citocromo-c. Quando liberado da mitocôndria, o citocromo-c se associa a duas proteínas presentes no citosol — a apaf-1 e a pró-caspase-9 e na presença de ATP, ativa a caspase-9. A caspase-9, por sua vez, ativa as pró-caspases-3 e 7, que executam o processo de apoptose. A caspase-3 pode amplificar a cascata de

proteólise pela ativação da caspase-8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica Bcl-2 que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (PATEL & GORES, 1998; KAPLOWITZ, 2000; LEE & GOODMAN, 2006).

O receptor-Fas é expresso em uma variedade de células, incluindo células epiteliais, hematopoiéticas e linfócitos B e T ativados. O padrão de expressão tecidual do ligante Fas é mais restrito, sendo expresso nos linfócitos T maduros CD4+ e CD8+ e nas células "natural killer" ativadas. . A expressão simultânea de receptor-Fas e ligante-Fas em linfócitos maduros ativados podem representar o mecanismo de autolimitação da resposta imunológica. (PATEL & GORES, 1995)

O Linfócito T citotóxico faz o reconhecimento de antígenos na superfície de células infectadas, induzindo a apoptose através de perforinas, que são moléculas formadoras de poros transmembrana, e a liberação exocitótica de granzimas B dos linfócitos T citotóxicos nas células apresentadoras de antígenos. A granzima B tem capacidade de clivar proteínas nos resíduos de aspartato e de ativar uma variedade de caspases celulares. Contudo, as células T citotóxicas ativam o processo apoptótico, sem passar pelos eventos de sinalização e indução. (ARENDS & WYLLIE, 1991; PESSAYRE et al, 1999; BENJAMINI et al., 2002).

#### 1.6.2. APOPTOSE, SISTEMA IMUNE E DOENÇAS INFECCIOSAS.

Se por um lado a apoptose é um fenômeno que pode decorrer também da atividade de resposta imune contra a presença de um determinado agente infeccioso, por outro lado, esse fenômeno pode estar envolvido no próprio controle

dos mecanismos celulares efetores dessa resposta. Desta forma, a apoptose pode estar por um lado envolvida na destruição de células parasitadas e por outro lado na destruição de células imunocompetentes, nesta última se tornando um fenômeno de escape imune do patógeno. (ROJAS et al., 2002).

Apoptose de célula infectada tem emergido recentemente como um evento importante no relacionamento do hospedeiro-parasita. No caso de infecções bacterianas, a apoptose da célula de hospedeira infectada foi relatado com diversos patógenos incluindo *M.bovis* BCG, *M. avium* e *M. tuberculosis* em monócitos/macrófagos humanos (ROJAS et al., 2002). Evidências indicam que o *M. tuberculosis*, pode iniciar a sinalização celular e conduzir a apoptose de macrófagos de forma fagocítica-independente (ROJAS et al., 2002; KLINGER et al., 1997).

Na tuberculose, o bacilo é fagocitado por macrófagos alveolares logo após sua entrada nos pulmões e sua sobrevivência nestas células é fundamental para o estabelecimento da infecção. Neste contexto, a apoptose dos macrófagos infectados torna-se um importante mecanismo de defesa do hospedeiro para a contenção do *Mycobacterium tuberculosis* (BEHNIA et al, 2000), e a capacidade de inibir a apoptose caracterizam-se numa ferramenta de subversão do sistema imune pelo patógeno que possibilita sua persistência.

Klingler et al. (1997), relataram que macrófagos cultivados com *M. Tuberculosis* expressavam níveis normais das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bcl-xS, mas apresentam diminuição na expressão de Bcl-2 que previne a apoptose. Em adição, Sly et al. (2003), relatam que a sobrevivência do *M. tuberculosis* em

macrófagos alveolares está ligada ao aumento na expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1. Além disso, Mogga et al (2002), demonstraram *in situ* que macrófagos murinos infectados com *M. Tuberculosis* apresentam altos níveis de Bcl-2 e redução nos níveis de Bax, o que favorece a persistência do bacilo.

Ainda nesse sentido, Oddo et al. (1998), demonstraram que macrófagos infectados com *M. tuberculosis* apresentam redução nos níveis de Fas, apesar disso, são susceptíveis à apoptose induzida por Fas-L e TNF exógenos, e esta resulta em diminuição da viabilidade bacilar. Assim a inibição da expressão de Fas e conseqüentemente da apoptose poderia atuar como um mecanismo de escape do bacilo às defesas do hospedeiro.

Colaborando neste indício, Keane et al. (2000) observaram que cepas de *M. tuberculosis* com baixa virulência induziam mais apoptose em macrófagos alveolares infectados *in vitro* do que as cepas virulentas, embora estas últimas tivessem multiplicação mais rápida. Mais tarde, este mesmo grupo demonstrou que amostras virulentas de *M. tuberculosis* induziam *in vitro* diminuição na expressão de moléculas pró-apoptóticas, enquanto amostras não-virulentas promoviam a expressão de um perfil gênico que favorecia a apoptose, o que foi inibido pela adição de anticorpos anti-TNF à cultura (SPIRA et al, 2003).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a inibição da apoptose favorece a persistência do *M. tuberculosis* e que a capacidade de inibir ativamente este fenômeno é uma ferramenta importante para o sucesso da infecção, constituindo-se num mecanismo de virulência do patógeno.



Alternativamente, a indução da apoptose pode prejudicar ativamente a resposta imune do hospedeiro e assim contribuir para o sucesso da infecção. Badley et al. (1996), por exemplo, relataram que a infecção de macrófagos pelo HIV leva a um aumento na expressão do Fas-L que promove a apoptose de linfócitos T não-infectados que expressa o receptor Fas, o que contribui para o quadro de imunodeficiência. Deste modo, o significado da ocorrência de apoptose num processo infeccioso depende do momento e do tipo celular envolvido.

Na hanseníase, o significado da apoptose é ainda pouco entendido. O primeiro estudo sobre apoptose na hanseníase foi empreendido por Cree et al., em 1986. Foram vistos corpos apoptóticos dispersos nas lesões virchowianas e concentrados nas bordas das lesões tuberculóides, em áreas com predominância de células epitelióides, o que poderia estar relacionado com a resolução das lesões tuberculóides. Ampliando seus estudos, Cree et al. (1987) sugeriram que a apoptose poderia estar envolvida na renovação celular em granulomas hansênicos que apresentam alto turnover.

Em 1999, Niang et al., observaram aumento na taxa de apoptose espontânea em células mononucleares de sangue periférico de pacientes hansenianos pauci ou multibacilares, especialmente em linfócitos T CD8+ e linfócitos B e sugeriram que este poderia ser um mecanismo de eliminação das células infectadas. Este aumento da apoptose espontânea foi confirmado por Hernandez et al. (2003), que verificaram ainda que a adição de *M. leprae* às culturas promovia aumento na expressão de TNF e BAX e elevava a taxa de apoptose de maneira

dose-dependente em monócitos de pacientes virchowianos. Entretanto, os autores relataram que a eficiência do *M. leprae* em induzir apoptose foi menor do que a do *M. tuberculosis*.

Comparando lesões de pacientes multi e paucibacilares, Walsh et al. (2004) verificaram que a apoptose era mais freqüente em pacientes paucibacilares e sugeriram que a apoptose poderia atuar como um mecanismo de contenção da multiplicação bacilar. Tendo em vista que, ao contrário do *M. tuberculosis*, o *M. leprae* apresenta baixa variabilidade (MONOT et al., 2005), é possível que as diferenças observadas entre pacientes pauci e multibacilares sejam decorrentes de características próprias do indivíduo e estejam ligadas a polarização da resposta.

