

LUIZ WAGNER DE OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ATIVIDADE MACROFÁGICA E SUA
RELAÇÃO COM O FENÔMENO DE APOPTOSE NA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Banca Examinadora: Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Profa. Dra. Rosana Maria Feio Libonati
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Profa. Dra. Esther Iris Christina Freifran von Ledebur
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Marília Brasil Xavier (suplente)
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Belém, 23 de julho de 2008

O covarde nunca tenta, o
fracassado nunca termina, e o
vencedor nunca desiste.

Norman Vicent Peale

À minha querida mãe Maria do Socorro e à
minha amada esposa Nívea de Paula.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Juarez Quaresma pela orientação durante a elaboração deste trabalho;

A Profa. Dra. Rosana Libonati pela ajuda durante a revisão textual e a interpretação dos dados estatísticos;

A CAPES pelo incentivo financeiro;

E a todas as outras pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	10
ABSTRAT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA HANSENÍASE	12
1.1.1 Conceito	12
1.1.2 Um Breve Histórico	12
1.1.3 Situação Global, Brasileira e Paraense	13
1.1.4 Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	16
1.1.5 Manifestações Clínicas e Características Histopatológicas	21
1.1.6 Reação Hansênica e seu Contexto Citocínico	29
1.2 CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DA HANSENÍASE	33
1.2.1 Resposta Imune Inata	33
1.2.2 Resposta Imune Adaptativa	39
1.2.3 Atividade microbicida do macrófago contra o <i>M. leprae</i>	42
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA APOPTOSE	45
1.3.1 O Fenômeno de Apoptose	45
1.3.2 Apoptose nas Doenças Infecciosas	47
1.3.3 Apoptose na Hanseníase	49
1.4 OBJETIVOS	52
1.4.1 Objetivo Geral	52
1.4.2 Objetivos Específicos	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOTRA	53
2.2 MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO	54
2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA	55
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
3 RESULTADOS	57
3.1 DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFÁGICA	57

3.1.1	Imunomarcacão da iNOS.....	57
3.1.2	Imunomarcacão da Lisozima.....	59
3.1.3	Imunomarcacão da CD68.....	61
3.2	DA AVALIAÇÃO DA APOPTOSE.....	62
3.2.1	Imunomarcacão da caspase 3.....	62
3.3	DA CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE MACROFÁGICA E APOPTOSE.....	64
3.3.1	CD68 e caspase 3 no grupo TT.....	64
3.3.2	Lisozima e caspase 3 no grupo TT.....	64
3.3.3	iNOS e caspase 3 no grupo TT.....	65
3.3.4	iNOS, lisozima e CD68 com a caspase 3 no grupo LL.....	66
4	DISCUSSÃO.....	69
5	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	Forma Borderline Borderline
BL	Forma Borderline Lepromatosa
BT	Forma Borderline Tuberculóide
DC	Célula Dendrítica
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
HI	Forma Indeterminada da Hanseníase
IC	Imunidade Celular
IFN – γ	Interferon Gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Oxido Nítrico Sintetase Induzível
LL	Forma Virchowiana da Hanseníase
MΦ	Macrófago
NF- κB	Fator Nuclear Kapa Beta
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDIM-1	Fitiocerol Dimicocerosado
PGL-1	Glicolipídio Fenólico 1
RR	Reação Reversa
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF – β	Fator Transformador de Crescimento β
TLR	Receptor Toll Like
TNF – α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TT	Forma Tuberculóide da Hanseníase

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Bacilos de Hansen agrupados formando globias. Fonte: Site didático do Depto de Anatomia Patológica da FCM- UNICAMP. Autor - Prof. Luciano S Queiroz.	18
Figura 2: Espectro clínico da hanseníase mostrando a imunidade celular (IC) medida utilizando o teste de Mitsuda. A IC é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice baciloscópico (IB). Fonte: Goulart, 1995. Adaptado de Harboe, 1985.	23
Figura 3: Histopatologia de lesão cutânea mostrando infiltrado inflamatório granulomatoso com células gigantes do tipo Langerhans na forma tuberculóide da doença de Hansen em aumento de 200x. Fonte: Dados do autor.	27
Figura 4: Histopatologia de lesão cutânea mostrando infiltrado inflamatório granulomatoso disperso e constituído por múltiplos histiócitos espumosos na derme e separados da epiderme por evidente faixa de Unna. Aumento de 200x. Fonte: Dados do autor.	28
Figura 5: Paradigma imunológico da hanseníase. <i>Resposta Tipo 1:</i> Imunidade mediada por células com uma potente resposta imune tipo Th1, verificado nas formas de maior resistência. <i>Resposta Tipo 2:</i> imunidade mediada por células com uma resposta Th2 humoral verificado nas formas de menor resistência. Fonte: Goulart, 1995. Adaptado de Modlin & Bloom 1993.	39
Figura 6: Média e desvio padrão do grupo iNOS TT e do grupo iNOS LL no estudo sobre a atividade macrofágica <i>in situ</i> nas formas polares da hanseníase.	57
Figura 7: Imunohistoquímica para iNOS em lesão do grupo TT em aumento de 200x (A) e em aumento de 400x mostrando macrófagos e células gigantes no granuloma (B) ; imunohistoquímica para iNOS em lesão do grupo LL em aumento de 200x (C) e em aumento de 400x (D) .	58
Figura 8: Média e desvio padrão do grupo Lisozima TT e do grupo Lisozima LL no estudo sobre a atividade macrofágica <i>in situ</i> nas formas polares da hanseníase.	59

Figura 9: Imunohistoquímica para lisozima em lesão do grupo TT em aumento de 200x (A) e em aumento de 400x (B) ; imunohistoquímica para lisozima em lesão do grupo LL em aumento de 200x (C) e em aumento de 400x (D) .	60
Figura 10: Média e desvio padrão do grupo CD68 TT e CD68 LL no estudo sobre a atividade macrofágica <i>in situ</i> nas formas polares da hanseníase.	61
Figura 11: Imunohistoquímica para CD68 em lesão do grupo TT em aumento de 200x (A) ; Imunohistoquímica para CD68 em lesão do grupo LL em aumento de 200x (B) .	62
Figura 12: Média e desvio padrão do grupo Caspase TT e grupo Caspase LL na avaliação da ocorrência de apoptose em lesões de pele de pacientes com formas polares da hanseníase.	63
Figura 13: Imunohistoquímica mostrando presença de células apoptóticas em lesões do grupo TT em aumento de 200x (A) ; imunohistoquímica mostrando presença de células apoptóticas em lesão do grupo LL em aumento de 200x (B) .	63
Figura 14: Correlação linear negativa entre atividade de macrófago (CD68) e apoptose (Caspase 3) para o grupo TT.	64
Figura 15: Correlação linear positiva entre atividade macrofágica (lisozima) e apoptose (caspase 3) para o grupo TT.	65
Figura 16: Correlação linear positiva entre atividade de macrófago (marcada pela iNOS) e apoptose (marcada pela caspase 3) para grupo e lesões TT.	66
Figura 17: Correlação linear entre atividade de macrófago (marcada pela iNOS) e apoptose (marcada pela caspase 3) nas lesões de pele do grupo LL.	67
Figura 18: Correlação linear entre atividade de macrófago (marcada pelo CD68) e apoptose (marcada pela caspase 3) nas lesões de pele do grupo LL.	67
Figura 19: Correlação linear positiva entre atividade de macrófago (marcada pela Lisozima) e apoptose (marcada pela caspase 3) no grupo LL.	68

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a correlação entre a atividade de macrófagos e a apoptose nas formas polares da hanseníase. Para tal foram analisadas amostras constituídas de 29 biopsias de pele de pacientes com as formas polares da hanseníase. Para a medida da atividade macrofágica e da apoptose, utilizou-se o método imunohistoquímico, visando os marcadores lisozima, CD68, iNOS (para atividade de macrófago) e caspase 3 (para apoptose). No tratamento estatístico, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e a Correlação linear de Spearman. Os resultados obtidos sugerem que a taxa de apoptose sofre influência direta da atividade macrofágica nas lesões de pacientes TT, contudo nas lesões LL, notou-se que outros fatores devem estar induzindo a morte celular programada, possivelmente o TGF- β .

Palavras Chaves: Hanseníase, Macrófago, Apoptose

ABSTRACT

The present study had for objective to evaluate the correlation between the activity of macrophage and the apoptosis in the polar forms of the leprosy. For such constituted samples of 29 biopsies of patients' skin were analyzed with the polar forms of the leprosy. For the measure of the activity of macrophage and of the apoptosis, the method immunohistochemistry was used, seeking the markers lysozyme, CD68, iNOS (for activity of macrophage) and caspase 3 (for apoptosis). In the statistical treatment, it was used the test non parametric of Mann-Whitney and the lineal Correlation of Spearman. Do the obtained results suggest that the apoptosis rate suffers direct influence of the activity of macrophages in the lesions of patient TT, however in the lesions what was LL, noticed other factors they must it is inducing the programmed cellular death, possibly TGF- β .

Key words: Leprosy, Macrophages, Apoptosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA HANSENÍASE

1.1.1 Conceito

A Hanseníase, doença infecto-contagiosa de evolução crônica, é causada por um bacilo, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Tanto a pele quanto os nervos do sistema nervoso periférico (SNP) são afetados pela doença, evidenciando aspectos clínicos e histopatológicos que variam de acordo com a imunidade do hospedeiro (Ridley & Jonpling, 1966). A transmissão dos bacilos se dá pelo contato íntimo e prolongado entre indivíduos bacilíferos não tratados e indivíduos suscetíveis, particularmente através das vias aéreas superiores. Durante o curso crônico da doença, são comuns surtos reacionais que podem acometer vários órgãos, tais como pele, nervos, linfonodos, fígado, baço, peritônio, testículos, olhos, articulações, tendões, músculos e ossos (Naafs, 1994; Lockwood, 1996).

1.1.2 Um Breve Histórico

Episódio marcante na história da hanseníase (ou Lepra) ocorreu em 1873, quando seu agente etiológico foi descoberto. O pesquisador norueguês Gerhard Armaeur Hansen conseguiu identificar o *M. leprae* a partir de lesões cutâneas de

indivíduos doentes. Apesar disso, a doença permaneceu incurável por muitos anos até a introdução das sulfonas na década de 1940.

Atualmente os pacientes podem contar com forte arsenal terapêutico contra a hanseníase. Sendo que, desde a década de 1950, não existe mais a norma de isolar o doente em hospitais-colônias e a terapêutica é realizada em nível ambulatorial através da poliquimioterapia (Velloso & Andrade, 2002).

Quanto à sua origem, alguns autores acreditam que seja originária da Ásia (Jopling & McDougall, 1991). Já outros, (Brasil, 1989) apontam a África como berço desta antiga doença. Contudo, pesquisas mais recentes (Monot *et al.*, 2005), utilizando ferramentas da genômica comparativa, têm escrito um novo capítulo na história da hanseníase, sugerindo que ela tenha se originado na África Oriental, donde teria espalhado-se para o restante do mundo consoante as migrações humanas.

1.1.3 Situação Global, Brasileira e Paraense

No mundo todo, o fardo da hanseníase vem diminuindo bastante nos últimos anos, devido, em grande parte, ao incremento de uma efetiva poliquimioterapia e de um grande esforço global para seu controle. No começo de 2007, registrou-se uma prevalência global de 224 717 casos de hanseníase. Sendo que o número de casos novos detectados durante 2006 foi de 259 017. Um declínio de mais de 40 019 casos (13.4%) foi verificado durante 2006 quando comparado a 2005 (WHO, 2007).

Em 2007, a República Unida da Tanzânia conseguiu alcançar a meta de eliminação da hanseníase (redução da prevalência para menos de um caso em cada 10.000 habitantes), restando apenas quatro países (dentre os 122 em 1985) alcançarem as metas de eliminação. Estes países são: Brasil, República Democrática do Congo, Moçambique e Nepal (WHO, 2007).

Juntos esses países são responsáveis por aproximadamente 23% de todos os casos detectados durante 2006 e 34% de todos os casos registrados no começo de 2007. Com o contínuo apoio dos seus parceiros e o compromisso das autoridades nacionais, espera-se que eles alcancem as metas para eliminação da hanseníase como problema de saúde pública em futuro não muito distante (WHO, 2007).

No Brasil, registrou-se no final de 2005 um coeficiente de prevalência de 1,48 casos/10.000 habitantes e um coeficiente de detecção de casos novos de 2,09/10.000 habitantes (Brasil, 2006). Ainda que o país registre um importante decréscimo nas taxas de prevalência e detecção de casos novos, os níveis de magnitude da doença, segundo as regiões geográficas, demonstram a necessidade de se dar continuidade à execução de atividades que impactem a transmissão da doença (Brasil, 2006).

Os dados de 2005 revelam a necessidade de focalizar o diagnóstico de hanseníase em menores de 15 anos que podem ser os contactantes de casos ainda não-assistidos e não-identificados pelo sistema de saúde. Portanto, essa é uma ação da maior significância para as estratégias subseqüentes (Brasil, 2006).

O Brasil ainda apresenta uma alta magnitude da endemia de hanseníase em menores de 15 anos, com um coeficiente de detecção de 0,6 em cada 10.000 habitantes. Embora o maior número absoluto de crianças detectadas com hanseníase tenha sido na região Nordeste, o maior coeficiente de detecção em menores de 15 anos foi na região Norte, com 1,62 casos em cada 10.000 habitantes, demonstrando a manutenção da endemia nesta região.

A situação no estado do Pará é ainda mais adversa, pois o estado possui 19 municípios prioritários para a hanseníase, a saber: Abaetetuba, Altamira, Ananindeua, Belém, Cametá, Castanhal, Itaituba, Itupiranga, Jacundá, Marabá, Novo Repartimento, Paragominas, Parauapebas, Redenção, Rondon do Pará, Santarém, Tailândia, Tucuruí, Xinguara. Neste estado, 90% da população encontra-se em municípios com mais de cinco casos de hanseníase (Brasil, 2006).

Segundo relatório do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (Brasil, 2006), no estado do Pará, no ano de 2005, foi diagnosticado 4.687 casos novos. Deste total, 3.329 estão em curso de tratamento. Nos mesmos casos novos diagnosticados, 579 (12,35%) acometiam menores de 15 anos; 9 (0,19%) apresentavam, no momento do diagnóstico, incapacidade física severa; 2.381 (50,80%) eram formas avançadas da doença. Sendo que o estado obteve 71,4% de cura no mesmo ano (Brasil, 2006).

1.1.4 Biologia do *Mycobacterium leprae*

Ao longo dos anos, vários trabalhos contribuíram para melhor entender a biologia do *M. leprae*. Em 1960, Shepard conseguiu inocular a micobactéria em coxim de pata de camundongo, obtendo lesão localizada de hanseníase; em 1971, Kircheimer & Storrs conseguiram infectar tatus – *Dasypus novencinctus*; e em 1978, Leininger *et al.* conseguiram infectar macacos, *Cercocebus sp* e *Mangabey sp*.

Mais recentemente, o *M. leprae* teve seu genoma mapeado por Cole *et al.*, (2001) do que resultou grande avanço na elucidação da biologia deste microrganismo. Anteriormente, estudar a micobactéria era muito difícil, devido, principalmente, a incapacidade de cultivá-la em meios artificiais.

O genoma do *M. leprae*, quando comparado com o genoma do *M. tuberculosis*, parece ter sido reduzido durante sua evolução. Quase metade dele encontra-se ocupado por pseudogenes (Cole *et al.*, 2001). Além disso, inclui 1605 genes que codificam proteínas e 50 genes para moléculas de RNA estáveis (Cole *et al.*, 2001).

O *M. leprae* parece ter perdido genes normalmente requeridos para replicação *ex vivo* e assumido um único nicho ecológico bastante limitado, necessário para o seu crescimento dentro das células. Tais genes decaídos têm removido vias metabólicas inteiras e genes reguladores, particularmente aqueles envolvidos no catabolismo. Não obstante, genes essenciais para formação de uma parede celular micobacteriana tem sido assegurados (Brennan & Vissa, 2001).

O genoma do *M. leprae* inclui varias matrizes de leitura abertas não presentes no *M. tuberculosis*. Estas proteínas restritas ao *M. leprae* devem fornecer as bases para testes de pele específicos e outros ensaios diagnósticos para detectar infecções com a micobactéria (Dockrell *et al.*, 2000, Brennan, 2000; (Cole *et al.*, 2001).

Os bacilos podem depender de produtos metabólicos do hospedeiro, o que poderia explicar seu longo tempo de geração e sua incapacidade para crescer em cultura (Cole *et al.*, 2001). No futuro, análises comparativas do genoma do *M. leprae* e outras micobactérias devem desvendar as bases moleculares para mostrar a percentagem da replicação e dependência de células hospedeiras para o crescimento do *M. leprae*. Não existe evidência de que as variações genéticas observadas influenciam na virulência do *M. leprae* (Shin *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000).

Uma das características deste bacilo é que, nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, podem ser vistos não apenas isolados, mas também agrupados, formando arranjos especiais denominados globias (Figura 1). Essas estruturas resultam da sólida união dos bacilos através de uma substância chamada gléia (Hastings, 1985).

