



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

**JUAREZ DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO  
ENDOTELIAL E LEUCOCITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA NA  
DOENÇA DE HANSEN**

**SANTARÉM  
2015**

**JUAREZ DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO  
ENDOTELIAL E LEUCOCITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA NA  
DOENÇA DE HANSEN**

Tese apresentada a banca examinadora do  
Programa de Pós-Graduação em Doenças  
Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da  
Universidade Federal do Pará.  
Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões  
Quaresma

**SANTARÉM  
2015**



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

JUAREZ DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO  
ENDOTELIAL E LEUCOCITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA NA  
DOENÇA DE HANSEN**

Tese de Doutorado apresentada para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Aprovada em:  
Conceito:

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma  
*Orientadora – NMT/UFPA*

---

Prof. Dra. Luisa Carício Martins  
*Membro Titular*

---

Profa. Dra. Hellen Thais Xavier  
*Membro Titular*

---

Profa. Dra. Marília Brasil Xavier  
*Membro Titular*

---

Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro  
*Membro Titular*

## **DEDICATÓRIA**

A toda minha família, principalmente a minha esposa Giovana Andréia Gibbert de Souza e as minhas filhas Julia Gibbert de Souza e Luísa Gibbert de Souza, pela compreensão em todos os momentos em que estive ausente, e principalmente pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis desta jornada. A minha esposa pela força, amparo e incentivo demonstrado por toda esta jornada que compartilhamos. As minhas filhas pelos inúmeros momentos de alegria, sorrisos, brincadeiras, que me recarregavam as energias para continuar a luta por um sonho.

## AGRADECIMENTOS

Meus verdadeiros e eternos agradecimentos a Deus e a minha família. Nunca me senti desamparado por todos que estiveram ao meu lado, fortalecendo a caminhada em direção a conclusão de mais esta etapa.

Minha eterna gratidão aos meus tios Maria Helena de Souza e Ademir de Souza, pela criação e exemplo de vida, pelo direcionamento no caminho da honestidade, fé e verdade, pelos incentivos e apoio no direcionamento profissional. Sei também que sem minha mãe Dirce Clara de Souza não existiria caminhada alguma.

Meu muito obrigado ao professor Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, pelo apoio recebido durante o desenvolvimento da pesquisa. Obrigado por compartilhar do seu conhecimento, idéias, sua paixão pela ciência, norteando o desenvolvimento do trabalho, facilitando dessa forma o alcance dos objetivos e oportunizando um aprendizado inesquecível. Muito obrigado por compartilhar do seu espaço, onde posso dizer que me senti parte desta grande família que frequenta o Laboratório de Imunopatologia, e que tem como referência intelectual a sua pessoa.

Agradecimento ao Dr. Moacir Boreli Tormes e ao Laboratório Celso Matos, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores, pesquisadores que tem como local de trabalho o Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, em especial aos que trabalham no Laboratório de Imunopatologia. Um agradecimento especial a professora Dra. Hellen Fuzii, que representa todos os outros membros do laboratório, que frequentei nestes últimos anos.

Não poderia esquecer de agradecer também aos meus companheiros de batalha, tanto os de Santarém (Professores Luiz Gouveia, Rodrigo, Silvania, Patrícia, André e Alexandre), como os de Belém (Jorge, Luciana, Kelly e Tinara) que compartilharam da execução dos experimentos, dividindo os seus conhecimentos, compartilhando as nossas aflições e dificuldades, sem vocês a vitória não seria possível.

Agradecer também ao apoio institucional da Universidade estadual do Pará – UEPA e a Fundação Esperança, através do Instituto Esperança de Ensino Superior-IESPES.