Mustafa et al. (2001) verificaram que em lesões de pacientes multibacilares, os macrófagos que apresentavam altos níveis de antígenos mycobacterianos também expressavam níveis significativos de Fas-L, enquanto nos pacientes PB a carga antigênica e a expressão do Fas-L eram reduzidas. Assim, em pacientes multibacilares, a expressão de Fas-L nos macrófagos proporcionaria um ambiente privilegiado para a manutenção do bacilo por induzir a apoptose de linfócitos durante a apresentação de antígenos, favorecendo a persistência da infecção.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunorreatividade para TGF- $\beta$  e caspase-3 nas formas clínicas virchowiana e tuberculóide do mal de hansen procurando correlacionar o padrão de imunomarcção com o controle tecidual da resposta imune do hospedeiro ao bacilo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar, por método imunohistoquímico, a ocorrência e a importância da citocina TGF- $\beta$  no processo de resposta imune *in situ* ao bacilo de hansen;
- Analisar, por método imunohistoquímico, o padrão de imunomarcção para apoptose através de anticorpo anti-caspase 3, correlacionando a intensidade de imunomarcção com as formas clínicas da doença;
- Correlacionar os achados imunohistoquímicos para apoptose com o possível papel desse fenômeno no controle da resposta imune do hospedeiro e correlacionar o papel do TGF- $\beta$  no controle e no processo de infecção pelo *M. leprae*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo retrospectivos a partir de amostras obtidas dos arquivos do Laboratório Patólogos e do Núcleo de Medicina Tropical de 30 pacientes hansenianos, quinze apresentando a forma virchowiana e quinze com o tipo tuberculóide. As idades foram compreendidas entre 25 e 57 anos, sendo 10 do sexo feminino e 20 do sexo masculino. A inclusão dos pacientes em um dos pólos da doença foi feita tomando-se por critério as informações clínicas do exame dermatológico confirmadas pelos achados histopatológicos característicos da lesão, sendo classificado em uma das formas de acordo com a presença de todos os critérios abaixo:

- Formas virchowianas: presença de macrófagos intensamente parasitados pelos bacilos (demonstrado através da coloração BAAR) estes, em geral, dispersos no citoplasma, mas freqüentemente agrupados formando globias, com presença de macrófagos que mostravam aspecto espumoso do citoplasma constituindo as chamadas células de Virchow. Associado a este quadro, um infiltrado esparso de linfócitos era observado nas lesões.

- Formas tuberculóides: reação tuberculóide clássica ao longo da derme, freqüentemente observada ao redor de nervos, constituindo granulomas imunogênicos não caseosos compostos por células epitelióides, algumas células

gigantes tipo Langhans e linfócitos em geral formando uma coroa ao redor desses agregados. Associa-se à ausência de bacilos ao exame de BAAR.

### 3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO E LOCAL DA PESQUISA

Para execução dos métodos abaixo descritos, utilizaram-se tecidos de pacientes com hanseníase e de indivíduos sem a doença. Os pacientes somente foram envolvidos neste estudo após serem informados sobre os objetivos do trabalho e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Todo material biológico foi colhido com equipamentos descartáveis e os examinadores receberam orientação adequada no manejo dos pacientes.

Os pacientes com hanseníase foram oriundos de Unidades Básicas de Saúde de Belém, de municípios próximos e de ambulatórios médicos do Núcleo de Medicina Tropical da UFPa. Todos os pacientes foram diagnosticados e classificados de acordo com as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS): hipopigmentação ou lesão na pele com perda de sensação tátil e dolorosa; envolvimento de nervos periféricos (observado pelo seu espessamento após palpação dos nervos cubital, poplíteo, e outros); presença na linfa de bacilos álcool – ácidos – resistentes (LEVIS et al, 1986).

### 3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Diagnóstico confirmado de hanseníase segundo os critérios do Ministério da Saúde E confirmação histopatológica.
- Aceitação em participar do estudo após leitura do termo de consentimento livre e esclarecido.

### 3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Menores de idade e gestantes.
- Recusa em participar do projeto.

### 3.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As secções histológicas de 5  $\mu$ m foram obtidas por microtomia e montadas em lâminas previamente silanizadas sendo posteriormente coradas pelo método de hematoxilina-eosina e histoquímica para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Após coloração, os cortes foram desidratados em material com concentrações crescentes de álcool e xilol, sendo posteriormente montadas em meio apropriado (entellan-MERCK). Após montagem os cortes foram analisados em microscopia de luz sendo classificados de acordo com o aspecto histopatológico das lesões.

### 3.6. COLORAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica é um método histológico para a determinação de proteínas específicas, mediante reação de antígeno-anticorpo marcados. Os anticorpos podem estar ligados a enzimas, à fluorescência, entre outros. Os métodos imunohistoquímicos baseiam-se na utilização de anticorpos específicos, marcados mediante uma reação química com uma substância que se torna visível, sem afetar a capacidade do anticorpo para formar um complexo com o antígeno.

Foi utilizado o método imuno-histoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês Streptavidin-Biotin Peroxidase) (HSU et al., 1981) com anticorpos monoclonais anti-caspase 3 (marcador de apoptose) e anti-TGF- $\beta$ . O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada, e em seguida os preparados foram novamente lavados em água corrente e água destilada por 5 minutos cada, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4.

A exposição antigênica, quando necessária, foi realizada por incubação em panela a vapor (Steam Cuisine 700 Hi Speed – T-FAL) com tampão Target Retrieval Solution 10x concentrado (Dako - cód. S1699) durante 20 minutos após o aquecimento do tampão a temperatura de 85°C a 90°C ou ainda por digestão enzimática utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA - cód. T-8253). Os preparados foram novamente lavados em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4 por em média 5 minutos cada.

Foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a incubação dos preparados com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V (Serva cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “overnight” a 4°C.

Após duas lavagens com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada, foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra diluído 1:500 em PBS pH 7,4, durante 30 minutos a 37°C ou ainda o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de cabra produzido em coelho diluído 1:500 em PBS pH 7,4, para os anticorpos primários produzidos em cabra. Os preparados foram novamente lavados em tampão PBS pH 7,4 e incubados com o complexo SABC diluído 1:500 em PBS pH 7,4 durante 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em tampão PBS pH 7,4, a reação será revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor será controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharão cada reação. Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount.

A quantificação dos eventos positivos foi feita pela análise quantitativa em cada 5 campos de grande aumento na área de lesão onde se fez a contagem das células em apoptose imunomarcadas pelo anticorpo específico. Para análise da expressão de TGF- $\beta$ , utilizou-se a análise semiquantitativa, com escala que variava



de 0 a 4, de acordo com a ausência e presença de imunorreatividade de intensidade discreta, moderada, intensa e muito intensa respectivamente.

### 3.7. ANÁLISE QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o aplicativo BioEstat 3.0 (AYRES et al., 2005), sendo que os resultados dos métodos de diagnósticos foram analisados de forma descritiva para avaliar o grau de dependência entre as variáveis utilizadas – se o teste correlação linear de Pearson. O limite de significância estatística adotado neste trabalho foi menor ou igual a 0,05.

### 3.8. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo constitui-se de um sub-projeto do projeto denominado “Avaliação in situ da resposta imunológica celular, expressão de citocinas e marcadores de lesão neural em pacientes hansenianos nas diversas formas clínicas e em quadros reacionais”, que foi submetido à comissão de ética em pesquisa em seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical em conformidade com a resolução 196 do CONEP.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTATÍSTICA DESCRITIVA

**Tabela 2:** ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA VARIÁVEL TGF- $\beta$ 

	Tuberculóide	Virchowiana
Tamanho da amostra	13	12
Mínimo	176	397
Máximo	483	596
Amplitude Total	307	199
Mediana	340	536
Primeiro Quartil (25%)	285	461,75
Terceiro Quartil	428	596
Média aritmética	339	519,2
Desvio Padrão	99,4	68,2
Coeficiente de variância	29,34%	13,14%

A forma Clínica Tuberculóide no quadro acima apresenta, média de 339,0 com desvio padrão de 99,4; o menor valor foi de 176 e o maior de 483, gerando uma amplitude de 307; a mediana indica que 50% dos valores se encontram abaixo de 340 e 50% acima, o primeiro quartil indica que 25% dos valores se encontram abaixo de 285 e 75% acima, o terceiro quartil indica que 75% dos valores se encontram abaixo de 428 e 25% acima, o Coeficiente de Variação de 29,34% indica a que há uma média variabilidade nos dados.