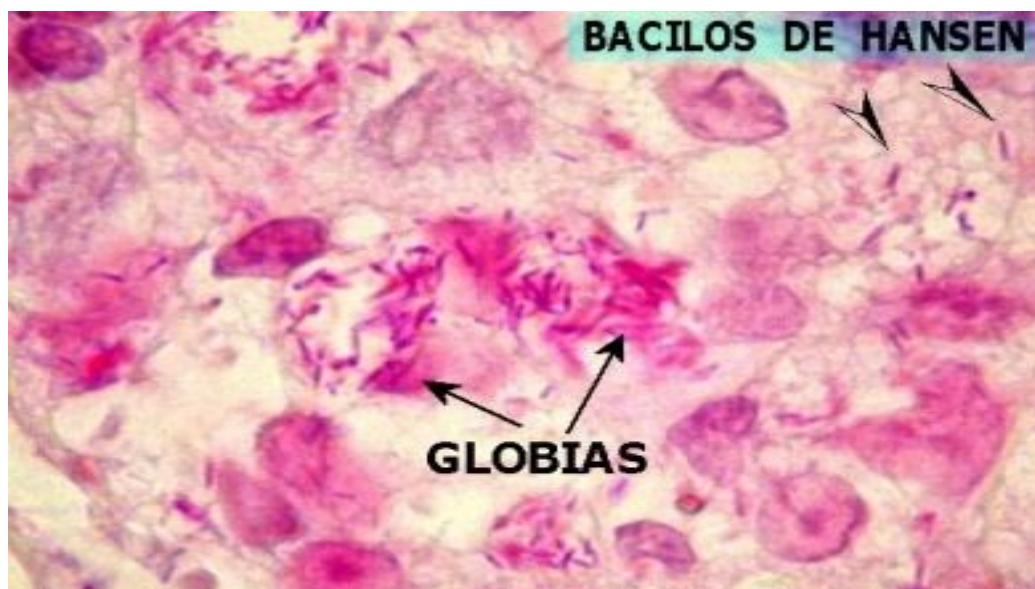


Figura 1 – Bacilos de Hansen agrupados formando globias. Fonte: Site didático do Depto de Anatomia Patológica da FCM – UNICAMP. Autor - Prof. Luciano S. Queiroz.

Os bacilos possuem alta infectividade, baixa patogenicidade (Azulay & Azulay, 1985) e alta virulência, esta última representada pelo seu potencial incapacitante responsável pelas deformidades e mutilações que mantêm a estigmatização da doença.

O *M. leprae* pode manter-se viável por até 10 dias sob temperatura de 4°C fora do organismo humano em fragmentos de biópsia ou suspensão. Nas secreções nasais, o bacilo pode sobreviver por até sete dias à temperatura de 20.6°C e umidade de 43,7%, porém com o aumento da temperatura e umidade, a viabilidade tende a diminuir. Bacilos irregularmente corados são considerados inviáveis, ou seja, incapazes de produzir doença (Leiker & Nunzi 1981; Madeira, 2000).

Morfológicamente, o bacilo apresenta, além da parede celular, uma estrutura mais externa denominada cápsula. Assim como em outras espécies micobacterianas patogênicas, a superfície externa do *M. leprae* é caracterizada pela presença de grande quantidade de componentes lipídicos, que é, provavelmente, responsável pela “zona elétron transparente” e pelo aspecto espumoso do material visto no interior dos macrófagos de pacientes virchowianos (Leiker & Nunzi, 1981; Madeira, 2000).

Os dois lipídios capsulares mais importantes são: o PDIM – *Phthiocerol dimycocerosates* – (quimicamente distinto daqueles encontrados em outras espécies de micobactérias); e o PGL-1 – *Phenolic Glycolipid-1* – que contém um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e aparentemente único para o *M. leprae*. O PDIM e o PGL-1 podem ser detectados em tecidos infectados de seres humanos e de tatus, indicando que esses componentes podem persistir por longo período, mesmo após o bacilo ter sido degradado e eliminado. A porção terminal 3,6 – di-O-metil glucose do PGL-1 ainda não foi detectado em nenhuma outra molécula natural constituindo-se na chave para a alta especificidade da resposta humoral durante o processo de infecção (Madeira, 2000).

O PGL-1 pode reagir com compostos de radicais livres sugerindo que este lipídio capsular possa proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a infecção (Buhrer, 1998; Madeira, 2000; Buhrer, 2000; Buhrer, *et al.*, 2001; Buhrer, *et al.*, 2003).

A parede celular micobacterina contém alvos importantes para resposta imune do hospedeiro. Os principais são os glicolipídeos fenólicos espécies-específicos (PGL-1), os quais estimulam uma resposta de anticorpo IgM potente (Cho *et al.*, 1983) que está na razão direta para a carga bacilar nos pacientes e para a falha na terapia (Roche *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 2001). Outros componentes incluem o lipoarabinomanana (LAM), o qual modula as atividades bactericidas dos macrófagos (Roach *et al.*, 1992), e proteínas envolvidas na síntese da parede celular.

A predileção única do *M. leprae* para células de Schwann é, provavelmente, determinada pelo ligamento da micobactéria ao domínio G da cadeia $\alpha 2$ da laminina-2, a qual é um componente da lamina basal das células de Schwann (Rambukkana *et al.*, 1997). Esta forma de laminina está restrita ao nervo periférico, podendo explicar o tropismo específico do *M. leprae*.

A subsequente absorção do *M. leprae* pelas células de Schwann depende do α -dístroglicano, o qual é o receptor para a laminina dentro da membrana celular, e outros componentes intracelulares (Rambukkana *et al.*, 1998). Várias possíveis moléculas na superfície do *M. leprae* ligam-se a este complexo, incluindo a terminação específica trissacarídica do PGL-1 e uma proteína de 21 kD; (Ng *et al.*, 2000; Shimoji *et al.*, 1999) entretanto, a especificidade destas interações não tem sido completamente esclarecidas (Marques *et al.*, 2001).

Uma vez dentro da célula de Schwann, os bacilos se replicam lentamente durante anos. Em alguns estágios, as células T específicas reconhecem a

presença dos antígenos micobacterianos dentro do nervo e iniciam uma reação inflamatória crônica.

1.1.5 Manifestações Clínicas e Características Histopatológicas

A hanseníase manifesta-se através de sinais e sintomas dermatoneurológicos. As alterações neurológicas, quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente, podem causar incapacidades físicas, evoluindo para deformidades (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

As lesões dermatológicas mais comuns são as manchas pigmentares ou discrômicas, as placas, as infiltrações, os tubérculos e os nódulos. Essas lesões podem estar localizadas em qualquer região do corpo e podem, também, acometer a mucosa nasal e a cavidade oral. Ocorrem, porém, com maior frequência, na face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

Uma característica das lesões dermatológicas da hanseníase que diferencia das provocadas por outras doenças consiste na alteração da sensibilidade: térmica, dolorosa e/ou tátil. A sensibilidade nas lesões pode estar diminuída ou ausente, podendo também haver aumento da sensibilidade (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

Os sinais e sintomas neurológicos da hanseníase manifestam-se, além de lesões na pele, através de lesões nos nervos periféricos. Essas lesões são decorrentes de processos inflamatórios (neurites) e podem ser causadas tanto

pela ação do bacilo nos nervos como pela reação do organismo ao bacilo ou por ambas. Elas manifestam-se através de dor e espessamento dos nervos periféricos; perda de sensibilidade nas áreas inervadas, principalmente nos olhos, mãos e pés; perda de força nos músculos, principalmente nas pálpebras e nos membros superiores e inferiores (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

A neurite, geralmente, manifesta-se através de um processo agudo, acompanhado de dor intensa e edema. No início, não há evidência de comprometimento funcional do nervo, mas, freqüentemente, a neurite torna-se crônica e passa a evidenciar esse comprometimento, através da perda da capacidade de suar (anidrose), causando ressecamento na pele. Há perda de sensibilidade, causando dormência e há perda da força muscular, causando paralisia nas áreas inervadas pelos nervos comprometidos (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

Quando o acometimento neural não é tratado podem surgir incapacidades e deformidades pela alteração de sensibilidade. Alguns casos, porém, apresentam alterações de sensibilidade e alterações motoras (perda de força muscular) sem sintomas agudos de neurite. Esses casos são conhecidos como neurite silenciosa. As lesões neurais aparecem nas diversas formas da doença, sendo freqüentes nos estados reacionais (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

A. Formas clínicas

Uma das classificações mais usadas para a doença foi proposta pelos ingleses Ridley & Jopling (1966) que adota subgrupos dentro de um espectro, que

obedece, critérios clínicos e bacteriológicos, e enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos. Esses autores propõem que as formas clínicas se distribuem dentro de um espectro (Figura 2) cujas extremidades são representadas pelo pólo de resistência (forma Tuberculóide, TT), e pelo pólo de susceptibilidade conhecido como pólo anérgico (forma Virchowiana, LL). Entre esses dois pólos encontramos os subtipos, *Borderline* Tuberculóide (BT), *Borderline Borderline* (BB) e *Boderline* Lepromatoso (BL). Além dessas formas, existe uma inicial chamada hanseníase indeterminada (HI) (não mostrada na figura).

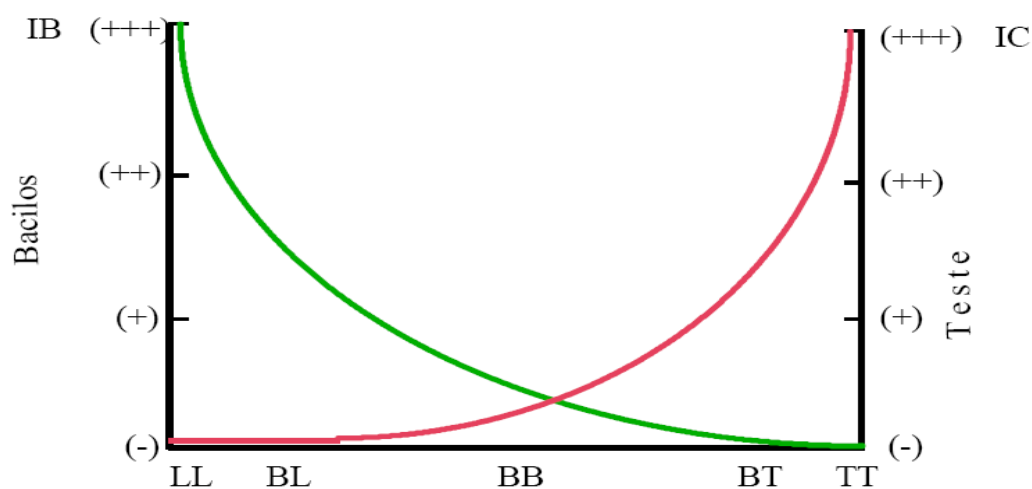


Figura 2: Espectro clínico da hanseníase mostrando a imunidade celular (IC) medida utilizando o teste de Mitsuda. A IC é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice baciloscópico (IB). Fonte: Goulart, 1995. Adaptado de Harboe, 1985.

Na forma HI, as lesões surgem após um período de incubação que varia, em média, de dois a cinco anos. Caracteriza-se pelo aparecimento de manchas hipocrômicas, com alteração de sensibilidade, ou simplesmente por áreas de

hipoestesia na pele. As lesões são em pequeno número e podem se localizar em qualquer área da pele. Frequentemente, apenas a sensibilidade térmica encontra-se alterada. Não há comprometimento de troncos nervosos, apenas de ramúsculos nervosos cutâneos. A pesquisa de BAAR revela-se negativa. A HI é considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase e, após período de tempo que varia de poucos meses até anos, ocorre evolução para cura ou para outra forma clínica (Brasil, 2002; Goulart *et al.*, 2002; Araújo, 2003).

A forma TT mostra lesões bem delimitadas, em número reduzido, anestésicas e de distribuição assimétrica. Descrevem-se lesões em placas ou anulares com bordas papulosas, e áreas da pele eritematosas ou hipocrômicas. Seu crescimento centrífugo lento leva à atrofia no interior da lesão, que pode, ainda, assumir aspecto tricotóide, com descamação das bordas. Observam-se, também, as variedades infantis e a forma neural pura (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

A variedade infantil da TT é observada em crianças conviventes com portadores de formas bacilíferas e localiza-se principalmente na face. Podem se manifestar como nódulos, placas, lesões tricotóides ou sarcoídicas. Já na forma neural pura, não se encontram lesões cutâneas. Há espessamento do tronco nervoso e dano neural precoce e grave, em especial, quando atinge nervos sensitivo-motores. A baciloscopia resulta negativa (Araújo, 2003).

As formas TT e HI constituem as formas paucibacilares da hanseníase. Apesar da possibilidade de cura espontânea na TT, a orientação é de que os casos sejam tratados para reduzir o tempo de evolução da doença e o risco de dano neural (Brasil, 2002; Goulart *et al.*, 2002; Araújo, 2003).

A hanseníase LL trata-se de forma multibacilar, reconhecida por corresponder ao pólo de baixa resistência, dentro do espectro imunológico da doença. Portanto, manifesta-se naqueles indivíduos que apresentam imunidade celular deprimida para o *M. leprae* (Ridley, 1990; Brasil, 2002; Goulart *et al.*, 2002; Araújo, 2003).

Admite-se que a LL possa evoluir a partir da forma HI ou se apresentar como tal desde o início. Sua evolução crônica caracteriza-se pela infiltração progressiva e difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo afetar, ainda, os linfonodos, o fígado e o baço (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

Na pele do paciente com a forma LL, descrevem-se pápulas, nódulos e máculas. A infiltração é difusa e mais acentuada na face e nos membros. A pele torna-se lúzida, xerótica, com aspecto apertado e tonalidade semelhante ao cobre. Há rarefação dos pêlos nos membros, cílios e supercílios. A queda destes nestes locais chama-se madarose. A infiltração da face, incluindo os pavilhões auriculares, com madarose e manutenção da cabeleira, forma o quadro conhecido como “fácie leonina”. O comprometimento nervoso ocorre nos ramúsculos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos. Estes últimos vão apresentar deficiências funcionais e seqüelas tardias. São sinais precoces da forma LL, a obstrução nasal, rinorréia serossangüinolenta e edema de membros inferiores. A forma LL apresenta baciloscopia fortemente positiva e representa nos casos virgens de tratamento, importante foco infeccioso ou reservatório da doença (Ridley, 1990; Brasil, 2002; Araújo, 2003).

A forma dimorfa da hanseníase (BT, BB, BLL) é caracterizada por sua instabilidade imunológica, o que faz com que haja grande variação em suas manifestações clínicas, seja na pele, nos nervos, ou no comprometimento sistêmico. As lesões da pele revelam-se numerosas e a sua morfologia mescla aspectos de TT e LL, podendo haver predominância ora de um, ora de outro tipo (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

Na forma dimorfa são encontradas placas eritematosas, manchas hipocrômicas com bordas ferruginosas, manchas eritematosas ou acastanhadas, com limite interno nítido e limites externos imprecisos, placas eritemato-ferruginosas ou violáceas, com bordas internas nítidas e limites externos difusos (lesões foveolares). Quando numerosas, são chamadas lesões em renda ou queijo suíço. A infiltração assimétrica da face, dos pavilhões auriculares, e a presença de lesões no pescoço e nuca são elementos sugestivos desta forma clínica. As lesões neurais são precoces, assimétricas e, com frequência, levam a incapacidades físicas. A pesquisa de BAAR pode ser negativa ou positiva com índice bacilar variável (Brasil, 2002; Araújo, 2003).

A. Histopatologia das lesões

Na forma clínica TT há formação de granuloma tuberculóide, constituído por agregado de células fagocitárias mononucleares com diferenciação epitelióide bem evidente e participação de células gigantes multinucleadas tipo Langerhans no centro da lesão (Figura 3) e com a presença de linfócitos que confere um halo denso contornando este granuloma (Fleury, 1989; Goulart *et al.*, 2002). Os

granulomas do tipo TT estendem-se desde a derme profunda até a papilar, podendo inclusive atingir a camada basal da epiderme.

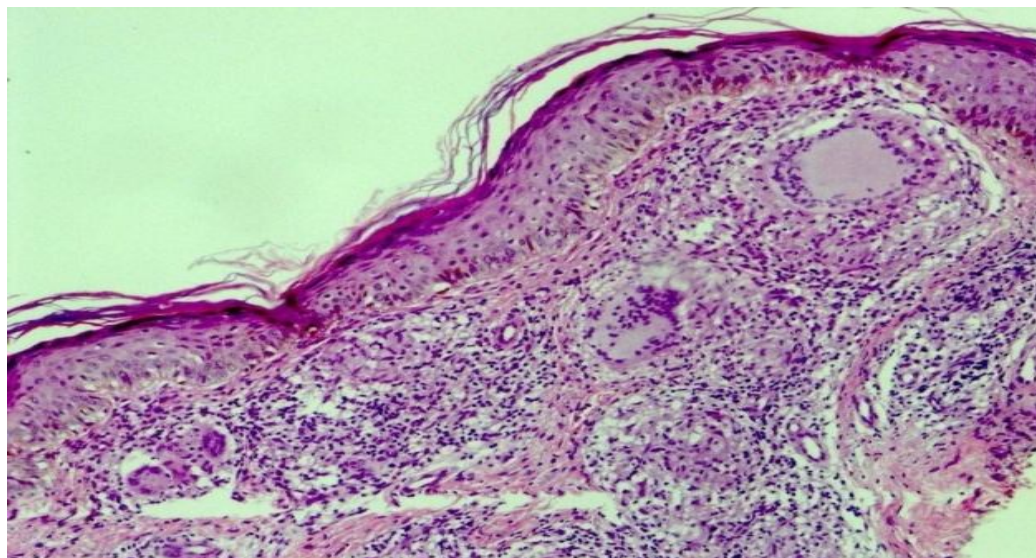


Figura 3: Histopatologia de lesão cutânea mostrando infiltrado inflamatório granulomatoso com células gigantes do tipo Langerhans na forma tuberculóide da doença de Hansen. Aumento de 200x. Fonte: Dados do autor.