## RESUMO

**Introdução:** A infecção causada pelo *Mycobacterium leprae* leva a uma complexa relação entre o parasito e o hospedeiro, baseada principalmente nos aspectos imunopatológicos, que podem resultar na forma virchoviana, apresentando um perfil de células Th2, ou no pólo tuberculóide que apresenta um padrão imunológico Th1. **Justificativa:** Neste processo se fez necessário analisar participação do endotélio através do perfil de expressão de moléculas de adesão, buscando assim o entendimento de como a migração celular ocorre na hanseníase. **Objetivo Geral:** determinar o perfil da expressão de moléculas de adesão e a participação do endotélio na seleção de células para a formação do infiltrado inflamatório visto na doença. **Objetivos específicos:** quantificar a expressão das moléculas de adesão ICAM-1; ICAM-2, VCAM-1; VLA-4; E-selectina; P-selectina. Analisar a expressão das moléculas de adesão de acordo com o tipo ao padrão do infiltrado histopatológico nos polos da doença. Avaliar de forma quantitativa a presença das moléculas de adesão e correlacionar estas adesinas com os diferentes padrões celulares vistos nos polos da infecção. **Metodologia:** as amostras de pele foram seccionadas e as porções retiradas foram submetidas a análise imunohistoquímica através de anticorpos monoclonais contra os marcadores ICAM-1; ICAM-2 ; VCAM-1; VLA-4; P-selectina e a E-selectina. **Resultados:** A imunomarcagem das adesinas ICAM-1, VCAM-1 e VLA-4 demonstravam uma maior presença destas moléculas no endotélio da forma tuberculóide (TT) da infecção. O ICAM-1 apresentou-se com  $9,92 \pm 1,11$  células/mm<sup>2</sup> na forma TT, enquanto que o polo LL apresentou  $5,87 \pm 1,01$  células/mm<sup>2</sup>. O VCAM-1 apresentou uma média  $18,28 \pm 1,46$  células/mm<sup>2</sup> na forma TT, enquanto o virchoviana apresentou em média  $10,67 \pm 1,25$  células/mm<sup>2</sup>. A análise da E-Selectina demonstrou que no polo tuberculóide da infecção há uma quantidade ( $13,00 \pm 1,59$  células/mm<sup>2</sup>), significativamente ( $p < 0,0001$ ) maior da E-Selectina em comparação ao polo virchoviano que apresentou apenas  $2,58 \pm 0,38$  células/mm<sup>2</sup>. **Discussão:** o aumento das imunoglobulinas ICAM-1 e VCAM-1 resultam no fortalecimento da sinalização de transmigração tecidual, através da relação entre o LFA-1 com o seu ligante endotelial o ICAM-1. Este mesmo mecanismo está envolvido no fortalecimento da relação entre o endotélio e migração de células com o perfil de Th1 em direção ao tecido. O VLA-4 estar diretamente ligado a infiltração de células da linhagem Th1, sendo o mediador do aumento da presença de células T CD4<sup>+</sup> no tecido inflamado. A falta do VLA-4, e da imunoglobulina VCAM-1 pode resultar também em uma inibição da adesão de linfócitos Th1. Devemos ressaltar ainda que a deficiência do ICAM-1 e do VCAM-1 influencia a migração dos linfócitos T CD8+ modificando assim a presença de células citotóxicas no tecido. **Conclusão:** o estudo fortalece o papel do endotélio como um dos responsáveis pelo perfil de células encontradas no tecido. Correlacionando a expressão das moléculas de adesão a seletividade na migração de células, o que resulta em uma influencia direta sobre a resposta imunológica presente na hanseníase.