A forma Clínica Virchowiana no quadro acima apresenta, média de 519,2 com desvio padrão de 68,2; o menor valor foi de 397 e o maior de 596, gerando uma amplitude de 199; a mediana indica que 50% dos valores se encontram abaixo de 536,5 e 50% acima, o primeiro quartil indica que 25% dos valores se encontram abaixo de 461,75 e 75% acima, o terceiro quartil indica que 75% dos valores se encontram abaixo de 569,0 e 25% acima, o Coeficiente de Variação de 13,14% indica a que há uma baixa variabilidade nos dados.

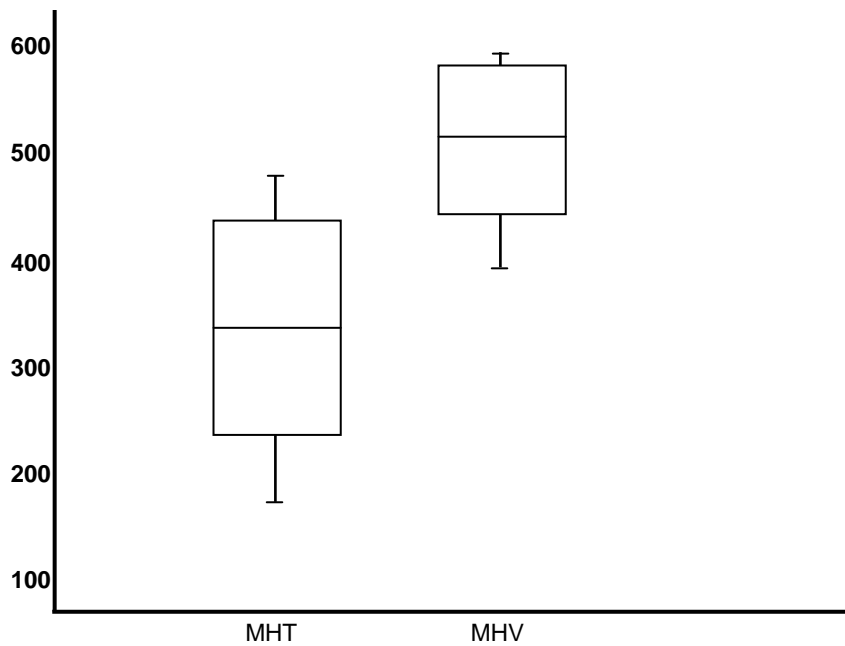


Figura 15– TGF- $\beta$  nas formas polares da hanseníase.

A figura acima indica não haver a presença de “out-liers” valores extremos nos dados, e a forma das caixas dão à indicação de normalidade nos dados, a variável MHT está mais heterogênea que a MHV, dada à forma da caixa, um pouco maior, e também, o seu prolongamento é maior, como a MHT está na parte de baixo do gráfico, seus valores são menores que de MHV.

**Tabela 3: ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA VARIÁVEL CASPASE-3**

	Tuberculóide	Virchowiana
Tamanho da amostra	13	12
Mínimo	3	5
Máximo	9	26
Amplitude Total	6	21
Mediana	7	14,5
Primeiro Quartil (25%)	5	11
Terceiro Quartil	8	16,75
Média aritmética	6,3	14
Desvio Padrão	1,8	6,1
Coeficiente de variância	28,5%	43,82%

A forma Clínica Tuberculóide no quadro acima apresenta, média de 6,3 com desvio padrão de 1,8; o menor valor foi de 3,0 e o maior de 9,0, gerando uma amplitude de 6,0; a mediana indica que 50% dos valores se encontram abaixo de 7,0 e 50% acima, o primeiro quartil indica que 25% dos valores se encontram abaixo de 5 e 75% acima, o terceiro quartil indica que 75% dos valores se encontram abaixo de 8,0 e 25% acima, o Coeficiente de Variação de 28,50% indica a que há uma alta variabilidade nos dados.

A forma Clínica Virchowiana no quadro acima apresenta, média de 14,0 com desvio padrão de 6,1; o menor valor foi de 5,0 e o maior de 26,0 gerando uma amplitude de 21,0; a mediana indica que 50% dos valores se encontram abaixo de 14,5 e 50% acima, o primeiro quartil indica que 25% dos valores se encontram abaixo de 11,0 e 75% acima, o terceiro quartil indica que 75% dos valores se encontram abaixo de 16,75 e 25% acima, o Coeficiente de Variação de 43,82% indica a que há uma alta variabilidade nos dados.

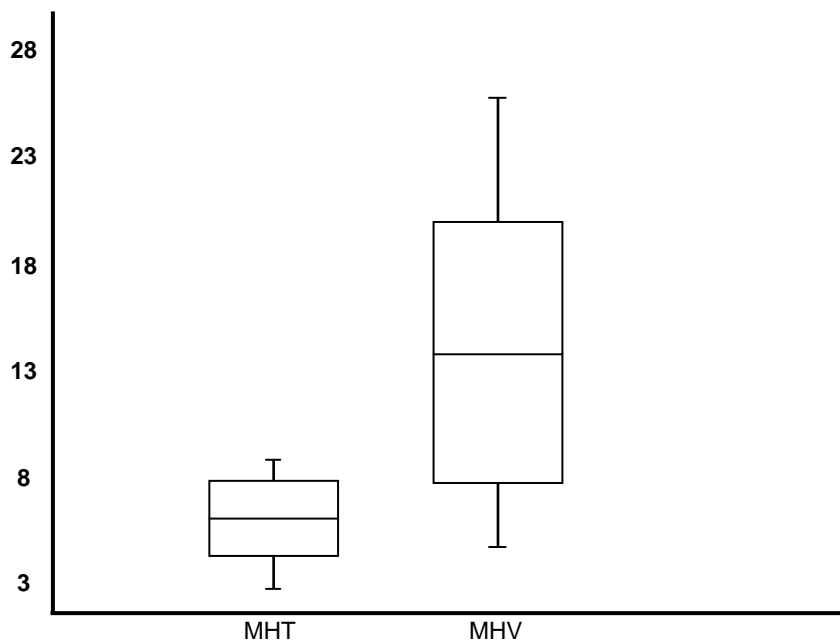


Figura 16 – Caspase-3 nas formas polares da hanseníase.

A figura acima mostra não haver a presença de “out-liers” valores extremos nos dados e a forma das caixas dão à indicação de normalidade nos dados. A variável MHT está mais homogênea que MHV dado o tamanho da caixa e dos seus respectivos prolongamentos, e também seus valores são menores devido à posição no gráfico.

#### 4.2. TESTE DE CORRELAÇÃO

A Correlação serve para medir o grau de dependência entre duas variáveis, ou seja, medir o quanto respostas de um grupo influenciam nas respostas do outro grupo ou se não há nenhum tipo de correlação entre ambos, a correlação é um valor que se encontra dentro de intervalo  $-1 \leq r \leq +1$ , resultados próximos de +1 indicam correlação positiva, próximos de -1 negativa, na correlação positiva há uma relação direta entre as variáveis, na negativa a relação é indireta, valores próximos

de 0 (zero), indicam ausência de correlação, há um valor associado a cada correlação que é o p-valor, que serve pra indicar se a correlação é significativa ou não, para ser significativa, a correlação tem que ter p-valor  $\leq 0,05$ ; dado o exposto será feito o teste de Correlação entre as variáveis: Caspase 3 e TGF- $\beta$  na forma Virchowiana e Tuberculóide, para tal foram elaboradas hipóteses ao nível  $\alpha=0,05$ :

PARA A FORMA VIRCHOWIANA:

H0: A correlação entre Caspase-3 e TGF – B na forma Virchowiana não é significativa;

H1: A correlação entre Caspase-3 e TGF – B na forma Virchowiana é significativa.