Na forma clínica LL a lesão histopatológica mostra um extenso infiltrado celular composto de histiócitos com citoplasma carregado de bacilos, que contém grandes quantidades de lipídeos em sua parede, conferindo o aspecto de células espumosas (células de Virchow) e às vezes multivacuoladas (Figura 4). A epiderme está achatada e a zona subepidérmica não está envolvida. O infiltrado lepromatoso mesmo quando exuberante não atinge a camada basal da epiderme, ficando separado por uma faixa de fibras colágenas correspondente à derme papilar retificada, conhecida como faixa de Unna (Ridley, 1990; Goulart *et al.*, 2002).

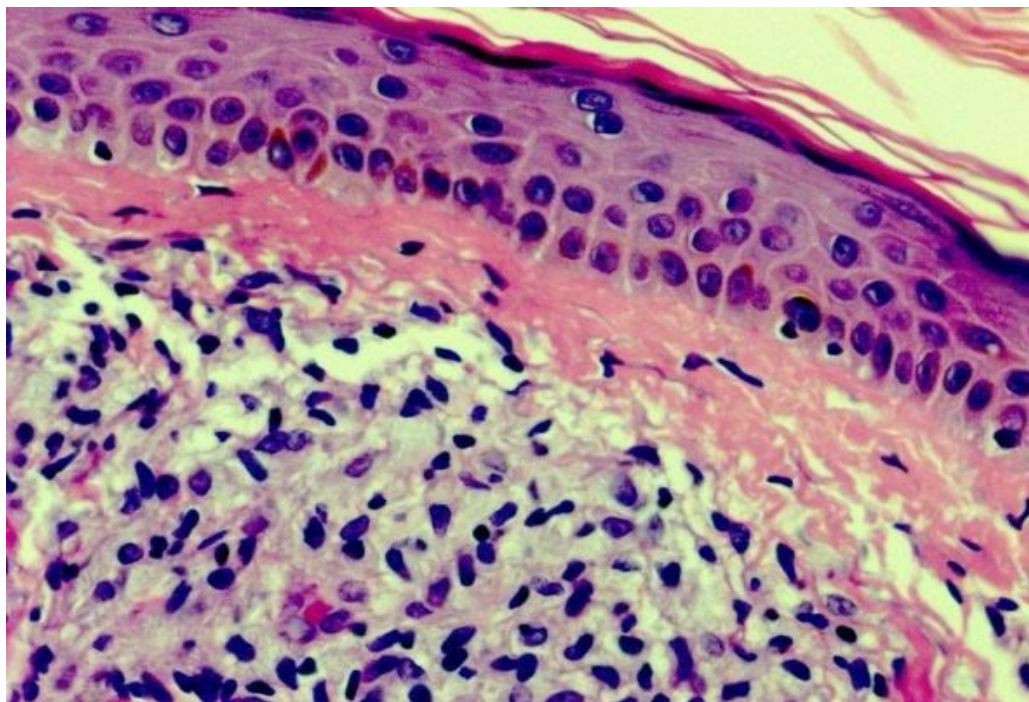


Figura 4: Histopatologia de lesão cutânea mostrando infiltrado inflamatório granulomatoso disperso e constituído por múltiplos histiócitos espumosos na derme e separados da epiderme por evidente faixa de Unna. Aumento de 200x. Fonte: Dados do autor.

O grupo *borderline* é basicamente instável e a distinção entre um sub-grupo de maior resistência (BT) para outro de menor resistência (BL) estar baseado na indiferenciação progressiva da célula macrofágica, na diminuição do número de linfócitos e no aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos (Fleury, 1989; Goulart *et al.*, 2002).

Na forma BT, relativamente de alta resistência, as lesões podem mostrar raros bacilos e o granuloma é de células epitelióides focalizadas por zona periférica de linfócitos com presença de células gigantes tipo Langhans, algumas vezes numerosas, e tipo corpo estranho (Goulart *et al.*, 2002).

Já os casos BB são poucos e clinicamente tendem a mover-se para um dos pólos. O número de bacilos é maior, com células epitelióides difusamente espalhadas por todo o granuloma e não focalizadas por zonas de linfócitos. Células gigantes e linfócitos em geral são escassos e difusos. Há presença de edema intra e intercelular o qual é um aspecto comum nas formas BB associado à sua tendência a reação (Goulart *et al.*, 2002).

Finalmente, a forma BL mantém a faixa de Unna e apresenta granuloma composto de macrófagos indiferenciados que contém grande número de bacilos. Esse granuloma é diferenciado daquele do LL por áreas de densa infiltração linfocitária (Ridley, 1990; Goulart *et al.*, 2002).

1.1.6 Reação Hansênica e seu Contexto Citocínico

Durante o curso crônico da hanseníase, podem surgir os estados reacionais antes, durante ou após o tratamento, quando não existem mais bactérias viáveis no organismo do indivíduo (Naafs, 1994; Lockwood, 1996). Tais reações consistem em manifestações clínicas que aparecem devido a alterações no equilíbrio imunológico entre hospedeiro e micobactéria. Pele e nervos são geralmente os tecidos mais afetados, podendo levar a incapacidade da função do nervo periférico (Naafs, 1994).

As reações seguem-se a fatores desencadeantes, tais como: infecções intercorrentes, vacinação, gravidez e puerpério, medicamentos iodados, estresse físico e emocional (Naafs, 1994; Araújo, 2003).

Existem dois tipos de reações classificadas de acordo com Ridley & Jopling (1966): reação tipo 1 ou reação reversa e reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH).

As reações do tipo 1 ou reação reversa (RR) estão presentes com frequência em pacientes paucibacilares, parecendo estar relacionada a uma exacerbação da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae* (Naafs, 1994). Ao exame histopatológico é possível notar expansão do granuloma com presença de edema e infiltrado de células TCD4+. Tanto a quantidade de receptores para interleucina-2 (IL-2R) quanto a expressão de HLA-DR em células do infiltrado e em queratinócitos na epideme são vistos aumentados, característico da produção de IFN- γ (Modlin, 1988).

Usando a técnica da PCR, foi demonstrado que a expressão de mRNA das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IFN- γ está aumentada nas lesões, um padrão típico de resposta Th1. Outras citocinas do padrão Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 estão diminuídas. Pela técnica de imuno-histoquímica, foi demonstrado a presença das proteínas IFN- γ e TNF- α , associadas à detecção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no citoplasma dos macrófagos, determinando uma atividade macrofágica competente (Yamamura, 1992).

A reação do tipo 2 ou ENH apresenta-se 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 TNF- α e

IFN- γ sem, contudo, haver mudança definitiva da condição imunológica do paciente (Naafs, 1994).

Na pele, a lesão típica é 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. (Araújo, 2003).

Não há consenso sobre o envolvimento da imunidade celular neste tipo de reação, a despeito de ter sido demonstrado células imunocompetentes expressando receptores para IL-2 (IL-2R) e HLA-DR, nas lesões, um indicativo da presença de IFN- γ (Sampaio & Sarno, 1998).

Além da pele e nervos, outros órgãos podem estar envolvidos: linfonodos, fígado, baço, peritônio, testículos, olhos, articulações, tendões, músculos e ossos. Pode haver febre, leucocitose, estimulação policlonal de anticorpos, queda do produto C3d do sistema complemento e presença de imunocomplexos nos tecidos lepromatosos, caracterizando uma síndrome por imunocomplexos (Naafs, 1994).

Tem sido mostrado que, durante o ENH, há um aumento seletivo na expressão de mRNA de IL-6, IL-8 e IL-10 nas lesões, uma indicação de uma resposta do tipo Th2. A expressão de IL-4 e IL-5 persistiram sem aumento. Além disso, TNF- α e TGF- β 1 estão presentes nos macrófagos das lesões nas reações ENL, bem como a presença da enzima Oxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) nos neutrófilos. No soro de pacientes BL e LL com ENL, os níveis de TNF- α e IL-1 também estão aumentados (Sarno *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 1993).

Em culturas de células aderentes de PBMC de doentes de hanseníase e doadores sadios, tem sido mostrado que o PGL-1 estimula a produção de TGF- β 1. Os níveis de TGF- β 1 em pacientes BL e LL, com reação ENL, foram 5 vezes maiores do que os encontrados em pacientes BB e BT com RR e 60 vezes maior do que os níveis encontrados em pacientes TT sem reação (Goulart *et al.*, 2002).

Esses resultados indicam que o TGF- β 1 pode ter diferentes papéis em hanseníase: mediando uma ação supressiva localmente associada com a presença de PGL-1, e induzindo efeitos pró-inflamatórios quando secretado sistemicamente por monócitos, dessa forma atuando como uma citocina modulatória na reação ENH, associada com a resposta imune Th2 nas formas multibacilares da hanseníase (Goulart *et al.*, 2002).

1.2 CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DA HANSENÍASE

1.2.1 Resposta Imune Inata

A. *Células Dendríticas (DC)*

As DC são encontradas sob o epitélio da maioria dos órgãos, onde sua função é a captura de antígenos estranhos e transporte para os órgãos linfóides periféricos. A maioria dessas células é derivada da linhagem monocítica e são chamadas de DC mielóides. Constituem uma das mais efetivas células apresentadoras de antígenos (APC) do *M. leprae* (Mittal *et al.*, 1989), desempenhando papel chave na modulação precoce da resposta imune (Demangel & Britton, 2000).

Nos locais de invasão do hospedeiro, como a mucosa nasal ou a pele erodida, as DC pode ser a primeira linha de defesa contra as micobactérias. O reconhecimento dos bacilos pela DC e a subsequente produção local de citocinas e quimiocinas podem regular a inflamação, bem como manipular o posterior desenvolvimento da imunidade adaptativa, em direção a uma resposta Th-1 ou Th-2.

B. *Células de Langerhans*

São DC imaturas encontradas como uma rede de malhas contínua na camada epidérmica da pele cuja função principal é aprisionar e transportar os antígenos protéicos aos linfonodos de drenagem. Durante sua migração aos

linfonodos, as células de Langerhans amadurecem nas DC do linfonodo, que podem apresentar com eficiência o antígeno às células T *naïve*.

Os pacientes com hanseníase LL têm menos células de Langerhans, não importando se a biopsia estudada foi retirada de uma pele saudável ou de uma lesão, diferentemente dos controles não infectados (Gimenez *et al.*, 1989). Em contraste, os pacientes TT têm número elevado de células de Langerhans nas lesões, o que sugere ativa infiltração destas células para esses sítios.

As células de Langerhans encontradas na epiderme de lesões hansênicas co-expressam altos níveis de CD1a e langerina (Hunger *et al.*, 2004), e reativo *M. leprae*. O principal antígeno apresentado provavelmente é o arabinomicolato, um glicolípido componente da parede celular micobacteriana. A administração de citocinas recombinantes, tais como fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (Kaplan *et al.*, 1992) e IL-2 (Kaplan *et al.*, 1989) em lesões LL tem sido mostrado induzir uma infiltração de células de Langerhans para dentro dos sítios.

C. Receptores de Reconhecimento de Padrão

Durante a resposta imune inata, nos sítios de exposição inicial, padrões moleculares associados aos patógenos, presentes na superfície de muitos microrganismos, são reconhecidos basicamente por três categorias de receptores de reconhecimento de padrão. Uma categoria desses receptores contém lectinas tipo C dependente de cálcio, as quais ligam carboidratos específicos de patógenos, facilitando sua internalização, processamento antigênico e apresentação (Allavena *et al.*, 2004). Uma segunda categoria é formada pelos

receptores Toll like. Tais receptores podem disparar a liberação de produtos antimicrobianos, os quais exercem ataque preliminar contra vários patógenos, bem como sinalizam a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de citocinas, induzindo por sua vez o sistema imune adaptativo (Underhill *et al.*, 1999; Brightbill *et al.*, 1999; Kang & Chae, 2001). A terceira classe é formada pelos receptores do complemento (Schlesinger & Horwitz, 1991).

D. Receptores de lectina tipo C

O receptor de manose (também chamado CD206), um receptor pertencente à superfamília das lectinas tipo C, liga motivos carboidratos sobre uma variedade de patógenos (Allavena *et al.*, 2004). Ele é expresso primariamente sobre células da linhagem mielóide, especialmente macrófagos maduros, embora nenhum sobre monócitos, e sobre algumas sub-linhagens de células dendríticas. Os macrófagos têm mostrado exercer um papel no reconhecimento da micobactéria virulenta (Schlesinger, 1993), e um principal ligante micobacteriano é, provavelmente, o lipoarabinomannana (Prigozy *et al.*, 1997) a qual está sobre cepas virulentas de *M. tuberculosis* bem como do *M. leprae*, que contém *caps* de manose terminal sobre a arabinose e cadeia lateral da molécula. Mannose-capped de lipoarabinomannana pode modular várias funções efetoras da fagocitose mononuclear, incluindo TNF- α , prostaglandina E2, e produção de nitrito (Barnes *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1993, Anthony *et al.*, 1994), bem como macrófagos ativados para capacidade microbicida (Adams *et al.*, 1993).

Tem sido também relatado que a percepção da micobactéria via receptor de manose não produz uma explosão respiratória (Astarie-Dequeker *et al.*, 1999). Outro tipo de lectina tipo C é a *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin*, DC-SIGN, também chamada CD209. A DC-SIGN é expressa sobre células dendríticas e também reconhece patógenos via ligamentos de estruturas contendo manose (van Kooyk & Geijtenbeek, 2003). Em estudos usando *M. tuberculosis*, DC-SIGN foi mostrada ser o maior receptor sobre a DC para o bacilo, com receptores do complemento e receptores de manose exercendo um papel menor (Tailleux *et al.*, 2003). Novamente, o ligante primário micobacteriano para DC-SIGN foi a mannose-capped lipoarabinomana (Maeda *et al.*, 2003; Tailleux *et al.*, 2003; van Kooyk & Geijtenbeek, 2003; Koppel *et al.*, 2004). Alguns pesquisadores têm proposto que a micobactéria virulenta possa subverter a função da DC via DC-SIGN pela supressão da maturação da DC, possivelmente através da inibição da produção de IL-12 (Nigou *et al.*, 2001) e a indução de IL-10 (Geijtenbeek *et al.*, 2003). O comprometimento da DC-SIGN pode também inibir a sinalização do TLR (van Kooyk & Geijtenbeek, 2003).

E. Langerina

A Langerina (CD207) é um receptor de reconhecimento de padrão tipo-C expressado pelas células de Langerhans. Esse receptor oligomeriza-se em trímeros na superfície da célula e controla um único reconhecimento de domínio carboidrato cálcio-dependente com especificidade para manose, N-acetilglicosamina e fucose (Kissenpfennig *et al.*, 2005).

A Langerina é necessária na formação de grânulos de Birbeck, estrutura endossomal pentalaminar encontrada exclusivamente nas células de Langerhans. Carboidratos exógenos ligantes são endocitados via langerina e transportados aos grânulos de *Birbeck* para processamento. A langerina pode desempenhar um importante papel no reconhecimento de antígenos micobacterianos não peptídicos (Hunger *et al.*, 2004).

E. Receptores Toll-like (TLRs)

Os TLRs são receptores cruciais para o reconhecimento de patógenos microbianos pelos macrófagos (MΦ) e pelas DC durante a imunidade inata. Esses receptores são proteínas transmembranas, filogeneticamente conservados, que contêm motivos ricos em leucina, repetidos em seu domínio extracelular. Seu domínio citoplasmático de sinalização está relacionado ao receptor de IL-1 associado à quinase que ativam fatores de transcrição, tais como NF-κβ, para induzir a produção de citocinas (Brightbill *et al.*, 1999).

Dez TLRs têm sido identificados, dos quais o heterodímero TLR2-TLR1, o homodímero TLR2, e TLR4 são fundamentais no reconhecimento de micobactérias. Um trabalho recente tem demonstrado a importância dos TLRs no reconhecimento e na subsequente resposta imune contra o *M. leprae*, particularmente através das DC (Kang & Chae, 2001). Além disso, os TLRs são necessários para uma produção ótima de IL-12 (Brightbill *et al.*, 1999), citocina pró-inflamatória responsável pela indução da imunidade tipo Th-1, bem como TNF-α (Underhill *et al.*, 1999).

O estudo de biopsias tem revelado que monócitos e células dendríticas nas lesões tuberculóides expressaram muito mais receptores Toll-like TLR1 e TLR2 do que nas lesões lepromatosas (Krutzik *et al.*, 2003). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que lipoproteínas de 19-kDa e 33-kDa do *M. leprae* poderia ativar monócitos e células derivadas de monócitos através do TLR2.

O perfil de citocinas presentes nas lesões também parece estar correlacionado com a função do TLR: citocinas tipo Th-1 estão geralmente associadas com ativação de TLR1 e TLR2, e citocinas tipo Th-2 com a inibição da ativação. De forma interessante, citocinas específicas poderiam regular o TLR através de dois mecanismos independentes *in vitro*, via modulação da expressão de TLR ou pela influência na ativação do TLR.