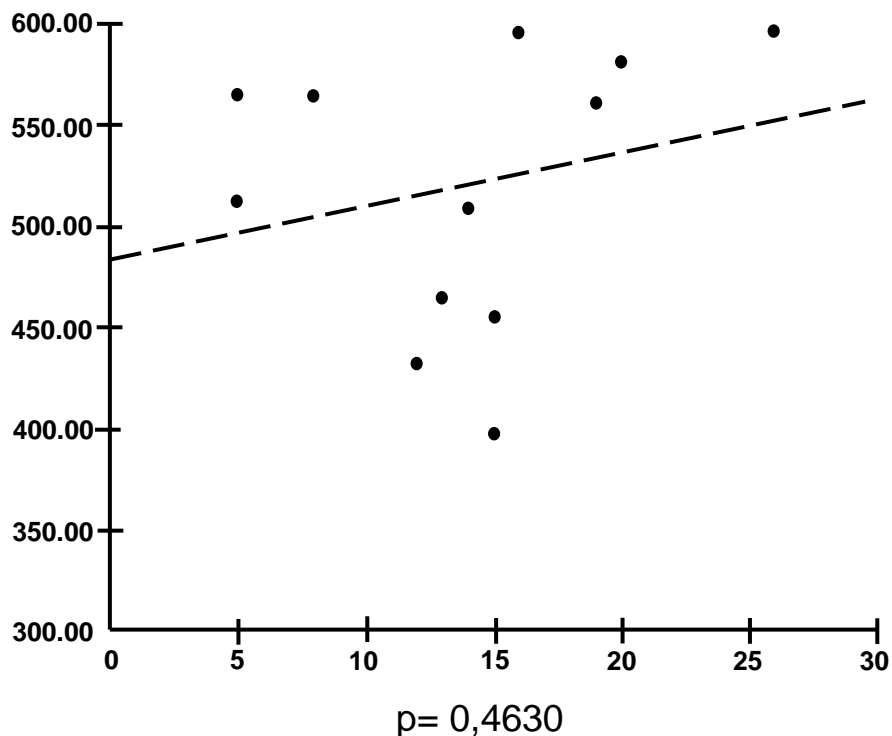


Figura 17 – Caspase-3 e TGF- $\beta$  na forma virchowiana da hansenfase.

Há evidências estatísticas suficientes para a não rejeição da hipótese de nulidade ao nível  $\alpha = 0,05$ ; dado  $p = 0,4630$ ; considerado não significativo, ou

seja, a correlação entre Caspase 3 e TGF- $\beta$  na forma Virchowiana não é significativa.

PARA A FORMA TUBERCULÓIDE:

H0: A correlação entre Caspase-3 e TGF- $\beta$  na forma Tuberculóide não é significativa;

H1: A correlação entre Caspase-3 e TGF- $\beta$  na forma Tuberculóide é significativa.

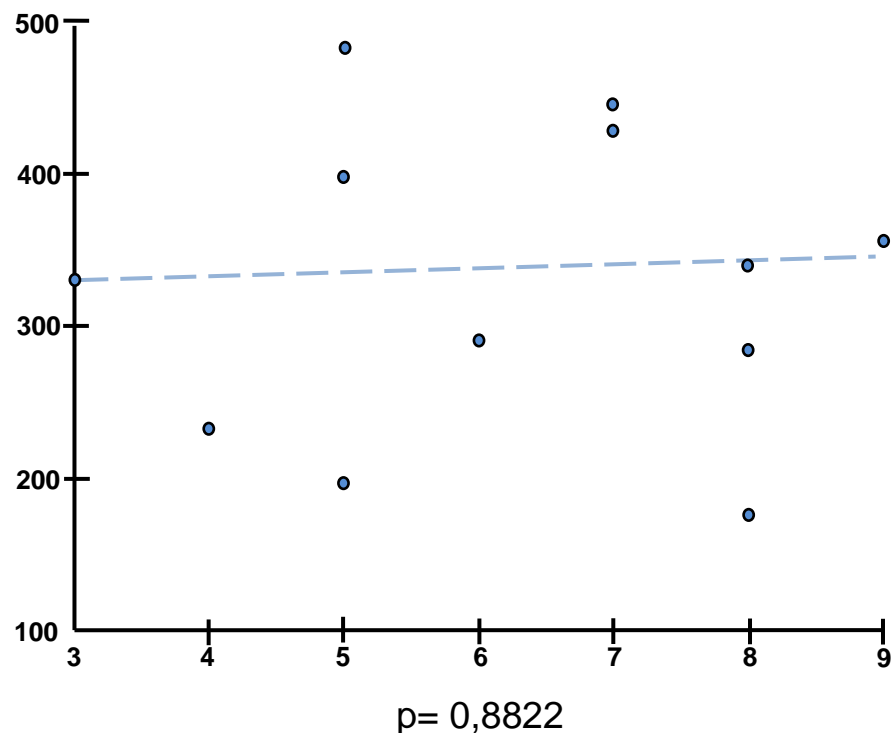


Figura 18 – Caspase-3 e TGF- $\beta$  na forma tuberculóide da hanseníase.

Há evidências estatísticas suficientes para a não rejeição da hipótese de nulidade ao nível  $\alpha=0,05$ ; dado  $p = 0,8822$ ; considerado não significativo, ou seja, a correlação entre Caspase-3 e TGF- $\beta$  na forma Tuberculóide não é significativa.





## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem sido cada vez maior a compreensão de que o organismo humano responde de modo muito semelhante a insultos de diversas naturezas (traumática, infecciosa e não infecciosa), por meio da liberação de uma cascata de mediadores inflamatórios, que irão determinar resposta proporcional à magnitude da agressão (BRUN-BUISSON, 2000). Em relação às doenças infecciosas, o padrão de resposta imunológica é de suma importância para a compreensão de como os diversos agentes etiológicos dessa natureza, atuando sobre um determinado hospedeiro, contribuem para o surgimento dos sinais e sintomas e suas diversas nuances de expressão clínico-patológica. (HERNANDEZ et al, 2003).

Devido à hanseníase caracterizar-se por ser uma doença infecciosa cuja resposta imunológica tecidual contribui para a apresentação das formas clínicas, mediadores inflamatórios relacionados a relações imunológicas no seu processo patogênico estão presentes na evolução deste processo infeccioso e possui um papel importante na sinalização do pólo hansênico. A gênese da expressão clínica das diversas formas de hanseníase se correlacionam intimamente com o padrão de resposta imune tecidual do hospedeiro, que pode variar dentro de um espectro que vai do pólo lepromatoso ao pólo tuberculóide da doença. No pólo lepromatoso a expressão de citocinas eminentemente imunossupressoras culmina com a gênese de um quadro clínico-patológico que guarda íntima relação com os achados de lesões constituídas por histiócitos vacuolados repletos de bacilos, em virtude da incapacidade desses de eliminar o agente infeccioso específico. Dentre

essas citocinas podemos citar a IL4, IL10 e o TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$ , apesar de não constituir classicamente numa citocina de perfil TH2, tem participação nesse processo por apresentar duas características importantes na interação entre hospedeiro e agente infeccioso, que são, a saber, seu efeito imunossupressor sobre macrófagos e linfócitos TCD4+ e sua capacidade de induzir apoptose. (ANTUNES et al., 2003)

São muitos e diversificados os processos pelos quais os diversos agentes infecciosos interagem com as células hospedeiras para induzir lesão. Não raro esses agentes desencadeiam um processo que culmina com o controle negativo da resposta imunológica com o intuito de escapar da ação lesiva dos componentes do sistema imune. Dentre esses mecanismos, o processo de apoptose é um evento que comumente é usado por agentes infecciosos de natureza diversa para o controle negativo dessa resposta, através da indução de morte celular em células inflamatórias. (BISHT et al., 2005)

Nas amostras colhidas observou-se que as médias de TGF- $\beta$  apresentaram diferenças significantes quando comparadas nos grupos deste estudo, podendo-se observar na forma Tuberculóide uma média de 339 com desvio padrão de 99,4 células positivas, enquanto a forma Virchowiana apresentou uma média 519,2 com desvio padrão de 68,2 células positivas, desta forma evidenciamos um predomínio de TGF- $\beta$  na forma polar Virchowiana, resultados similares ao do trabalho de Abulafia & Vignale 2001, que demonstraram que grandes quantidades de bacilos (*Mycobacterium leprae*) intracelulares em macrófagos infectados induzem a formação de grandes quantidades de IL-4 na forma virchowiana e

conseqüentemente ativam as células Th3, que por sua vez produzem grandes quantidades de TGF- $\beta$  (ABULAFIA & VIGNALE, 2001)

Outros estudos mencionam a atividade do TGF- $\beta$  nas formas polares da hanseníase, como o estudo realizado por Foss (1997), que relaciona amostras de sangue periférico ou sobrenadantes de culturas com avaliações imunostóquímicas, e que mostraram que as formas altamente bacilíferas (dimorfa-virchowiana e virchowiana) cursam com elevação acentuada da citocina TGF- $\beta$  e células CD8+ no infiltrado inflamatório. Nas formas de resistência (tuberculóide e dimorfa tuberculóide), entretanto, foi observado número elevado de células CD4+ e ausência de TGF- $\beta$ . Além disso, em outros trabalhos, foi observado que, em virchowianos e dimorfos virchowianos (bacilíferos), a produção de intermediários do nitrogênio está reduzida ou ausente, o que pode estar relacionado com a presença do TGF- $\beta$  no infiltrado inflamatório da lesão cutânea. (GOULART, 1995)

Este fato pode ser explicado devido um papel importante do TGF- $\beta$  na inibição da resposta das células T, suprimindo tanto o IFN- $\gamma$ , quanto a IL-2, concomitante a este efeito inibe a habilidade lítica dos macrófagos, suprimindo a produção dos intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, conduzindo desta forma a progressão da infecção. Vários estudos evidenciaram que macrófagos encontrados em lesões de pele de indivíduo com hanseníase virchowiana produzem TGF- $\beta$  em maior quantidade, quando comparados a macrófagos de lesões de pele de indivíduos com hanseníase tuberculóide. (GOULART et al, 2000).

Após verificar os dados de forma descritiva realizaram-se comparações entre as variáveis nas duas formas polares, ou seja, foi comparado os resultados obtidos da caspase-3 como o TGF- $\beta$ , tanto na forma virchowiana, quanto na forma tuberculóide, utilizando o coeficiente linear de Pearson.

O primeiro gráfico demonstra, uma correlação significativa ( $p= 0,4630$ ) e direta entre a caspase-3 e TGF- $\beta$ , evidenciando o crescimento linear entre as duas variáveis, estes resultados tiveram concordância com Sales 2005, que afirma a participação do TGF- $\beta$  e de outros mediadores na indução da morte celular programada, ressaltando que diversos outros trabalhos evidenciam o desenvolvimento do processo apoptótico em culturas de monociticos humanos em resposta a infecção por mycobactérias.

Alguns trabalhos comparam o processo apoptótico na hanseníase virchowiana e tuberculóide e evidenciaram escassez de apoptose nas formas virchowianas quando comparada às formas tuberculóides, devido aquela possuir maiores taxas de produção de TGF- $\beta$  (AJITH et al, 2005)

Outros autores, como Brown et al (1999) e Schiffer et al (2001), descrevem a relação intrínseca entre o TGF- $\beta$  e a caspase -3 no processo de morte celular programada, relatando que, o TGF- $\beta$  é um forte indutor de apoptose que se liga ao processo de ativação de quinases e clivagem da caspase-3, tendo assim um efeito ampliador desse tipo de morte celular..

A atividade imunossupressora do TGF- $\beta$  é demonstrada em diferentes modelos de doenças infecciosas (REED, 1999 & WANG et al, 2005). Sua habilidade de induzir células imunes ao processo apoptótico, resulta na inibição da resposta celular, com isso o TGF- $\beta$  é um marcador determinante de processos crônicos e agudos de doenças infecciosas como a hanseníase, hepatite crônica, febre amarela entre outras (WEISS et al, 1994 & Quaresma, 2006).

O segundo gráfico descreve uma correlação não significativa ( $p=0,8822$ ) entre a caspase-3 e o TGF- $\beta$  na forma tuberculóide evidenciando uma dissociação entre as variáveis, porém alguns estudos, descrevem que o efeito sinérgico da ação do TGF- $\beta$  com efeito apoptótico, dependem de alguns fatores, como: o tipo de célula e os fatores experimentais. Em um estudo feito com o objetivo de identificar se o TGF- $\beta$  pode impedir a apoptose neural e interromper a ativação da caspase-3 em culturas hipocámpais de murinos tratados previamente com Staurosporine, que é um antibiótico que tem como principal função inibir as proteínas quinases através da ligação entre as quinases com o ATP, os resultados evidenciaram que o TGF- $\beta$  pode inibir eficientemente a ativação da caspase-3, protegendo deste modo os neurônios hipocámpais dos efeitos da apoptose (ZHU et al, 2001 & RÜEGG, et al, 1989). Entretanto, no presente estudo não se é capaz de afirmar que, se por um lado a apoptose induzida pelo TGF- $\beta$  inibe a resposta imunológica in situ pela morte de linfócitos, por outro não se pode afirmar que tenha um efeito protetor sobre as terminações nervosas comumente comprometidas no processo hanseniano. Outros estudos são necessários para se caracterizar de maneira sistemática a ação do TGF- $\beta$  na patogênese da infecção pelo *M. leprae*.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram através de métodos imunohistoquímicos que o TGF- $\beta$ , apresenta-se em maior concentração na forma virchowiana do que na forma tuberculóide.

A investigação do imunomarcador de apoptose, caspase-3, através de testes imunohistoquímicos, apresentou-se em maior quantidade na forma virchowiana do que na forma tuberculóide

A análise comparativa da citocina TGF- $\beta$  e o imunomarcador de apoptose, caspase-3, apresentaram resultados diferentes, nas duas formas polares da hanseníase. Na forma tuberculóide, não mostrou resultados estatisticamente significativo ( $p = 0,8822$ ) não evidenciando correlação entre os dados, porém na forma virchowiana houve uma correlação estatisticamente significativa ( $p = 0,4630$ ) evidenciando que o TGF- $\beta$  e a caspase-3 aumentam gradativamente e simultaneamente nesta forma polar.

Através dos dados obtidos pode-se concluir que o TGF-B tem um papel preponderante no controle da resposta imunológica ao bacilo de hansen, seja inibindo a atividade de macrófagos, a diferenciação de linfócitos TCD4+ ou induzindo apoptose de células imunológicas.

## 7. REFERÊNCIAS

ABULAFIA, J.; VIGNALE, R.A. **Leprosy: accessory immune system as effectors of infectious, metabolic and immunologic reactions.** *Internacional Journal of Dermatology.* v. 40. p. 673-687. 2001.

AJITH, C.; GUPTA, S.; RADOTRA, B.D.; ARORA, S.K.; KUMAR, B.; DOGRA, S.; KAUR, I. **Estudo da apoptose em lesões cutâneas de hanseníase em relação ao tratamento de lepra** reacional, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases.* v. 73. n° 4. p. 269-276. 2005.