F. Receptores C.

Schlesinger & Horwitz (1991) estabeleceram que os receptores do complemento 1 e 3 presentes na superfície de monócitos, bem como os receptores CR1, CR3, e CR4 nos macrófagos são mediadores chave para a fagocitose do *M. leprae*. Além disso, o reconhecimento do PGL-1, um dos maiores glicolipídios de superfície do *M. leprae*, é facilitado pelo componente do complemento C3. Sendo que o reconhecimento via receptores do complemento não produz uma explosão respiratória, funcionando assim, como mecanismo pelo qual a micobactéria patogênica evita os radicais tóxicos do oxigênio, gerados durante a fagocitose.

1.2.1. Resposta Imune Adaptativa

A. Paradigma imunológico.

A forma TT da hanseníase é o resultado da elevada imunidade mediada por células com potente resposta imune tipo Th1. Já a forma LL, entretanto, é caracterizada pela baixa imunidade mediada por células com uma resposta Th2 humoral (Modlin, 1994). Assim, dependendo da sub-população de células T em atividade, durante o processo inflamatório, haverá predominância de mecanismos de defesa ou de disseminação da doença (Figura 5).

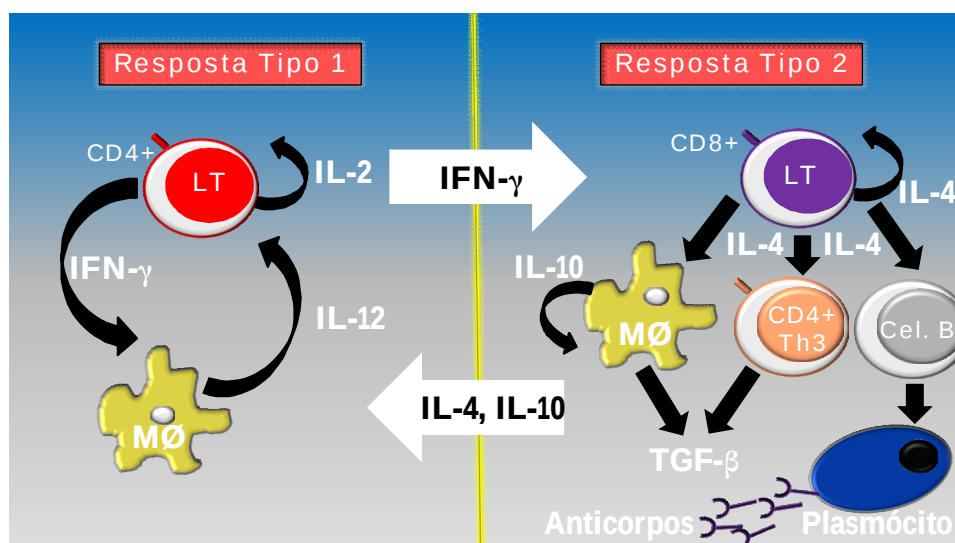


Figura 5: Paradigma imunológico da hanseníase. *Resposta Tipo 1:* Imunidade mediada por células com uma potente resposta imune tipo Th1, verificado nas formas de maior resistência. *Resposta Tipo 2:* imunidade mediada por células com uma resposta Th2 humoral verificado nas formas de menor resistência. Fonte: Goulart, 1995. Adaptado de Modlin & Bloom 1993.

B. Defesa e/ou resistência.

As defesas contra a infecção estão relacionadas à presença de TNF- α e à produção de mediadores de oxidação, tais como reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), elementos fundamentais para a destruição bacilar intramacrofágica. Na forma TT, o IFN- γ , IL-12 e linfotóxina- α são secretados nas lesões e estes resultam na intensa atividade fagocítica (Spellberg & Edwards, 2001).

Macrófagos sob a influência de citocinas, particularmente TNF- α juntamente com linfócitos, formam os granulomas (Algood *et al.*, 2005). Células T CD4⁺ são encontradas principalmente dentro de granulomas e células T CD8⁺ na área do manto que os cercam (Modlin *et al.*, 1988). As células T nos granulomas TT produzem a proteína granulinsina antimicrobiana (Ochoa *et al.*, 2001).

A forma LL da hanseníase é caracterizada por fraca formação de granuloma. A produção mRNA é predominantemente para citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (Yamamura *et al.*, 1991). A IL-4 tem sido demonstrada inibindo os TLR2 sobre os monócitos (Brightbill *et al.*, 1999), e IL-10 suprimindo a produção de IL-12 (Libraty *et al.*, 1997). Isso está relacionado com a predominância de linfócitos T CD8⁺ nas lesões lepromatosas. A parte *borderline* do espectro é imunologicamente dinâmica, e movimenta-se entre as duas formas polares. Estas mudanças na resposta imunológica fundamentam as reações que são características do estado *borderline*.

O balanço e interação complexa das citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, seus receptores e as células do sistema imune inato e adaptativo,

conjuntamente, formarão uma rede complexa que irá caracterizar a resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente a evolução clínico-patológica da doença.

Estudos usando técnicas imunohistoquímicas indicam diferentes populações de células T em lesões nas diversas formas clínicas de hanseníase. Tais dados mostram que em lesões TT, a população CD4 predomina com uma taxa CD4:CD8 de 1,9:1, enquanto em lesões LL a população CD8 predomina com uma taxa CD4:CD8 de 0,6:1 (Goulart *et al.*, 2002).

Também se verifica diferença na taxas CD4:CD8 quando se compara o sangue periférico com as lesões dos pacientes hansenianos. Segundo Goulart *et al.* (2002), o fato sugere alguma migração seletiva para dentro das lesões, proliferação ou mesmo retenção nas lesões.

Enquanto a taxa CD4:CD8 é 2:1 em ambos, no sangue e nas lesões de pacientes TT, a população de células T no tecido não representa um filtrado aleatório do sangue. A taxa T-memória:T-naive é 1:1 no sangue mas, 14:1 nas lesões, isto é, as células CD4+ nas lesões TT expressam fenótipo T memória (CD45RO+). Ao contrário, nas lesões LL, a metade das células CD4+ pertencem à subclasse de células T-naive. A maioria das células CD8+ que infiltram as lesões lepromatosas é de fenótipo CD28-, indicando que são células T supressoras, enquanto células de fenótipo T citotóxico (CD28+) predominam nas lesões tuberculóides (Goulart *et al.*, 2002).

1.2.3 Atividade microbicida do macrófago (MΦ) contra o *M. leprae*

Embora a viabilidade do *M. leprae* seja confirmada em MΦ de ratos normais, os MΦ ativados por IFN-γ podem inibir ou destruir o *M. leprae in vitro* (Ramasesh *et al.* 1991). Estes achados confirmam que em MΦ normais, a fusão do fagolisossomo com lisossomo é bloqueada pela sobrevivência, não pela morte do *M. leprae* (Sibley *et al.*, 1987) e, mais importante, que em MΦ ativados, os fagossomos fundidos com lisossomos secundários abrigam *M. leprae*. Duas importantes vias antimicrobianas pelas quais os MΦ podem inibir ou destruir patógenos invasores são: a geração de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio.

A respeito da fagocitose de microrganismos por MΦ, esta conduz a uma explosão respiratória na qual existe um grande aumento no consumo do oxigênio catalisado pela NADPH oxidase e a produção de superóxido. Outros intermediários reativos do oxigênio, incluindo o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e o oxigênio singleto, são subsequente gerados. Estes produtos tóxicos do oxigênio são importantes mecanismos de defesa antimicrobianos de células fagocitárias, especialmente contra patógenos extracelulares. O *M. leprae*, entretanto, é apenas um fraco estímulo à explosão oxidativa dos MΦ (Holzer *et al.*, 1986), possivelmente devido diminuição na geração de superóxido pelo PGL-1 (Chan *et al.*, 1989). O *M. leprae* também possui uma superóxido dismutase (Thangaraj *et al.*, 1990) e expressa ambas SodC e SodA detectadas por RT-PCR (Williams *et al.*, 2004). Assim, o bacilo da hanseníase parece ser bem equipado

para lidar com os reativos intermediários do oxigênio gerados pelos MΦ hospedeiros.

Os intermediários reativos do nitrogênio, principalmente, o óxido nítrico, são derivados do nitrogênio devido uma alta produção da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) produzida pelo MΦ ativados. A habilidade dos MΦ murinos ativados para inibir a atividade metabólica do *M. leprae* é dependente da geração de tais intermediários, como os MΦ ativados cultivados na presença de inibidores competitivos da enzima, tais como L-monometilarginina ou aminoguanidina, não possuindo efeito prejudicial sobre o metabolismo bacteriano (Adams *et al.*, 1991).

Vários estudos têm mostrado que a iNOS é expressada, como detectado por imunohistoquímica, em sítios da doença em pacientes infectados com patógenos intracelulares, incluindo *M. leprae*. Khanolkar-Young *et al.* (1998), usando anticorpos contra iNOS, encontrou-se que a iNOS era altamente expressada nas lesões de pacientes com hanseníase TT e era aumentado para altos níveis durante a reação reversa. Além disso, os níveis de iNOS decresciam durante o curso do tratamento com prednisolona (Little *et al.*, 2001).

Por causa da detecção da iNOS por imunohistoquímica não necessariamente indicar a produção atual de intermediários reativos do nitrogênio, lesões tem sido também marcadas para nitrotirosina, o produto final estável da nitrosilação de resíduos de tirosina em proteínas pelo peroxinitrito (Schon *et al.*, 2001). Foi encontrado que a iNOS e nitrotirosina eram expressadas em pacientes *borderline* ambos com e sem reação reversa. Além disso, níveis elevados de nitratos foram medidos na urina dos pacientes experimentando reações reversas,

e estes níveis diminuíram sob tratamento de altas doses de prednisolona (Schon *et al.*, 2001).

1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA APOPTOSE

1.3.1 O fenômeno de Apoptose

Apoptose é processo altamente regulado de morte celular com papel fundamental na manutenção da homeostasia tecidual no organismo adulto. Verifica-se na maioria das células de forma constitutiva, podendo ser ativado por uma série de sinais extrínsecos e intrínsecos (Fadeel & Orrenius, 2005).

Observada em todos os seres multicelulares, desde um nematódeo até um mamífero, o fenômeno de apoptose tem sido altamente conservado pela evolução (Fadeel & Orrenius, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006). É importante no desenvolvimento embrionário, na renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos femininos, na atrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou hormônios, na involução de alguns órgãos e ainda na regressão de tumores.

Difere da necrose que é caracterizada como uma catástrofe bioenergética patológica resultante da depleção de ATP, envolvendo mais rapidamente, a desintegração de organelas celulares, a ruptura da membrana plasmática com inflamação e liberação do conteúdo de lisossomos, moléculas pró-inflamatórias e conteúdo celular em resposta a induções não-fisiológicas, tais como choques hipnóticos, hipertermia, hipoxia, trauma, e acumulação de substâncias tóxicas no organismo (Chowdhury *et al.*, 2006).

Segundo revisão dos autores Yan e Shi (2005), a apoptose pode ser disparada por duas vias: uma via extrínseca e outra intrínseca. A primeira envolve

a estimulação de receptores de morte por ligantes externos, enquanto a segunda surge no interior das células envolvendo as mitocôndrias. Ambas as vias ativam enzimas denominadas caspases iniciadoras que por sua vez ativam uma via final de caspases efetoras (Fadeel & Orrenius, 2005).

Participam da via extrínseca receptores “ocultos” na membrana plasmática da maioria dos tipos celulares. São membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, que atuam como receptores de morte (Fadeel & Orrenius, 2005; Watts, 2005). Os membros importantes dessa família são: TNFR-1, CD95, aka, Fas ou APO-1. Cada receptor possui um domínio de morte na sua cauda citoplasmática. A estimulação dos receptores por um ligante externo, como o próprio TNF- α ou TRAIL, induz a sua trimerização e recrutamento de uma proteína adaptadora que se complexa ao trímero através de sua associação com os domínios de morte. Os complexos resultantes ativam a caspase-8, uma caspase iniciadora, que por sua vez ativa as caspases efetoras, tais como a caspase-3.

Já a via intrínseca ou mitocondrial pode ser solicitada através de duas maneiras principais: lesão de DNA e retirada da ação de fatores de sobrevivência celular. Na presença de lesão de DNA, cujo reparo não é possível, a proteína p53 ativa uma sub-via envolvendo a via p21 e membros pró-apoptóticos da família da proteína Bcl-2. Além dessas entidades pró-apoptóticas, esta família possui membros anti-apoptóticos. Encontram-se na superfície das mitocôndrias e competem entre si. O ramo pró-apoptótico da família (p.ex. Bax) promove a liberação do *citocromo c* das mitocôndrias, enquanto o ramo anti-apoptótico inibe

este processo. O *citocromo c* é liberado e forma um complexo com uma proteína denominada Apaf-1 (fator de ativação de protease apoptotico 1) e os dois combinam-se então com a pró-caspase-9 ativando-a. Esta última enzima ativa a via efetora de caspases. Os três componentes, citocromo c, Apaf-1 e pró-caspase-9 formam uma estrutura denominada de apoptossomo (Fadeel & Orrenius, 2005).

Durante a morte celular por apoptose, várias alterações morfológicas são verificadas: a célula torna-se redonda, a cromatina no núcleo condensa-se em massas e ocorre contração do citoplasma. Posteriormente, ocorre vesiculação na membrana plasmática e, por fim, transformação da célula num agregado de entidades delimitadas por membranas, que são rapidamente fagocitadas por macrófagos (Fadeel & Orrenius, 2005; Chowdhury *et al.*, 2006).

1.3.2 Apoptose nas Doenças Infecciosas

A apoptose pode atuar como mecanismo de controle das respostas imunes, uma vez que na fase de declínio da resposta participa da eliminação dos linfócitos que sofreram expansão clonal. Também funciona como mecanismo de eliminação de células infectadas por patógenos sem ocorrência de danos ao hospedeiro (Fadeel & Orrenius, 2005).

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 caracteriza-se numa ferramenta de subversão do sistema imune pelo patógeno, possibilitando 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. Já 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.

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- α 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.

Corroborando este 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 um perfil gênico que favorecia a apoptose, o que foi inibido pela adição de anticorpos anti-TNF- α 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 (Keane *et al.*, 2000; Spira *et al.*, 2003).

Alternativamente, a indução de apoptose pode prejudicar a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para o sucesso da infecção. Badley *et al.* (1996), por exemplo, relataram que a infecção de macrófagos pelo HIV levava a um aumento da expressão de FAS-L. Este promoveria a apoptose de linfócitos T não-infectados que expressam o receptor FAS, contribuindo para o quadro de imunodeficiência. Deste modo, o significado da ocorrência de apoptose num processo infeccioso depende do momento e do tipo celular envolvido.

1.3.1 Apoptose na Hanseníase

Na hanseníase, o significado da apoptose é ainda pouco entendido. O primeiro estudo sobre o fenômeno 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 com 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 na 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- α 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 a apoptose atuando como um mecanismo de contenção da multiplicação bacilar.

Tendo em vista que ao contrario do *M. tuberculosis*, o *M. leprae* apresenta baixa variabilidade (Monot, 2005), é possível que as diferenças observadas entre pacientes pauci e multibacilares sejam decorrentes de características próprias do indivíduo e estejam ligadas polarização da resposta.

Mustafa *et al.* (2001) verificaram que em lesões de pacientes multibacilares, os macrófagos que apresentavam altos níveis de antígenos micobacterianos 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.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Avaliar a correlação entre a atividade de macrófagos e a ocorrência de apoptose a fim de verificar possíveis implicações no controle da resposta imunológica, em leões de pele de pacientes com formas polares da hanseníase.

1.4.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar se há diferença na atividade de macrófagos em lesões de pele de pacientes com as formas polares tuberculóide (TT) e virchowiana (LL), através da imunomarcacão da lisozima, iNOS e CD68.
- 2) Verificar se há diferença na taxa de apoptose em ambos os pólos, TT e LL, através da imunomarcacão da caspase-3.
- 3) Avaliar se há correlação entre atividade macrofágica e apoptose nos pólos TT e LL.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para realização deste estudo, foi obtida aprovação do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará – NMT e do Comitê de Ética em Pesquisa do NMT (nº 167/2005).

Foi realizado estudo do tipo transversal retrospectivo baseado na avaliação de amostras histopatológicas provenientes do Laboratório de Citopatologia e Patologia do NMT de pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia deste Núcleo, com diagnóstico clínico-laboratorial de Hanseníase, de acordo com a classificação de Ridley-Jopling.

Foram selecionados para o estudo um total de 29 pacientes deste núcleo, com idade entre 24 e 45 anos, sendo 7 do sexo feminino e 22 do masculino, com 13 pertencendo à forma clínica tuberculóide e 16 à virchowiana.

As biopsias foram colhidas após anestesia no local das lesões selecionadas com punch no. 3 e emblocadas em parafina. Já emblocado, o material foi submetido à microtomia obtendo-se cortes com espessura de 5 µm, sendo posteriormente submetido ao estudo morfológico com a coloração hematoxina-eosina e à marcação com a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos específicos contra CD68 (Gordon, 1999; Moura *et al.*, 2007; Gottfried *et al.*, 2008) iNOS (Khanolkar-Young *et al.*, 1998; Adams, *et al.*, 2000) e lisozima, para atividade de macrófago; e contra caspase 3 (Gown & Willingham, 2002) para apoptose.