ANTUNES, S.L.G.; LIANG, Y.; NERI, J.A.C.; SARNO, E.N.; HAAK-FRENDSCHO, M.; JOHANSSON, O. **Mast cell subsets and neuropeptides in leprosy reactions.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* v. 61. n° 2-A. p. 208-219. 2003.

ARENDS, M.J.; WYLLIE, A.H. **Apoptosis: mechanisms and roles in pathology.** *International journal of experimental pathology.* v. 32. p. 223-254. 1991.

AYERES, M.; AYRES, M.J.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Bioestat 3.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq. 2003.

BADLEY, A.d.; MCELHINNY, J.A.; LEIBSON, P.J.; LYNCH, D.H.; ALDERSON, M.R.; PAYA, C.V. **Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency**

**virus in human macrophages mediates papoptosis of uninfected T lymphocytes.** Journal of Virology. v. 70. p. 199-206. 1996.

BEHNIA, M.; ROBERTSON, K.A.; MARTIN, W.J. **lung Infections: Role of Apoptosis in Host Defense and Pathogenesis of Disease.** Chest. v. 117. p. 1771-1777. 2000.

BEIGUELMAN, B. **Genetics and leprosy.** Ciências & Saúde Coletiva. v. 7. nº 1. p.117-128. 2002.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia.** ed 4º, Guanabara, Rio de Janeiro. 2002.

BISHT, V.; CHATTREE, V.; KHANNA, N.; RAO, D.N. **Mycobacterial formulation in liposomes showed decreased expression of CD95/CD95L and caspase activity in T cells of leprosy patients.** Current applied physics. v. 5. p. 189-193. 2005.

BRASIL, M.T.L.R.F.; OLIVEIRA, L.R., RÍMOLI, N.S.; CAVALLARI FILHO, S.; GONÇALVES, O.S.; LESSA, Z.L., ROTTA, O. **Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento.** Revista brasileira de epidemiologia. v. 6. nº 3. 2003.

BROWN, T.L.; PATIL, S.; CIANCI, C.D.;MORROW, J.S.; HOWE, P.H. **Transforming Growth Factor  $\beta$  induces Caspase 3-independent Cleavage of all-spectrin ( $\alpha$ -**



**Fodrin) Coincident with Apoptosis.** The journal of Biological Chemistry. v .274. n° 33. p. 23256-23262. 1999.

BRUN-BUISSON, C. **The epidemiology of the systemic inflammatory response.** Intensive Care Med. v. 26. n° 1. p. 64-74. 2000.

BUHRER, S. A. **Simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*.** Tese (Doutorado em Imunologia). Departamento de Pesquisa Biomédica. Royal Tropical Institute. Amsterdam. p. 123. 1998.

CALADO, K.L.S.; VIEIRA, A.G.; DURÃES, S.; SÉKULA, S.B.; OLIVEIRA, M.L.W.D.R. **Positividade sorológica antiPGL-1 em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 80. 2005.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional.** ed. 6ª. Guanabara. Rio de Janeiro. 2000.

CREE, I.A.; GARDINER, C.A.; BECK, J.S.; MEHTA, J. **Studies of cell death (apoptosis) and cell division in leprosy granulomas.** International Journal of Leprosy. v. 54. n° 4. p. 607-613. 1986.

CREE, I.A.; NURBHAI, S.; MILNE, G.; BECK, J.S. **Cell death in granulomata: the role of apoptosis.** Journal of Clinical Pathology. v. 40. p. 1314-1319. 1987.

CUNHA, A.Z.S. **Leprosy: evolution aspects of its diagnosis, treatment and control.** *Ciência & Saúde Coletiva*. v. 7. n° 2. p. 235-242. 2002.

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA ESPECIAL. **Faculdade de Ciências Médicas.** Campinas. Disponível em: <<http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/indexalfa.html#H>,> Acesso em: 25 de janeiro de 2007.

EREN, E.; TRAVERS, P. **The structure of the major histocompatibility complex and its molecular interactions.** In: LECHLER, R.; WARRENS, A. *HLA in Health and Disease*. San Diego: Academic Press. ed. 2ª. p. 23-33. 2000.

FABRIS, V.E. **Lesões celulares reversíveis e irreversíveis.** In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. *Patologia: Processos gerais*. ed. 4ª. Atheneu. São Paulo. 1999.

FAUBION, W.A.; GORES, G.J. **Death receptors in liver biology and pathobiology.** *Hepatology*. v. 29, p.1-4, 1999.

FERNANDES, A. P. M.; MACIEL, LÉA M. Z.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. **Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v. 47. n° 5. 2003.

FOSS, N.T. **Aspectos Imunológicos da Hanseníase**, Revista de medicina de Ribeirão Preto. v. 30. p. 335-339, 1997.

FOSS, N.T. **Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos**. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 74. p. 113-119. 1999.

FOSS, N.T. **Imunologia**. In: TALHARI, S.; NEVES, R.G. 1997. Hansenologia. ed. 3<sup>a</sup>. p. 97-102. 1997.

FOSS, N.T.; CALLERA, F.L. **Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 26. p. 43-51. 1993.

GALLO, M.E.N.; NERY, J.A.C.; RAMOS JÚNIOR, L.A.N.; SALES, A.M. ALBUQUERQUE, E.C.A. **Allocation of leprosy patients for multidrugtherapy: correlation between the classification according to number of skin lesions and the skin smears examination**, Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 78. n° 4. p. 415-424. 2003.

GOULART, I. M.B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. **Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta immune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae***. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 35. n° 4. 2002.

GOULART, I.M.B. **Detecção do TGF- $\beta$ 1 em lesões cutâneas de diferentes formas clínicas da hanseníase.** Dissertação apresentada na Universidade Federal de Uberlândia. 1995.

GOULART, I.M.B.; MINEO, J.R.; FOSS, N.T. **Production of transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) by blood monocytes from patients different clinical forms of leprosy.** Clinical & Experimental Immunology. v. 122. p. 330-334. 2000.

GUINTON, R.S.; ABALOS, R.M.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, T.T. **An Atlas of leprosy.** Sasakawa Memorial Health Foundation. 1990.

HAHN, M.D.; FREITAS, M. R.; FREITAS, M.R.G.; NASCIMENTO, O.J.M. **Isolated superficial peroneal nerve lesion in pure neural leprosy.** Arquivos de Neuro-Psiquiatria. v. 62. n° 2-B. p. 535-539. 2004.

HALE, A.J.; SMITH, C.A.; SUTHERLAND, L.C.; STONEMAN, V.E.; LONGTHORNE, V.L.; CULHANE, A.C.; WILLIAMS, G.T. **Apoptosis: molecular regulation of cell death.** European Journal of Biochemistry. v. 236. p. 1-26. 1996.

HASTINGS, R.C.; OPROMOLLA, D.V.A. **Leprosy.** Ed.2, New Orleans: Churchill Livingstone. p. 49-76.1994.

HELMER, K.A.; FLEISCHFRESSER, I., KUCHARSKI-ESMANHOTO, L.D.; SANTAMARIA, J.R.; FILLUS NETO, J. **The lucio's phenomenon (necrotizing**

**erythema) in pregnancy.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 79. n° 2. p. 205-210. 2004.

HERNANDEZ, M.O.; NEVES JR. I.; SALES, J.S.; CARVALHO, D.S.; SARNO, E.N.; SAMPAIO, E.P. **Induction of apoptosis in monocytes by Mycobacterium Leprae in vitro: a possible role for tumor necrosis fator- $\alpha$ .** Immunology. v. 109. p. 156-164. 2003.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry. v. 29. p. 577-580. 1981.

JAINU, M.; DEVI, C.S.S. **Gastroprotective action of Cissus quadrangularis extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage.** Chemico-biological interactions. v. 161. p. 262-270. 2006.

JANES, K.A.; GAUDET, S.; ALBECK, J.G.; NIELSEN, U.B.; LAUFFENBURGER, D.A.; SORGER, P.K. **The response of human epithelial cells to TNF involves an inducible autocrine cascade.** Cell. v. 124. p. 1225-1239. 2006.

KAPLOWITZ, N. **Cell death at the millennium. Implications for liver diseases.** Clinical liver disease. v. 4. p. 1-23. 2000.

KEANE, J. REMOLD, H.G.; KORNFIELD, H. **Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains Evade Apoptosis of infected alveolar macrophages.** The Journal of Immunology. v. 164. p. 2016-2020. 2000.

KLINGLER, K.; TCHOU-WONG, K.M.; BRANDLI, O.; CHISTOPHER, A.; KIM, R.; CHI, C.; ROM,W. **Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes.** Infection and Immunity. v. 65. p. 5272-5278. 1997.

LAAL, S.; BHUTANI, L.K.; NATH, I. **Natural emergence of antigen-reactive T cells in lepromatous leprosy patients during erythema nodosum leprosum.** Infection and Immunity. v. 50. p. 887-892. 1985.

LEE, H.C.; GOODMAN, J.L. ***Anaplasma phagocytophilum* causes global induction of antiapoptosis in human neutrophils.** Genomics. v. 88. p. 496-503 2006.

LEVIS, W.R.; NATHAN, C.F.; KAPLAN, G.; WINTMER, N.A.; SHERWIN, S.A.; JOB, C.K.; HOROWITZ, C.R.; STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. **Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy.** The New England Journal of Medicine. v. 315. p. 6-15. 1986.

MADEIRA, S. **Aspectos Microbiológicos do *Mycobacterium leprae*** In: OPROMOLLA, D.V.A. Noções de Hanseníase. Ed. 1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. p. 13. 2000.

MARCUCCI, G.; SANTOS, G. G.; MARCHESE, L.M.; GUIMARÃES JR., J. **Oral aspects of specific and unspecific lesions in Hansen's disease patients.**

Pesquisa Odontológica Brasileira. v. 14. n° 3. p. 268-272. 2000.

McDEVITT, H.O. **Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response.** Annual Review of Immunology. v. 18. p. 1-17. 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos novos e coeficientes de detecção da hanseníase no Brasil e estados – 1985 – 2003.** [S.l.] Detec 85; 2004. disponível em : < <http://www.google.com.br/detec85.03xls.html>> Acesso em : 01 de set. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para controle da hanseníase.** Brasília (DF). 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hanseníase. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://saude.gov.br/portal/saude/hanseniaze.html>>. Acesso em: 01 set. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010.** Brasília, 2006. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/hanseniaze\\_plano.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/hanseniaze_plano.pdf)> Acesso em: 22 out. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação da doença no Brasil.** Brasília, 2006. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21665](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21665)>. Acesso em: 22 out. 2006.

MOGGA, S.J.; MUSTAFA, T.; SVILAND, L.; NILSEN, R. **Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine mycobacterium tuberculosis infection.** Scandinavian Journal of Immunology. v. 56. n° 4. p. 383-391. 2002.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARDINER, T.; ARAOZ, R.; COPPÉE, J.Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J.S.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S.N.; JI, BAOHONG, PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P.E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P.J.; COLE, S.T. **On the Origin of Leprosy.** Science. v. 308. p. 1040-1042. 2005.

MUIR, E. **Lepra: Diagnóstico, tratamento e profilaxia.** Ed.6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. p.135. 1974.

MUSTAFA, M.; BJUN, G.; JONSSON, R.; HERNANDEZ, P.R.; NILSEN, R. **Increased expression of Fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential mechanism of immune evasion in mycobacterial infection.** Scandinavian Journal of Immunology. v. 54 p. 630-639. 2001.

NERY J.A.; VIEIRA L.M.M.; MATOS H.J.; GALLO M.E.N.; SARNO E.N. **Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy.** Rev. do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v 40. p. 363-70.1999.



NIANG, M.N.; BALDE, A.T. & PERRAUT, R. **Apoptosis in leprosis patients.** International journal of leprosy and other mycobacterial diseases. v. 67. n° 4. p. 473-474. 1999.

NOMELINI, M.B.; VERGARA, M. L. S.; LIMA, M.A.; SANTOS, T. A. M.; SANTOS, V. M.; RODRIGUES JUNIOR, V. **Generalized hanseniasis in Chagas myocardiopathy: necropsy study.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropicopical. v. 31. n° 4. p. 385-390. 1998.

NUNZI, E.; LEIKER, D.L. **Leprosy in the light skin: na illustrated manual.** Ed. 4, Bologna: Associazione italiana "Amici di Raoul Follereau". p. 9-17, 39-126.1981.

ODDO, M.; RENNO, T.; ATTINGER, A.; BAKKER, T.; MACDONALA, H.R.; MEYLARI, P.R.A. **Fas Ligand-Induced Apoptosis of Infected Human Macrophages Reduces the Viability of Intracellular Mycobacterium tuberculosis.** The Journal of Immunology. v. 160. p. 5448-5454. 1998.

OPROMOLA, D.V.A. **Noções de Hansenologia.** ed.1ª. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, p. 101-115. 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Manual para o controle da lepra.** Washington. p. 48-62. 1989.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Situación de la lepra em la región de Iãs Américas.** 2005.

PAROLIN, M.B.; REOSAN, I.J.M. **Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares.** Arquivos de Gastroenterologia. v. 38. n° 2. p. 138-144. 2001.

PATEL, T.; GORES, G. **Apoptosis and hepatobiliary disease.** Hepatology. v. 21. p. 1725-41. 1995.

PATEL, T.; GORES, G.J. **Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease.** Liver Transplant Surgery. v. 4. p. 42-50. 1998.

PENNA, G.O.; MACEDO, V.O.; MARTELLI, C.M.T.; MAROJA, M.F.; STEFANI, M.M.A.; CHAUL, A. **Thalidomide in the treatment of erythema nodosum leprosum (ENL): systematic review of clinical trials and prospects of new investigations.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 80. n° 5. p. 511-22. 2005.

PERREIRA, F.E.L. **Degenerações, morte celular e alterações do intestício** In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo patologia geral.* ed. 2ª. Guanabara. Rio de Janeiro. 1998.

PESSAYRE, D.; HAOUZI, D.; FAU, D.; ROBIN, M.A.; MANSOURI, A.; BERSON, A. **Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis.** Journal of Hepatology. v. 31. p. 760-770. 1999.

PIMENTEL, M.I.F.; BORGES, E.; SARNO, E.N.; NERY, J.A.C.; GONÇALVES, R.R. **Initial neurological exam of multibacillary leprosy: correlation between the presence of affected nerves and disability present at diagnosis and with the occurrence of overt neuritis.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 78. n° 5. p. 561-568. 2003.

POLAKI, V.; MITSIADES, C.S.; MITSIADES, N. **The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy.** Drug Resist Update. v. 4. p. 233-42. 2001.

QUARESMA, J.A. S.; BARROS, V.L.R.S.; PAGLIARI, C.; FERNANDES, E.R.; GUEDES, F.; TAKAKURA, C.F.; ANDRADE JR, H.F.; VASCONCELOS, P.F.C.; DUARTE, M.I.S. **Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity,** Virology. v. 345. p. 22-30. 2006.

RAMBUKKANA, A.; HIROSHI, Y.; ZANAZZI, G.; MATHUS, T.; SALZER, J.L.; YURCHENCO, P.D.; CAMPBELL, K.P.; FICHETTI, A. **Role of  $\alpha$ -Dystroglycan as a Schwann cell Receptor for *Mycobacterium leprae*.** Science. v. 282. p. 2076-2078. 1998.