2.2 MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO

Foi utilizado o método imunohistoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês *Streptavidin-Biotin Peroxidase*) (Hsu *et al.*, 1981, Dodson, 2002). 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 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 anti-lisozima, anti-iNOS e anti-caspase-3, 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 foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos e 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.

2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA

Os cortes imunomarcados foram avaliados em microscópio Nikon Eclipse E200 em aumento de 400x. Foram analisados 5 campos microscópicos por biopsia, utilizando-se para tal, graticulo graduado com 10 x 10 subdivisões e com 0,0625 mm de área. Foram consideradas positivas as células que apresentaram imunomarcacão acastanhada característica e inequívoca resultante da precipitação do cromógeno nas áreas positivas.

2.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL e analisados usando os programas BIOSTAT 4.0, sendo apresentados sob forma de gráficos. Para analisar as diferenças encontradas na variável atividade de macrófago e na variável apoptose, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney e para verificar a correlação entre estas amostras utilizou-se a Correlação linear de Spearman. O nível de significância adotado foi de 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFÁGICA

3.1.1 Imunomarcção da iNOS

Em relação à variável atividade de macrófago, avaliada pela imunomarcção da enzima oxido nítrico sintetase induzível (iNOS), verificou-se para o grupo de lesões TT uma média de 118,4 células com desvio padrão de 69,79 e para o grupo de lesões LL uma média de 118,62 células com desvio padrão de 49,56 e $P = 0,496$ (Figuras 6 e 7).

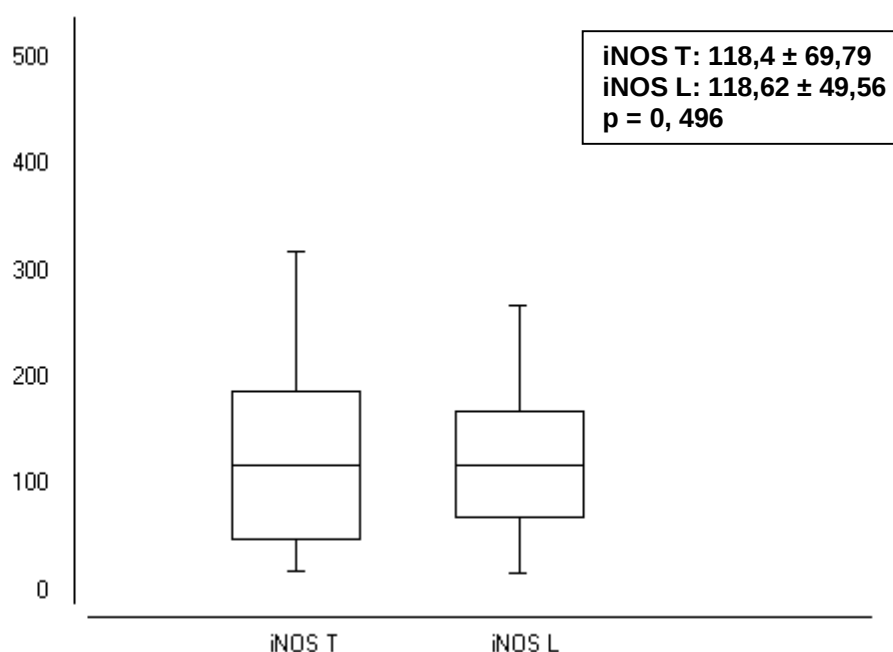


Figura 6: Média e desvio padrão do grupo iNOS TT e iNOS LL no estudo sobre a atividade macrofágica *in situ* nas formas polares da hanseníase.

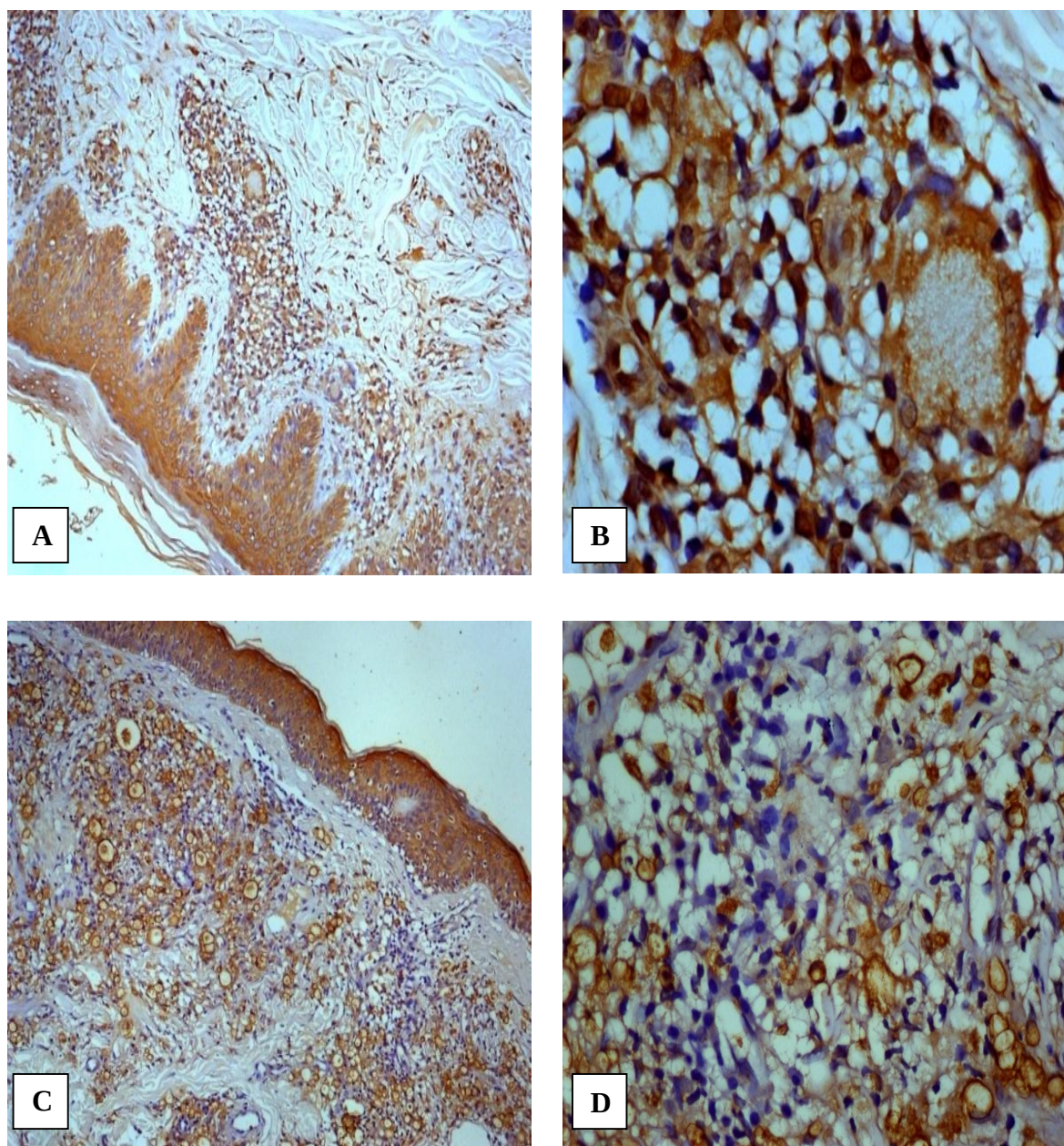


Figura 7: Imunohistoquímica para iNOS em lesão do grupo TT em aumento 200x (A) e em aumento de 400x mostrando macrófagos e células gigantes no granuloma (B); imunohistoquímica para iNOS em lesão do grupo LL em aumento de 200x (C) e em aumento de 400x (D).

3.1.2 Imunomarcção da Lisozima

De forma semelhante, os dados referentes à variável atividade de macrófago, imunomarcada para lisozima, não mostraram diferença significativa em ambos os grupos de lesões. No grupo de lesões TT, a média foi de 68, 16 células com desvio padrão de 44, 57. Enquanto que no grupo LL a media foi de 73, 95 células com desvio padrão de 64, 55 com $p = 0,817$ (Figura 8 e 9).

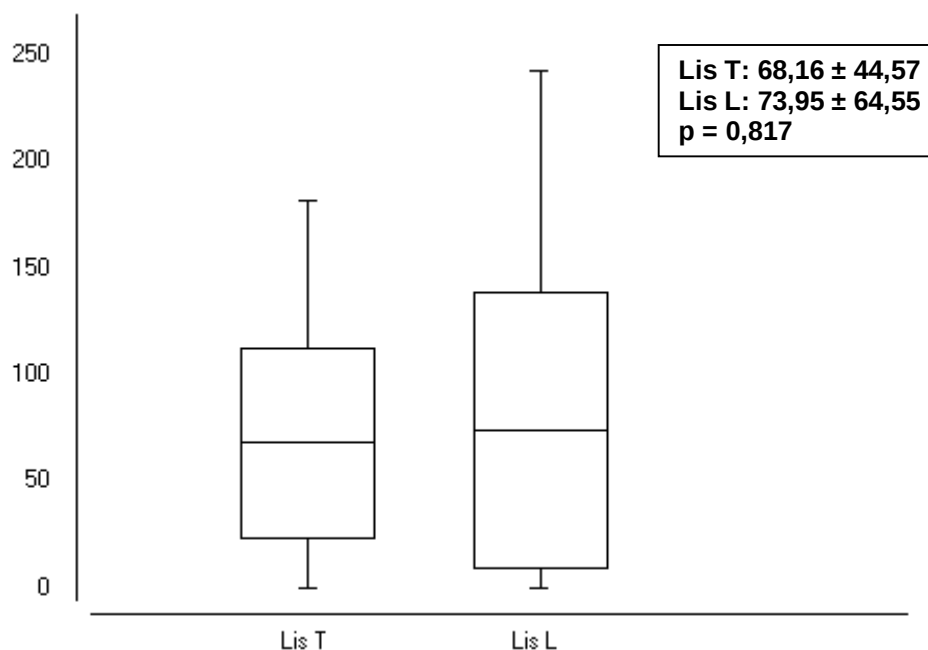


Figura 8: Média e desvio padrão do grupo Lisozima TT e do grupo Lisozima LL no estudo sobre a atividade macrofágica *in situ* nas formas polares da hanseníase.

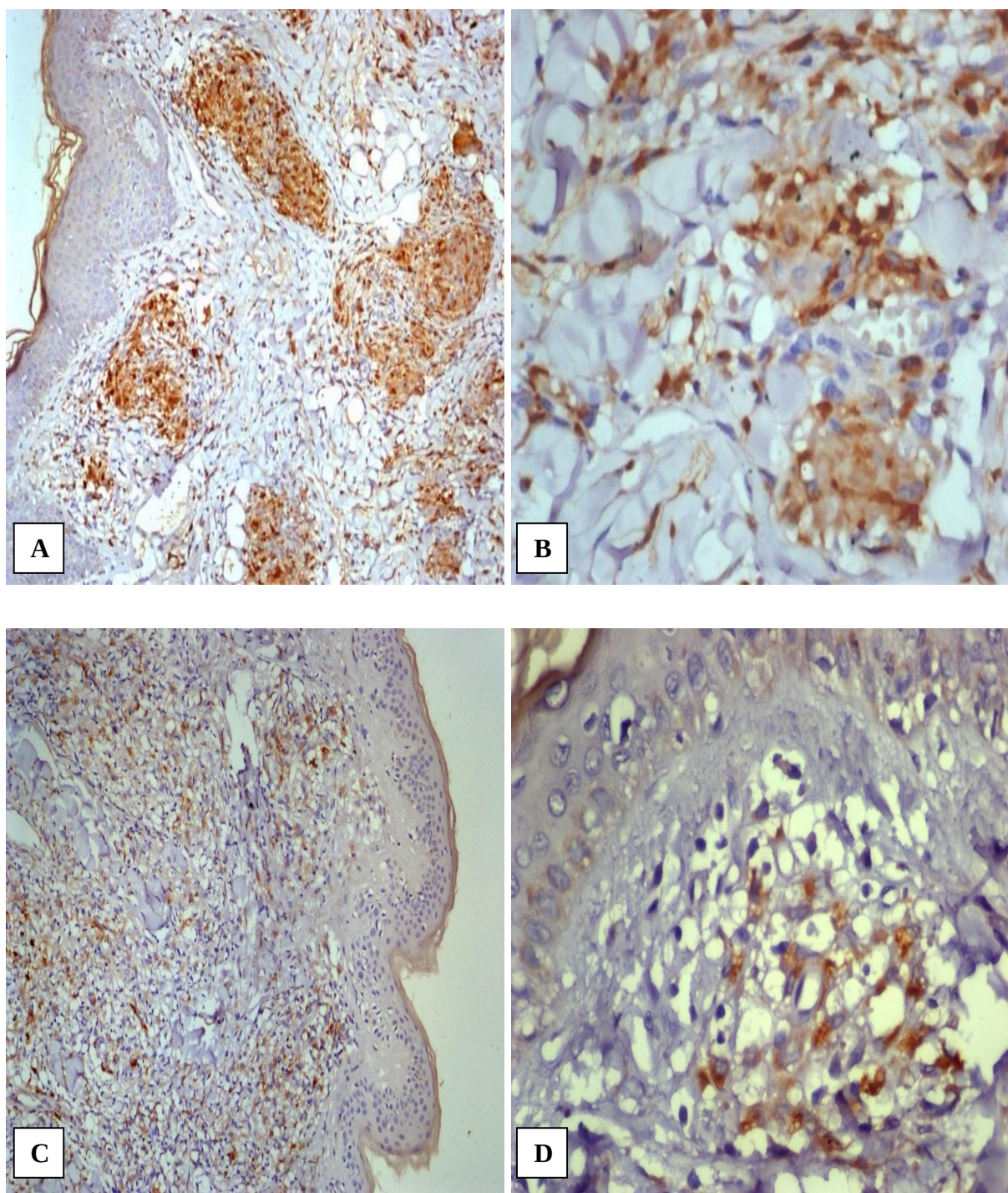


Figura 9: Imunohistoquímica para lisozima em lesão do grupo TT em aumento de 200x **(A)** e em aumento de 400x **(B)**; imunohistoquímica para lisozima em lesão do grupo LL em aumento de 200x **(C)** e em aumento de 400x **(D)**.

3.1.3 Imunomarcção da CD68

Ainda em relação à variável atividade de macrófagos, agora imunomarcada pela molécula CD68, obteve-se para o grupo de lesões TT uma media de 61,90 células com desvio padrão de 28,83, enquanto nas lesões do grupo LL a média foi de 78,07 células com desvio padrão de 69,99 e $P = 0,949$ (Figura 10 e 11).

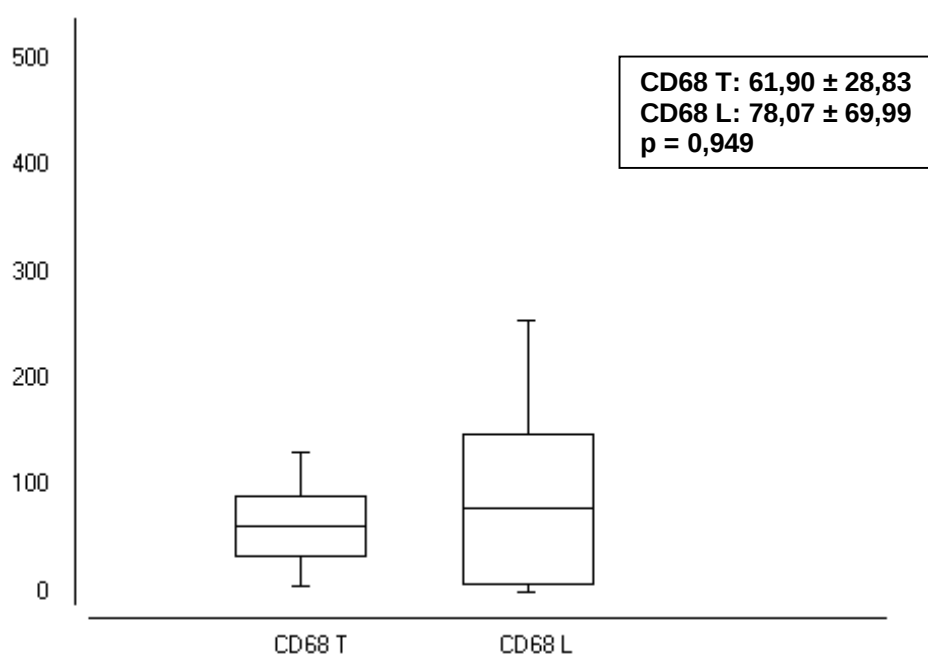


Figura 10: Média e desvio padrão do grupo CD68 TT e CD68 LL no estudo sobre a atividade macrofágica *in situ* nas formas polares da hanseníase.