REED S.G., **TGF-beta in infections and infectious diseases,** Microbes Infect. v. 1. p. 1313-1325. 1999.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. **Classification of leprosy accordy to immunity: a five-group system.** International Journal of Leprosy. v. 4. p. 255-273. 1966.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. **Classification of leprosy of leprosy for research purposes.** Leprosy review. v. 33. p. 119-128.1962.

ROJAS, M.; OLIVIERA, M.; GRACÍA, L.F. **Activation of JAK2/STAT1- $\alpha$ - dependent signaling events during Mycobacterium tuberculosis- induced macrophage apoptosis.** Cellular Immnology. v. 217. n° 58-66. 2002.

RÜEGG, U.T.; BURGESS, G.M. **Sataurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases.** Trends in pharmacological Science. v. 29. p. 253-257. 1989.

SALES, J. S. **Effects of the exposition the Mycobacterium leprae in apoptose of isolated monocytes of patients with leprosy.** Dissertação apresentada no instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2005.

SAMPAIO, E.P.; MORAES, M.O.; NERY, J.A.; SANTOS, A.; MATOS, H.C.; SARNO, E.N. **Pentoxifilina decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-Alpha) production in lepromatous leprosy patients with *erithema nodosum leprosum* (ENL).** Clinical & Experimental Immunology. v. 111 p. 300-308. 1998.

SAMPAIO, E.P.; PESSOLANI, M.C.; MORAES, O.; SARNO, N. **Pathogenesis of reactions and nerve damage in leprosy.** Report of the scientific working group on leprosy. p. 48-56. 2002.

SARNO, E.N., GRAU, G.E., VIEIRA, L.M., NERY, J.A. **Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states.** Clinical & Experimental Immunology. v. 84. p. 103-108. 1991.

SCHIFFER, M.; BITZER, M.; ROBERTS, I.S.D.; KOPP, J.B.; DIJKE, P.M.; MUNDEL, P.; BÖTTINGER, E.P. **Apoptosis in podocytes by TGF- $\beta$  and Smad7.** The Journal of Clinical Investigation. v. 108. p. 807-816. 2001.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS) **Hanseníase: Dados e indicadores.** Brasília, 2004. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/hanseniaze/dados.htm>>. Acesso: 01 st. 2005.

SLY, L.M.; LÓPEZ, M.; LUU, Y.; YOUNG, D. COOPER, H.; REINER, N.E. **The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis Protein Induces Macrophage Apoptosis Through Toll-like Receptor.** The Journal of Immunology. v. 170. p. 2409-2416. 2003.

SOUZA, F.S.; ALMEIDA, L.N.F.; COSTA, J.P.; ROCHA, P.V.; SOBRINHO, E.F. **Frequency of ocular changes in patients with hansen's disease living in a colony hospital.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. v. 68. n° 3. p. 369-72. 2005.

SPIRA, A.J.; CARROLL, D.; LIU,G.; ZEESHAN, A.; VISHAL, S.;KORNFELD, H.; KEANE, J. **Apoptosis Genes in Human Alveolar Macrophages Infected with Virulent or Attenuated Mycobacterium tuberculosis: A Pivotal Role for Tumor Necrosis Factor.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. v. 29. p. 545-551. 2003.

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GOLSTEIN, P.; NAGATA, S. **Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.** Cell. v. 75. n° 6. p. 1169-1178. 1993.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia Tropical: Hanseníase.** ed. 3ª. Manaus: Gráfica Tropical. v. 167. p. 2-131. 1997.

TRALÉ, S.F.; DECHANDT, I.T.; MIRANDA, R.N.; PEREIRA, L.C.; NASCIMENTO, R. A.; MELLO, S. L.; MESQUITA, L.A.F. **Development of a Mitsuda-like antigen and its evaluation in multibacillary, Mitsuda-negative leprosy patients.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 80. n° 4. p. 355-62. 2005.

UETA, C.; KAWASUMI, H.; YANO, I; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. **Characterization of T cells in mycobacterial infection in human.** XXVIII Joint Conference on Tuberculosis and Leprosy. USA. 1993.

VAN BEERS S.M.; DE WIT, M.Y.L.; KLASTER, P.R. **MiniReview: The epidemiology of *Mycobacterium leprae* : Recent insight.** Federation of European

Microbiological Societies immunology and medical Microbiology. v. 136. p. 221-230. 1996.

VAN BEERS, S.M.; HATTA, M.; KLATSER, P.R. **Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control.** International journal of leprosy and other mycobacterial diseases. v. 54. p. 480-490. 1999.

VENDITTI, A.; MAURILLO, L.; DEL POETA, G.; BUCCISANO, F.; BATTAGLIA, A.; SANTINELLI, S.; CARAVITA, T.; EPICENO, A.M.; DEL MORO, B.; TAMBURINI, A.; PICARDI, A.; SUPPO, G.; CATALANO, G.; AMADORI, S. **Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors.** Haematologica. v. 86. n° 3. p. 237-43. 2001.

VESCOVO, G.; RAVARA, B.; ANGELINI, A.; SANDRI, M.; CARRARO, U.; CECONI, C.; LIBERA, L.D. **Effect of thalidomide on the skeletal muscle in experimental heart failure.** The European Journal of Heart Failure. v. 4. p. 455-460. 2002.

WAHL, S. M. **Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in inflammation: a cause and a cure.** Journal of Clinical Immunology. v. 12. p. 61-74. 1992.

WALSH, D.S.; LANE, J.E.; ABALOS, R.M.; MYINT, K.S.A. **TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions.** Federation of European Microbiological Societies immunology and medical Microbiology. v. 41. p. 265-269. 2004.

WANG, H.; MENGSTEAB, S.; TAG, C.G.; GAO, C.F.; HELLERBRAND, C.; LAMMERT F.; GRESSNER, A.M.; WEISKIRCHEN, R. **Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection**, World Journal of Gastroenterology. v. 7. p. 1929-1936. 2005.

WEISS, L. M.; ARBER, D.A.; CHANG, K. L.; **CD68: a review**, Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. v. 2. p. 2-8. 1994.

WONG, H.K.; TSOKOS, G.C. **Fas (CD95) ligation inhibits activation of NF- $\kappa$ B by targeting p65-Rel A in a caspase-dependent manner**. Clinical Immunology. v. 121. p. 47-53. 2006.

WOOD, C.M.; GOODMAN, P.A.; VASSILEV, A.D.; UCKUN, F.M. **CD95 (APO-1/FAS) deficiency in infant acute lymphoblastic leukemia: detection of novel soluble Fas splice variants**. European Journal of Haematology. v. 70. n° 3. p. 156-171. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**. Geneva: Novartis foundation for sustainable development, Basle, Switzerland. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Report of the first meeting of the WHO Technical Advisory Group on Elimination of Leprosy**. Geneva. 2-3 May. 2000.



WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Scientific Working Group. **Report o Leprosy. Programme for research and training in tropical diseases. Currents status in reactions and nerve damage in leprosy-** What next. 26-28 november, Geneva, Switzerland, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Weekly Epidemiological Record.** Genebra. v. 80. n° 34. p. 289-296. 2005.

YAMAMURA, M., UYEMURA, K., DEANS, R.J., WEINBERG, K., REA, T.H., BLOOM, B.R., MODLIN, R.L. **Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions.** Science. v. 254. p. 277-279. 1991.

YAWALKAR, S.J.; In: WORLD HEALTH ORGANIZATION –WHO. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** Geneva: Novartis Foundation for sustainable development, Basle, Switzerland. p. 134. 2002.

ZHU, Y.; AHLEMEYER, B.; BAUERBACH, E.; KRIEGISTEIN, J. **TGF- $\beta$  inhibits Caspase-3 activation and neuronal apoptosis in rat hippocampal cultures.** Neurochemistry international. v. 38. n° 3. p. 227-235. 2001.