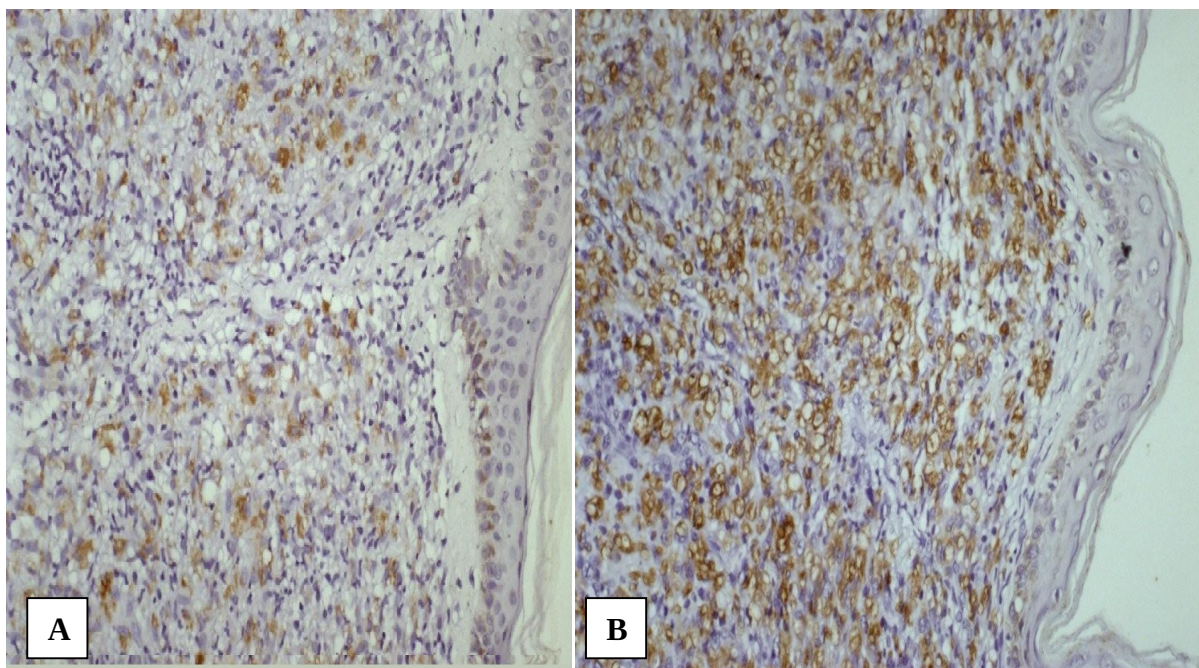


Figura 11: Imunohistoquímica para CD68 em lesão do grupo TT em aumento de 200x **(A)**; Imunohistoquímica para CD68 em lesão do grupo LL em aumento de 200x **(B)**.

3.2 DA AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

3.2.1 Imunomarcção da caspase 3

Ao analisar a variável apoptose, utilizando-se da caspase 3 como marcador, obteve-se uma média de 0,37 células com desvio padrão de 0,85 em lesões do grupo TT e uma média de 5,83 células com desvio padrão de 3,37 em lesões do grupo LL, com $p < 0,0001$, demonstrando diferença altamente significativa (Figura 12 e 13).

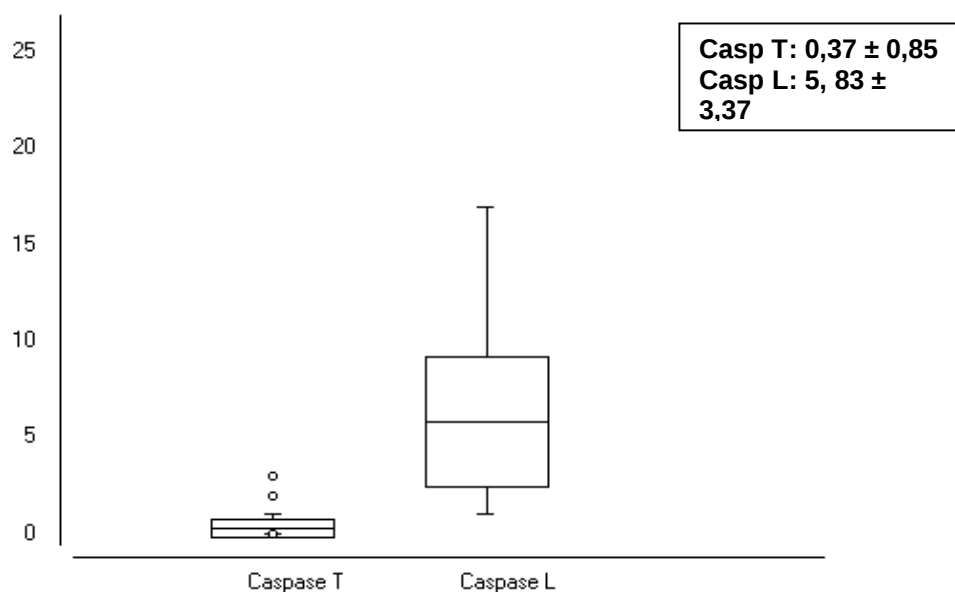


Figura 12: Média e desvio padrão do grupo Caspase TT e grupo Caspase LL na avaliação da ocorrência de apoptose em lesões de pele de pacientes com formas polares da hanseníase.

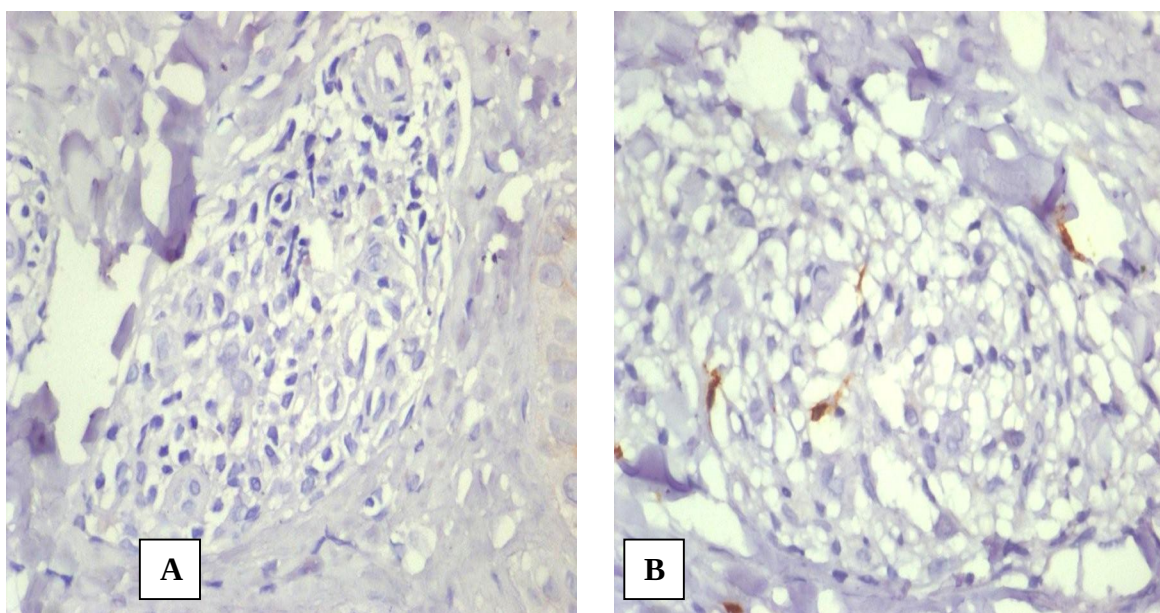


Figura 13: Imunohistoquímica mostrando presença de células apoptóticas em lesões do grupo TT em aumento de 200x **(A)**; imunohistoquímica mostrando presença de células apoptóticas em lesão do grupo LL em aumento de 200x **(B)**.

3.3 DA CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE MACROFÁGICA E APOPTOSE

3.3.1 CD68 e caspase 3 no grupo TT

Na avaliação da correlação entre CD68 e caspase 3 no grupo TT obteve-se $p = 0,0714$ e $r_s = -0,225$ (Figura 14).

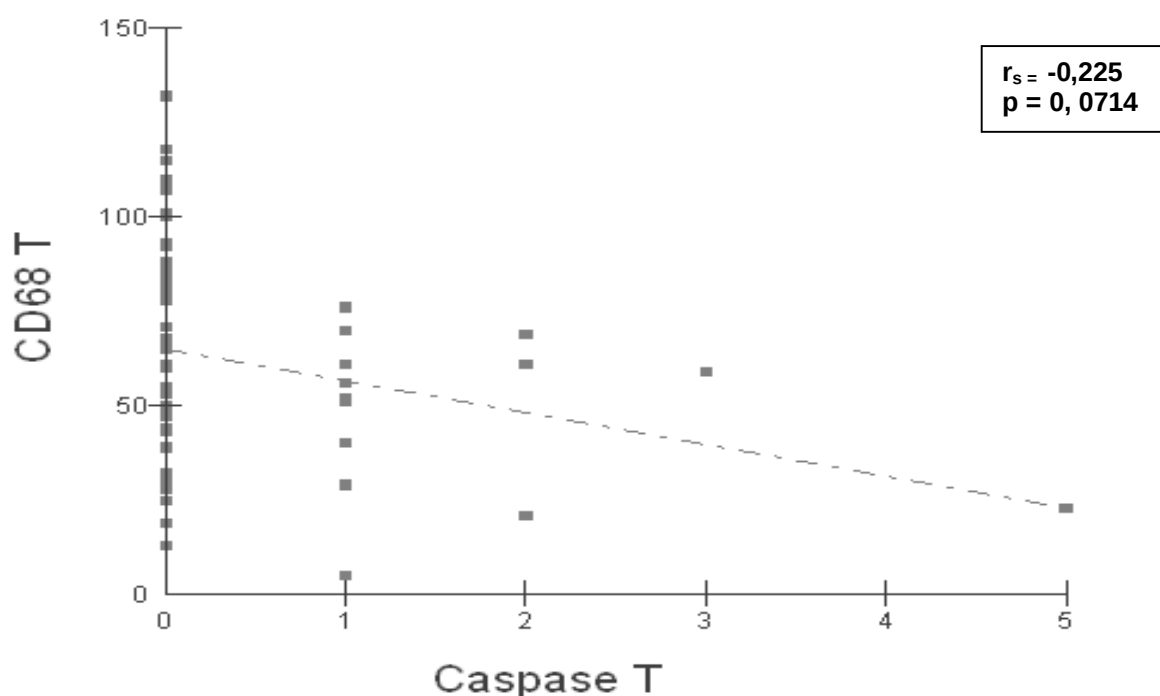


Figura 14: Correlação linear negativa entre atividade de macrófago (CD68) e apoptose (Caspase 3) para o grupo TT.

3.3.2 Lisozima e caspase 3 no grupo TT

A figura 15 demonstra uma correlação linear positiva estatisticamente significativa entre atividade de macrófagos e apoptose ($r_s = 0,3197$ e $p = 0,0094$). À medida que se intensifica a atividade macrofágica (marcada no experimento pela

lisozima), aumenta-se a taxa de apoptose (marcada pela caspase 3) no infiltrado celular nas lesões de pele do grupo TT.

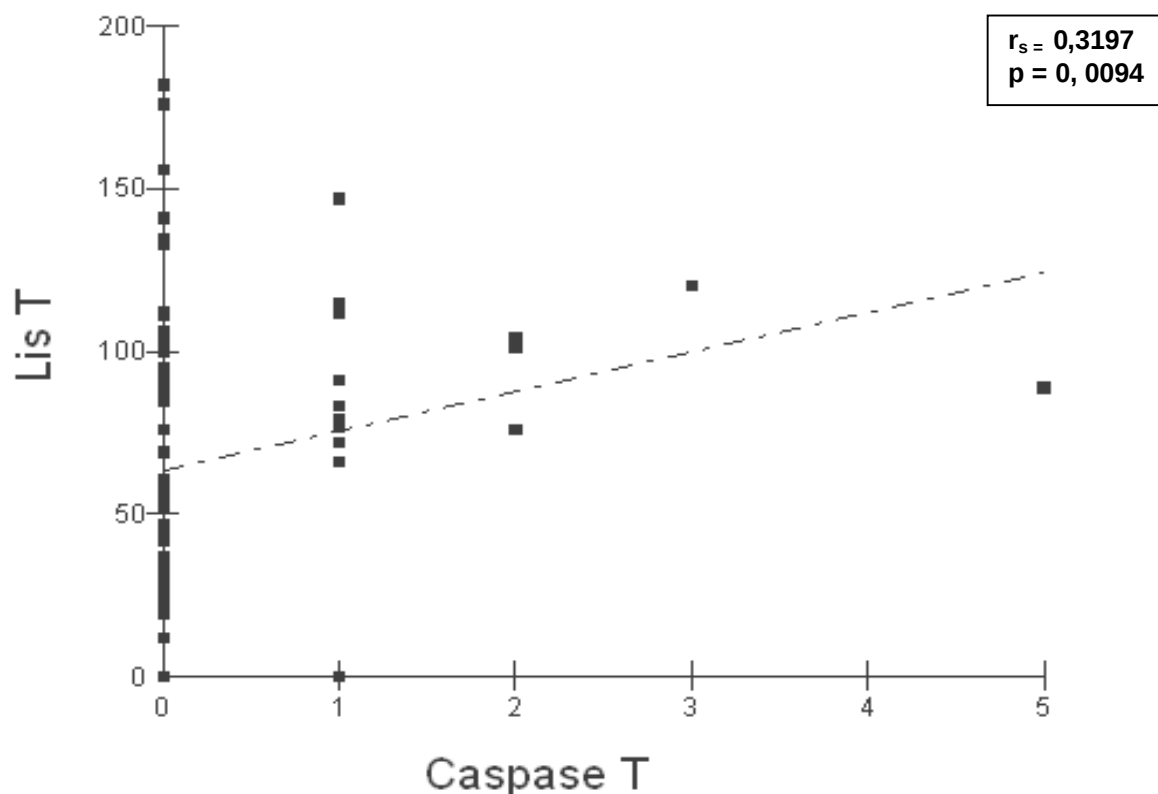


Figura 15: Correlação linear positiva entre atividade macrofágica (lisozima) e apoptose (caspase 3) para o grupo TT.

3.3.3 iNOS e caspase 3 no grupo TT

A figura 16 evidencia uma correlação linear positiva com $r_s = 0,226$ entre atividade de macrófago, marcada pela enzima iNOS, e apoptose, marcada pela caspase 3. Todavia o resultado não é estatisticamente significativo, pois $p = 0,095$.

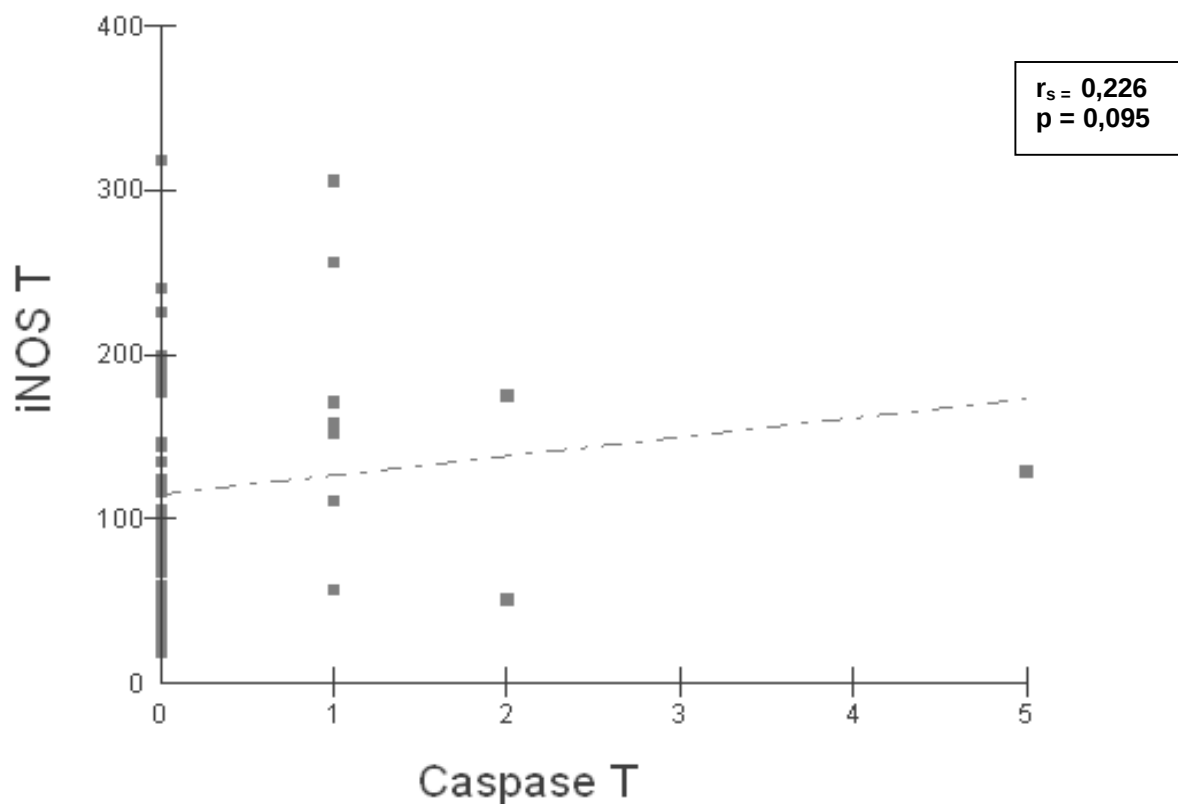


Figura 16: Correlação linear positiva entre atividade de macrófago (marcada pela iNOS) e apoptose (marcada pela caspase 3) para grupo de lesões TT.

3.3.4 iNOS, lisozima e CD68 com a caspase 3 no grupo LL

Em todas as lesões do grupo LL, a atividade de macrófago, imunomarcada pela iNOS, lisozima e CD68, não apresentam correlação estatisticamente significativa com apoptose, marcada pela caspase 3 (Figuras 17 a 19).

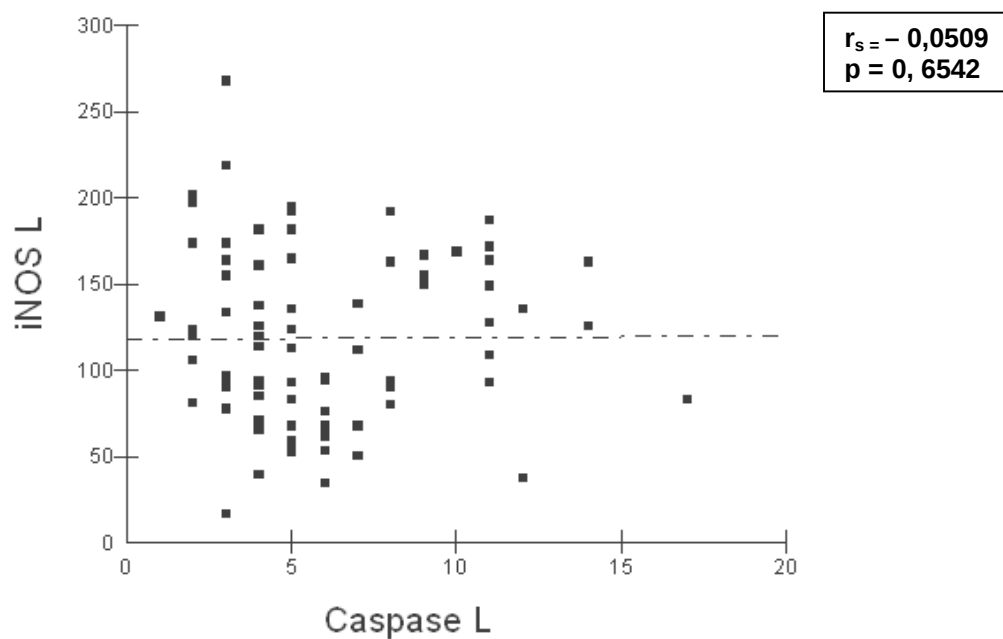


Figura 17: Correlação linear entre atividade de macrófago (marcada pela iNOS) e apoptose (marcada pela caspase 3) nas lesões de pele do grupo LL.

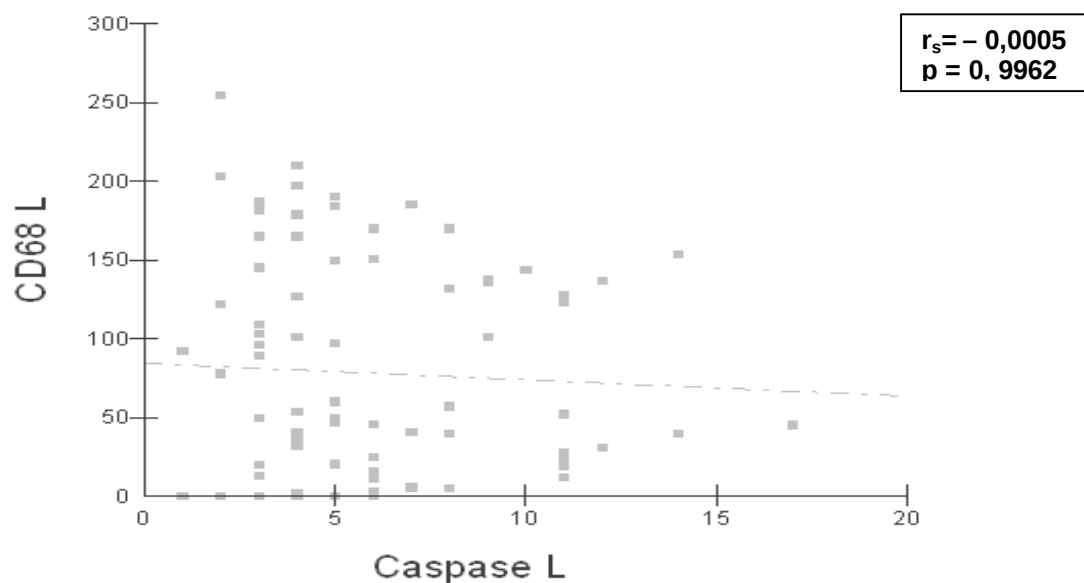


Figura 18: Correlação linear entre atividade de macrófago (marcada pelo CD68) e apoptose (marcada pela caspase 3) nas lesões de pele do grupo LL.

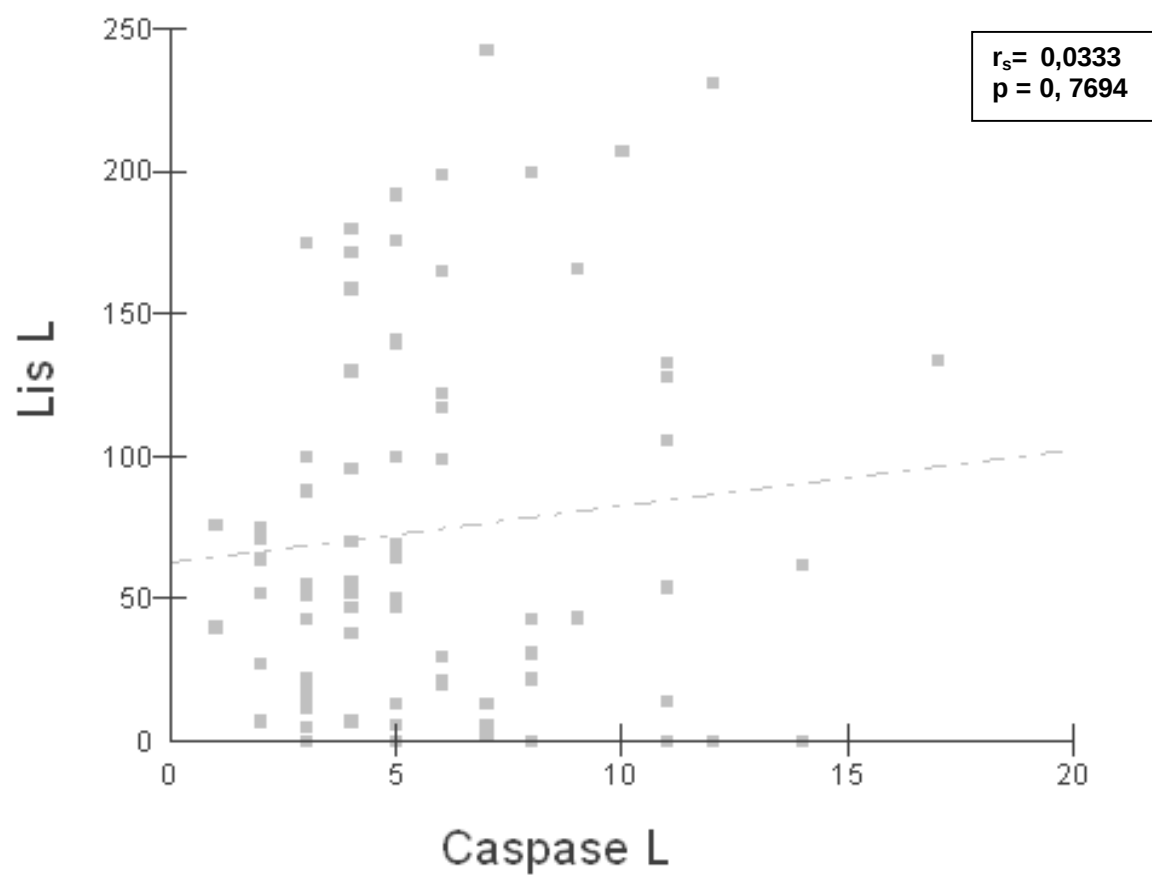


Figura 19: Correlação linear positiva entre atividade de macrófago (marcada pela Lisozima) e apoptose (marcada pela caspase 3) no grupo LL.

5 DISCUSSÃO

Importante na manutenção da homeostasia celular de organismos multicelulares, a apoptose é sabida estar envolvida na fisiopatologia de várias doenças quando desregulada, tais como doenças auto-imunes, câncer e infecções virais (Solary *et al.*, 1996). Entretanto, são poucos os trabalhos, a exemplo deste, que estudaram o fenômeno na hanseníase.

Nesta doença, ocorrem lesões tanto de pele quanto neurais, sendo os sintomas neurológicos associados à desmielinização, a qual deve estar ligada a morte das células de Schwann. Alguns trabalhos têm sugerido que a morte celular apoptótica de células hospedeiras, induzida pelo *M. leprae*, deve exercer papel importante na progressão da doença.

O *M. leprae* pode afetar neurônios por causar desmielinização (Rambukkana *et al.*, 2002), porém o envolvimento da apoptose neste processo ainda permanece incerto. Um trabalho mostrou que este bacilo pode causar rápida desmielinização, senão induzir apoptose ou uma resposta imune (Rambukkana *et al.*, 2002). Outro estudo identificou apoptose das células de Schwann durante o curso da infecção. Uma lipoproteína de 19-kDa pode estar envolvida no disparo da morte celular programada das células de Schwann via TLR-2 (Oliveira *et al.*, 2003).

No intuito de compreender melhor os fenômenos fisiopatológicos relacionados ao dano neural na hanseníase e ao controle da resposta imunológica do hospedeiro contra o *M. leprae*, este trabalho avaliou a atividade de macrófagos

e sua implicação na ocorrência de apoptose em lesões de pele de pacientes com formas polares da hanseníase, utilizando-se de uma abordagem imunohistoquímica.

Nesta casuística, observou-se grande diferença entre os grupos de lesões TT e LL, em relação caspase 3 (marcador de apoptose), bem como correlação positiva entre atividade de macrófago e apoptose em lesões de pele dos pacientes TT, levando-se em consideração a lisozima (marcador da atividade de macrófago). O fato pode justificar, em parte, o dano neural ocasionada pela morte das células de Schwann por apoptose nestes pacientes (Lisak *et al*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005).

Trabalhos publicados anteriormente sobre o assunto, utilizando outras metodologias, encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo, como foi o de Cree *et al.*, (1986), verificando corpos apoptóticos dispersos nas lesões virchowianas; Niang *et al.* (1999), observando aumento na taxa de apoptose espontânea em células mononucleares de sangue periférico de pacientes hansenianos pauci ou multibacilares; Hernandez *et al.* (2003), mostrando que a adição de *M. leprae* às culturas promovia aumento na expressão de TNF- α e BAX ao mesmo tempo que elevava a taxa de apoptose de maneira dose-dependente em monócitos de pacientes LL.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Walsh *et al.* (2004) em lesões de pacientes multi e paucibacilares, contudo esses autores verificaram que a apoptose era mais freqüente em pacientes paucibacilares. E por Mustafa *et*

al. (2001) ao verificarem que 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.

Relevante contribuição deste trabalho ocorreu quando se verificou a apoptose sendo influenciada pela atividade *in situ* de macrófagos. Porém, estudos mais pormenorizados, utilizando uma amostra maior, precisam ser conduzidos já que nas lesões do grupo LL não houve correlação estatisticamente significativa e o aumento de apoptose neste grupo poderia ter sido influenciado por outros fatores, como o TGF- β (Oliveira *et al.*, 2005).

Outros trabalhos (Goulart, 1995; Khanolkar-Young *et al.*, 1998; Gantt *et al.*, 2003) corroboram tal tese, uma vez que foi observado, em lesões de pacientes virchowianos e *borderline* lepromatosos (ambos bacilíferos), a produção de intermediários do nitrogênio de forma reduzida ou ausente, o que pode estar relacionado com a presença do TGF- β no infiltrado inflamatório da lesão cutânea.

Apesar do exposto, não podemos descartar a possibilidade da apoptose ter importante papel no controle negativo da resposta imunológica do hospedeiro ao bacilo de hansen, fenômeno este já descrito para outros agentes microbianos, a exemplo do HIV (Badley *et al.*, 1996). Assim, a indução de apoptose em células imunes poderia funcionar como mecanismo de escape do *M. leprae*.

Futuras pesquisas, utilizando-se de uma amostragem maior, ou mesmo de modelos de estudo *in vitro*, contribuirão para melhor entender o papel da apoptose

na indução do dano neural, bem como sua importância como ferramenta de escape imunológico do microorganismo frente à resposta do hospedeiro.

6 CONCLUSÕES

- 1) Não houve diferença quantitativa na atividade de macrófagos entre os grupos de lesões TT e LL, ou seja, o que de fato se verificou não foi uma diferença na quantidade dos macrófagos, e sim na qualidade.
- 2) A apoptose, marcada pela caspase 3, estava mais intensa no grupo de lesões LL;
- 3) No grupo de lesões TT, houve correlação positiva entre atividade macrofágica e apoptose quando avaliada pela marcação de lisozima, o que pode justificar o desenvolvimento de dano neural por apoptose das células de Schwann.
- 4) No grupo de lesões LL, não houve correlação entre atividade de macrófagos e apoptose quando avaliada através da lisozima, iNOS e CD68. Contudo outros fatores, como o TGF- β , podem estar influenciando a indução de apoptose neste grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. L.; JOB, K. C.; KRAHENBUHL, L. J. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Resistance to *Mycobacterium leprae* in Mice. **Infection and Immunity**, **68**: 5462–5465, 2000.
- ADAMS, L. B.; FRANZBLAU, S. G.; VAVRIN, Z.; HIBBS, J. B.; KRAHENBUHL, J. L. L-Arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. **J. Immunol.** **147**:1642–1646, 1991.
- ADAMS, L. B.; FUKUTOMI, Y.; KRAHENBUHL, J. L. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. **Infect. Immun.** **61**: 4173–4181, 1993.
- ALGOOD, H. M.; LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, **41**: 189–93, 2005.
- ALLAVENA, P.; CHIEPPA, M.; MONTI, P.; PIEMONTI, L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. **Crit. Rev. Immunol.** **24**:179–192, 2004.
- ANTHONY, L. S. D.; CHATTERJEE, D.; BRENNAN, P.; NANO, F. E. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* modulates the generation of reactive nitrogen intermediates by gamma interferon-activated macrophages. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **8**:299–306, 1994.

- ARAUJO, M. G. Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 373-82, 2003.
- ASTARIE-DEQUEKER, C.; N'DIAYE, E.-N.; LE CABEC, V.; RITTIG, M. G.; J. PRANDI, MARICONNEAU-PARINI, I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. **Infect. Immun.** **67**:469–477, 1999.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan., 1985. p124-132
- BADLEY, A. D.; MCELHINNY, J. A.; LEIBSON, P. J. *et al.* Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. **J. Virol.**, **70**: 199-206. 1996.
- BARNES, P. J.; CHATTERJEE, D.; BRENNAN, P. J.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infection and Immunity**, **60**: 1441-1446, 1992.
- BEHNIA, M.; ROBERTSON, K. A; MARTIN, W. J. Lung Infections: Role of Apoptosis in Host Defense and Pathogenesis of Disease. **Chest**, **117**: 1771-1777, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Núcleo de Tecnologias Educacionais em Saúde, Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Controle da Hanseníase, uma Proposta de Integração Ensino-serviço**. Rio de Janeiro: MS, 1989.
- _____._____. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase: Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em Nível Municipal 2006-2010**. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para controle da Hanseníase**. Brasília: MS, 2002.

_____._____.Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde. **Relatório de situação: Pará**. 2 ed. Brasília: MS, 2006.

BRENNAN, P. J. Skin test development in leprosy: progress with first generation skin test antigens, and an approach to the second generation. **Leprosy Review**, **71**: 50–54, 2000.

BRENNAN, P. J.; VISSA, V. D. Genomic evidence for the retention of the essential mycobacterial cell wall in the otherwise defective *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Review**, **72**: 415–28, 2001.

BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D.; KRUTZIK, S. R. *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, **285**: 732–6, 1999.

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

BUHRER, S. S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; LEEUWEN, J. V.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. A. A simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of

- contacts with risk of developing leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases United States**, **41**: 1991-95, 2003.
- BUHRER, S.; CUNHA, M. G.; FOSS, N. T.; OSKAM, L.; FABER, W. R.; KLATSER, P. R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical Medicine & International Health**, **6**: 317-326, 2001.
- BUHRER. Use of MI Dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, **68**: 456-63, 2000.
- CHAN, J.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P.; MCNEIL, M.; TURCO, S. J.; SIBILLE, J. C.; SNAPPER, M.; AISEN, P.; BLOOM, B. R. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**:2453–2457, 1989.
- CHO, S. N.; CELLONA, R. V.; VILLAHERMOSA, L. G.; FAJARDO, T. T; JR., BALAGON, M. V.; ABALOS, R. M.; TAN, E. V.; WALSH, G. P., KIM, J. D.; BRENNAN, P. J. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **8**: 138–42, 2001.
- CHO, S-N.; YANAGIHARA, D. L.; HUNTER, S. W.; GELBER, P. H.; BRENNAN, P. J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, **41**: 1077–83, 1983.
- CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; GANAPATHY, K. B. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. **Cellular & Molecular Biology Letters**, **11**: 506-25, 2006.

- COLE S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.;
WHEELER, P. R.; HONORE, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.;
MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR,
R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.;
HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.;
MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.;
RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.;
SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.;
STEVENS, K; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R; BARRELL,
B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, **409**: 1007–11. 2001.
- CREE I.A.; NURBHAI, S.; MILNE, G. *et al.* Cell death in granulomata: the role of
apoptosis. **J. Clin. Pathol.**, 40: 1314-1319. 1987.
- CREE, I. A.; GARDINER, C. A.; SWANSON BECK, J. *et al.* Studies of cell death
(apoptosis) and cell division in leprosy granulomas. **Int. J. Leprosy**, **54(4)**:
607-613, 1986.
- DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria:
where the action starts. **Immunology and Cell Biology**, **78**: 318–24, 2000.
- DOCKRELL, H. M.; BRAHMBHATT, S.; ROBERTSON, B. D.; BRITTON, S.;
FRUTH, U.; GEBRE, N.; HUNEGNAW, M.; HUSSAIN, R.; MANANDHAR, R.;
MURILLO, L.; PESSOLANI, M. C.; ROCHE, P.; SALGADO, J. L; SAMPAIO,
E.; SHAHID, F.; THOLE, J. E.; YOUNG, D. B. A postgenomic approach to
identification of *Mycobacterium leprae*-specific peptides as T-cell reagents.
Infection and Immunity, **68**: 5846–55, 2000.

- DODSON, A. Modern methods for diagnostic immunocytochemistry. **Corrent Diagnóstico Pathology**, **8**:113-122, 2002.
- FADEEL, B. S. ORRENIUS. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of Internal Medicine**, **258**: 479-517, 2005.
- FLEURY, R. N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. **Hansenologia internationalis**, **14**:101-106, 1989.
- GANTT, K. R., SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M. B; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L; RECKER, T. J.; MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. **The Journal of Immunology**, **170**:2613–2620, 2003.
- GEIJTENBEEK, T. B.; VAN VLIET, S. J.; KOPPEL, E. A; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; APPELMELK, B.; VAN KOOYK, Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Med.** **197**:7–17, 2003.
- GIMENEZ, M. F.; GIGLI, I.; TAUSK, A.. Differential expression of Langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. **Br. J. Dermatol.** **121**:19–26, 1989.
- GORDON, S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. **Immunology Letters** **65**:5–8,1999.
- GOTTFRIED, E; KUNZ-SCHUGHART; L. A; WEBER, A; REHLI, M; PEUKER, A; MÜLLER, A; KASTENBERGER, M; BROCKHOFF, G; ANDREESSEN, R;

- KREUTZ, M. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. **Scand J Immunol.** :67(5):453-63, 2008.
- GOULART I. M. B. **Detecção de TGF- β 1 em lesões cutâneas de diferentes formas clínicas de hanseníase.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 1995.
- GOULART, I. M.; PENNA, G. O; CUNHA, G.. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35**: 365-75, 2002.
- GOWN, M. A & WILLINGHAM, C. M. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, **54(4)**:449-454, 2002.
- HASTINGS, R.C. **Leprosy**. Churchill Livingstone: New York, 1985.
- 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 factor- α . **Immunology**, **109**: 156-164. 2003.
- HOLZER, T. J.; NELSON, K. E.; CRISPEN, R. G.; ANDERSON, B. R. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. **Infect. Immun.** **51**:514–520, 1986.
- 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. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **29** : 577-580, 1981.
- HUNGER, R. E.; P. A. SIELING, M. T; OCHOA, M; SUGAYA, A. E; BURDICK, T. H; REA, P. J; BRENNAN, J. T; BELISLE, A; BLAUVELT, S. A; PORCELLI, MODLIN, R. L. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. **J. Clin. Investig.** **113**:701–708, 2004.
- JAMESON, S. C., Hogquist, K. A., BEVAN, M. J. Positive selection of thymocytes. **Ann. Rev. Immunol**, **13**. 93-126. 1995.
- JOPLING, W. H., McDOUGALL, A. C. **Manual de hanseníase**. 4 ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora, 1991.
- KANG, T. J.; CHAE G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **31**:53–58, 2001.
- KAPLAN, G.; G. WALSH, L. S; GUIDO, P; MEYN, R. A; BURKHARDT, R. M; ABALOS, J; BARKER, P. A; FRINDT, T. T; FAJARDO, R. C.; COHN, Z. A. Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. **J. Exp. Med.** **175**:1717–1728, 1992.
- KAPLAN, G.; MATHUR, N. K.; JOB, C. K.; NATH, I.; COHN, Z. A. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**:8073–8077, 1989.

- KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFIELD, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. ***The Journal of Immunology*, 164**: 2016-2020, 2000.
- KHANOLKAR-YOUNG, S.; SNOWDON, D.; LOCKWOOD, D. N. J. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-B) in leprosy lesions. ***Clin. Exp. Immunol.*, 113**:438–442, 1998.
- KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy: I report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. ***International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 39**: 693–701, 1971.
- KISSENPFENNIG, A.; AIT-YAHIA, S.; CLAIR-MONINOT, V.; STOSSEL, H.; E., BADELL, Y; BORDAT, J; POOLEY, L; LANG, T; PRINA, E; COSTE, I.; GRESSER, O; RENNO, T; WINTER, N; MILON, G; SHORTMAN, K; ROMANI, N.; LEBECQUE, S.; MALISSEN, B.; SAELAND, S.; DOUILLARD, P. Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. ***Mol. Cell. Biol.* 25**:88–99, 2005.
- KLINGLER, K.; TCHOU-WONG, K.; BRANDLI, O.; ASTON, C.; KIM, R.; CHI, C.; ROM, W. M. Effects of *Mycobacteria* on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. ***Infection and Immunity*, 65**: 5272-5278, 1997.
- KOPPEL, E. A.; LUDWIG, I. S.; HERNANDEZ, M. S.; LOWARY, T. L.; GADIKOTA, R. R.; TUZIKOV, A. B.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; VAN KOOYK, Y.; APPELMELK, B. J.; GEIJTENBEEK, T. B. Identification of the

- mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. **Immunobiology** **209**:117–127, 2004.
- KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, **9**: 525–32, 2003.
- LEIKER, D. L.; NUNZI, E. **Leprosy in the light skin**: an illustrated manual. ed. 4, Bologna: Associazione italiana “Amici di Raoul Follereau”, 1981, p. 9–17, 39–126.
- LEININGER, J .R.; DONHAM, K. J.; RUBINO, M. J. Leprosy in a chimpanzee. Morphology of the skin lesions and characterization of the organism. **Veterinary Pathology**, **15**: 339-46, 1978.
- LIBRATY, D. H.; AIRAN, L. E.; UYEMURA, K.; JULLIEN, D.; SPELLBERG, B.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Interferon-gamma differentially regulates interleukin- 12 and interleukin-10 production in leprosy. **The Journal of Clinical Investigation**, **99**: 336–41, 1997.
- LISAK, R. P.; SKUNDRIC, D.; BEALMEAR, B.; RAGHEB S. The Role of Cytokines in Schwann Cell Damage, Protection, and Repair. **The Journal of Infectious Diseases**, **176**:173–179, 1997.
- LITTLE, D.; KHANOLKAR-YOUNG, S.; COULTHART. A; SUNEETHA, S.; LOCKWOOD, D. N. J. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase

- expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. **Infect. Immun.** **69**:3413–3417, 2001.
- LOCKWOOD, D. N. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. **Lepr Rev**, **67**: 253-259, 1996.
- MADEIRA, S. Aspectos Microbiológicos do *Mycobacterium leprae* In: OPRMOLLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia**. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p.13.
- MARQUES, M. A. M.; ANT, V.; SARNO, E. N.; BRENNAN, P. J.; PESSOLANI, M. C. Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. **Journal of Medical Microbiology**, **50**: 23–28, 2001.
- MATSUOKA, M.; MAEDA, S.; KAI, M.; MATSUOKA, M.; MAEDA, S.; KAI, M.; NAKATA, N.; CHAE, G. T.; GILLIS, T. P.; KOBAYASHI, K.; IZUMI, S.; KASHIWABARA, Y. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, **68**: 121–28, 2000.
- MITTAL, A.; MISHRA, R. S.; NATH, I. Accessory cell heterogeneity in lepromatous leprosy: dendritic cells and not monocytes support T cell responses. **Clin. Exp. Immunol**, **76**:233–239, 1989.
- MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **The Journal of Investigative Dermatology**, **102**: 828–32, 1994.
- MODLIN, R. L.; MELANCON-KAPLAN, J.; YOUNG, S. M.; PIRMEZ, C.; KINO, H.; CONVIT, J.; REA, T. H.; BLOOM, B. R. Learning from lesions: patterns of

- tissue inflammation in leprosy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **85**: 1213–7, 1988.
- MOGGA, S. J.; MUSTAFA, T.; SVILAND, L. *et al.* Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine Mycobacterium tuberculosis infection. **Scand. J. Immunol.**, **56(4)**: 383-391. 2002.
- MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPEE, 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, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P. E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P. J.; COLE, S. T. On the Origin of Leprosy. **Science**, **308**: 1040-1042, 2005.
- MOREIRA, A. L; SAMPAIO, E. P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K. A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **The Journal of Experimental Medicine** **177**: 1675-1680, 1993.
- MOURA, D.F.; TELES, R.M.B.; RIBEIRO-CARVALHO, M.M.; TELES, R.B.; SANTOS, I.M.C.F.; FERREIRA, H.; FULCO, T.O.; NERY, J.A.C.; SAMPAIO, E.P; SARNO, E.N. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study Mycobacterium leprae–human cell interaction. . **British Journal of Dermatology** , 1365-2133, 2007.
- MUSTAFA, T.; BJUNE, G.; JONSSON, R.; PANDO, R. H.; NILSEN, R. Increased expression of Fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential

- novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, **54**: 630-639, 2001.
- NAAFS, B. Leprosy Reactions. **Tropical and Geographical Medicine** **46**: 80-84, 1994.
- NG, V.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; TALTS, J. F.; SALZER, J. L.; BRENNAN, P. J., RAMBUKKANA, A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, **103**: 511–24, 2000.
- NIANG, M. N.; BALDE, A. T; PERRAUT, R. Apoptosis in leprosy patients. **Int. J. Lep. Other Mycobact. Dis.**, **67(4)**: 473-474. 1999.
- NIGOU, J.; ZELLE-RIESER, C.; GILLERON, M.; THURNHER, M.; PUZO, G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. **J. Immunol.** **166**:7477–8485. 2001.
- OCHOA, M. T.; STENGER, S.; SIELING, P. A.; OCHOA, M. T.; STENGER, S.; SIELING, P. A.; THOMA-USZYNSKI, S.; SABET, S.; CHO, S.; KRENSKY, A; M.; ROLLINGHOFF, M.; NUNES SARNO, E.; BURDICK, A. E.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. **Nature Medicine**, **7**:174–9, 2001.
- ODDO, M.; RENNO, T.; ATTINGER, A. *et al.* Fas Ligand-Induced Apoptosis of Infected Human Macrophages Reduces the Viability of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, **160**: 5448-5454. 1998.
- OLIVEIRA, R. B., SAMPAIO, E. P; AARESTRUP, F; TELES, M. B; SILVA, T. P; OLIVEIRA, A. L; ANTAS, P. R. Z; SARNO, E. N. Cytokines and

- Mycobacterium leprae* Induce Apoptosis in Human Schwann Cells. **J Neuropathol Exp Neurol.** **64:** 882–890, 2005.
- OLIVEIRA, R. B; OCHOA, M. T; SIELING, P. A. *et al.* Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun** **71:**1427–1433, 2003.
- PRIGOZY, T. I.; SIELING, P. A.; CLEMENS, D.; STEWART, P. L.; BEHAR, S. M.; . PORCELLI, S. A; BRENNER, M. B.; MODLIN, R. L.; KRONENBERG, M. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. **Immunity** **6:**187–197, 1997.
- RAMASESH, N.; ADAMS, L. B.; FRANZBLAU, S. G.; KRAHENBUHL, J. L. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.** **59:**2864–2869, 1991.
- RAMBUKKANA, A.; SALZER, J. L.; YURCHENCO, P. D.; TUOMANEN, E. I. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. **Cell**, **88:** 811–21, 1997.
- RAMBUKKANA, A.; YAMADA, H.; ZANAZZI, G.; MATHUS, T.; SALZER, J. L.; YURCHENCO, P. D.; CAMPBELL, K. P.; FISCHETTI, V. A. Role of alphadystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. **Science**, **282:** 2076–79, 1998.
- RAMBUKKANA, A; ZANAZZI, G; TAPINOS, N; SALZER, J. L. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science** **296:**927–93, 2002.

- RIDLEY, D. S. **Skin biopsy in leprosy.** Documenta Geigy, 3 ed. CIBA-GEIGY. Basle: Switzerland, 1990.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy accordy to immunity: a five-group system **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, **4**: 255-273, 1966.
- ROACH, D. R.; BEAN, A. G. D.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M. P.; BRISCOE, H; BRITTON, W. J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **The Journal of Immunology**, **168**: 4620-4627, 2002.
- ROCHE, P. W., BRITTON, J., NEUPANE, K. D., FAILBUS, S. S. CHO, S-N. THEUVENET, W. J. The response to chemotherapy of serum *Mycobacterium leprae*-specific antigen in multibacillary leprosy patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **44**: 702–08, 1991.
- SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **31**:69-76, 1998.
- SARNO, E. N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, L. M.; NERY, J. A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clinical and Experimental Immunology**, **84**:103-108, 1991.
- SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J. Immunol.** **150**:2920–2930, 1993.

- SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **J. Exp. Med.** **174**:1031–1038, 1991.
- SCHON, T.; HERNANDEZ-PANDO, R. H.; NEGESSE, Y.; LEEKASSA, R.; SUNDZVIST, T.; BRITTON, S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **Br. J. Dermatol.** **145**:809–815, 2001.
- SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of the human leprosy bacilli into the footpads of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, **112**: 445–51, 1960.
- SHIMOJI, Y.; NG, V.; MATSUMURA, K.; FISCHETTI, V. A.; RAMBUKKANA, A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**: 9857–62, 1999.
- SHIN, Y. C.; LEE, H.; WALSH, G. P.; KIM, J. D.; CHO, S. N. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 4535–38, 2000.
- SIBLEY, L. D.; FRANZBLAU, S. G.; KRAHENBUHL, J. L. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. **Infect. Immun.** **55**:680–685. 1987.
- SLY, L. M.; HINGLEY-WILSON, S. M.; REINER, N. E.; MCMASTER, W. R. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves

- resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *The Journal of Immunology*, 2003.
- SOLARY, E.; DUBREZ L.; EYMIN, B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J.* **9**:1293–1305, 1996.
- SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. JR. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, **32**:76–102, 2001.
- SPIRA, A. J.; CARROLL, D.; LIU, G.; AZIZ, Z.; SHAH, V.; KORNFELD, H.; KEANE, J. Apoptosis Genes in Human Alveolar Macrophages Infected with Virulent or Attenuated *Mycobacterium tuberculosis*: A Pivotal Role for Tumor Necrosis Factor. *Am. J. Respir. Cellular and Molecular Biology*, **29**: 545-551. 2003.
- TAILLEUX, L.; O. SCHWARTZ, J. L; HERRMANN, E; PIVERT, M; JACKSON, A; AMARA, L.; LEGRES, D.; DREHER, L. P.; NICOD, J. C.; GLUCKMAN, P. H.; LAGRANGE, B.; GICQUEL, NEYROLLES, O. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**:121–127, 2003.
- THANGARAJ, H. S.; LAMB, F. I.; DAVIS, E. O.; JENNER, P. J.; JEYAKUMAR, L. H.; COLSTON, M. J.. Identification, sequencing, and expression of *Mycobacterium leprae* superoxide dismutase, a major antigen. *Infect. Immun.* **58**:1937–1942, 1990.
- UNDERHILL, D. M.; OZINSKU, A.; SMITH, K. D.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signals in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14459–14463, 1999.

- VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat. Rev. Immunol.** **3**:697–709, 2003.
- VELLOSO, A. P.; ANDRADE, V. **Hanseníase: curar para eliminar**. Porto Alegre: Edição das autoras, 2002.
- WALSH, D. S.; LANE, J. E.; ABALOS, R. M.; MYINT, K. S. A. TUNEL and limited immunophenotypic analysis of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **41**:265-269, 2004.
- WATTS, T. H. Tnf/Tnfr Familymembers In Costimulation Of T Cell Responses. **Annual Review of Immunology**, **23**:23–68, 2005.
- WILLIAMS, D. L.; TORRERO, M.; WHEELER, P. R.; TRUMAN, R. W.; YODER, M.; MORRISON, N.; BISHAI, W. R.; GILLIS, T. P. Biological implications of Mycobacterium leprae gene expression during infection. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** **8**:58–72, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological Record**. Disponível na Internet em: <http://www.who.int/wer/2007/wer8225.pdf>
- YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DENS, R. J.; WEINBERG, K.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, **254**: 277–9, 1991.
- YAMAMURA, M.; WANG, X-H.; OHMEN, J. D.; UYEMURA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **Journal of Immunology**, **149**:1470-1475, 1992.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 21: 35-56, 2005.