Palavras Chaves: endotélio, hanseníase, adesinas

## ABSTRACT

**Introduction:** The infection caused by *Mycobacterium leprae* leads to a complex relationship parasite-host relationship based mainly on immunopathological aspects, that may result in lepromatous form, presenting a Th2 cell profile, or in the tuberculoid pole presenting a Th1 immune pattern. **Rationale:** In this process it was necessary to analyze the participation of the endothelium through expression profile of adhesion molecules, thus trying to understand how cell migration occurs in leprosy. **Main Objective:** the study will determine the profile of expression of adhesion molecule and the participation of the endothelium in the selection of cells to the formation of the inflammatory infiltrate seen in the disease. **Specific objectives:** to quantify the expression of the adhesion molecules ICAM-1; ICAM-2, VCAM-1; VLA-4; E-selectin; P-selectin. To analyze the expression of adhesion molecules according to the standard histopathological type infiltrate the poles of the disease. Quantitatively evaluate the presence of adhesion molecules and correlate these adhesins with different cell patterns seen at the poles of the infection. **Methodology:** The skin samples were sectioned taken portions were subjected to immunohistochemical analysis using monoclonal antibodies to ICAM-1; ICAM-2; VCAM-1; VLA-4; P-selectin and E-selectin markers. **Results:** immunostaining of ICAM-1, VCAM-1 and VLA-4 adhesins, showed a greater presence of these molecules on the endothelium of the tuberculoid form (TT) of the infection. ICAM-1 was presented with  $9.92 \pm 1.11$  cells/mm<sup>2</sup> on TT form, whereas LT pole showed  $5.87 \pm 1.1$  cells/mm<sup>2</sup>. The VCAM-1 averaged  $18.28 \pm 1.46$  cells/mm<sup>2</sup> in TT form, while the lepromatous had on average  $10.67 \pm 1.25$  cells/mm<sup>2</sup>. The analysis of E-Selectin showed that the infection tuberculoid is present in an amount ( $13.00 \pm 1.59$  cells/mm<sup>2</sup>), significantly ( $p < 0.0001$ ) higher than E-selectin when compared to lepromatous pole which had only  $2.58 \pm 0.38$  cells/mm<sup>2</sup>. **Discussion:** The increase quantity of immunoglobulins ICAM-1 and VCAM-1 result in strengthening the signaling of transmigration tissue through the relationship between LFA-1 with its endothelial connector ICAM-1. This same mechanism is involved in strengthening the relationship between the endothelium and migration of cells with Th1 profile towards the tissue. VLA-4 is directly linked to the infiltration of Th1 cell lines, being the mediator of the increased frequency of T CD4<sup>+</sup> cells in inflamed tissue. The lack of VLA-4 and of VCAM-1 immunoglobulin can also result in inhibition of adhesion of Th1 lymphocytes. It is also important to notice that the ICAM-1 and VCAM-1 deficiency influences the migration of T CD8<sup>+</sup> lymphocytes thus altering the presence of cytotoxic cells in the tissue. **Conclusion:** The study strengthens the role of the endothelium as one responsible for the profile found in tissue cells. Correlating the expression of adhesion molecules to the selectivity in cell migration, resulting in a direct influence on the immune response present in leprosy.

Key words : endothelium , leprosy , adhesins

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	18
<b>2.1 CONCEITO</b>	18
2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE	19
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO	22
2.4 PATOGENIA DO <i>Mycobacterium leprae</i>	24
2.5 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE	25
2.6 FORMAS CLÍNICAS SEGUNDO OS CRITÉRIOS DE MADRI, 1953	27
2.7 PAPEL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE	30
2.8 PARTICIPAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA CASCATA DE MIGRAÇÃO CELULAR	33
2.9 FORMAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	34
2.10 SUPERFAMÍLIA DAS IMUNOGLOBULINAS	39
2.11 RELAÇÃO ENTRE PERFIL DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA Th1 E Th2 E A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO	40
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	43
<b>4. OBJETIVO GERAL</b>	44
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
<b>5. METODOLOGIA</b>	44
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	44
5.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	45
5.3 RELAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA	46
5.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS	46
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	47
5.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	47
5.8 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	47
5.9 AVALIAÇÃO DE RISCOS	47
5.10 AVALIAÇÃO DE BENEFÍCIOS	48
<b>6. RESULTADOS</b>	49
6.1 ANÁLISE COMPARATIVA DOS IMUNOMARCADORES	49



ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P ENTRE OS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO.	
6.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO ICAM-1 <i>versus</i> ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	53
6.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO ICAM-2 <i>versus</i> VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	58
6.4 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO VCAM-1 <i>versus</i> VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	62
6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO VLA-4 <i>versus</i> CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	65
6.6 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO CD62E <i>versus</i> CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	67
6.7 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CORRELAÇÕES AVALIADAS ENTRE AS MOLÉCULAS ICAM-1; ICAM-2, VCAM-1; VLA-4 (A <sub>4</sub> B <sub>1</sub> ); E-SELECTINA; P-SELECTINA;	68
6.8 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA ICAM-1 COM O ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	68
6.9 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA ICAM-2 COM O VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	71
6.10 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA VCAM-1 COM A VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO.	74
6.11 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA VLA-4 COM A CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	75
6.12 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DAS MOLÉCULAS CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO	76
<b>7. DISCUSSÃO</b>	79
7.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESAO ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P	79
7.2 PAPEL DA E-SELECTINA E P-SELECTINA SOBRE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NAS FORMAS POLARES DE HANSENÍASE	83

<b>8. CONCLUSÃO</b>	87
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	88
<b>ANEXOS</b>	95

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 01 – Moléculas de adesão e seus ligantes expressos durante as etapas de migração celular.	35
Tabela 02 – Integrina e o ligante de integrina (Imunoglobulina).	38
Tabela 03 – Relação de anticorpos primários utilizados no estudo.	44

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
Figura 01 - Distribuição da Prevalência de hanseníase no mundo em 2012.	18
Figura 02 - Coeficiente de detecção de Hanseníase na População Geral, por Regiões - Brasil, 1990 a 2008.	19
Figura 03 - Série Histórica da Prevalência de Detecção de Hanseníase de 1990 até 2005, distribuída por região.	20
Figura 04 - Classificação de Madri (1953):	24
Figura 05 - Classificação de <i>Ridley &amp; Jopling</i> (1966):	24
Figura 06 - Classificação Operacional (Organização Mundial de Saúde):	25
Figura 07 - Sequencia da Migração Celular através do endotélio.	32
Figura 08 – Etapas de Migração Celular e Moléculas de Adesão	33
Figura 09 – Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	47
Figura 10- Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-2 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	48
Figura 11 - Análise quantitativa da imunomarcção de VCAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	48
Figura 12 – Análise quantitativa da imunomarcção de VLA-4 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	49
Figura 13 – Análise quantitativa da imunomarcção de E-Selectina nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase	50
Figura 14- Análise quantitativa da imunomarcção de P-Selectina nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	51
Figura 15- Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 <i>versus</i> ICAM-2 nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase.	52
Figura 16 - Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 <i>versus</i> VCAM-1 nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase.	53
Figura 17 – Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 <i>versus</i> VLA-4 nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase.	54
Figura 18 - Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 <i>versus</i> CD62E nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase.	55

Figura 19 - Análise quantitativa da imunomarcacão de ICAM-1 <i>versus</i> CD62P nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase	56
Figura 20 - Análise quantitativa da imunomarcacão de ICAM-2 <i>versus</i> VCAM-1 nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	57
Figura 21 - Análise quantitativa da imunomarcacão de ICAM-2 <i>versus</i> VLA-4 nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase	58
Figura 22 - Análise quantitativa da imunomarcacão de ICAM-2 <i>versus</i> CD62E nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	59
Figura 23- Análise quantitativa da imunomarcacão de ICAM-2 <i>versus</i> CD62P nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase	60
Figura 24 - Análise quantitativa da imunomarcacão de VCAM-1 <i>versus</i> VLA-4 nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	61
Figura 25 - Análise quantitativa da imunomarcacão de VCAM-1 <i>versus</i> CD62E nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase	62
Figura 26 - Análise quantitativa da imunomarcacão de VCAM-1 <i>versus</i> CD62P nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	63
Figura 27 - Análise quantitativa da imunomarcacão de VLA-4 <i>versus</i> CD62E nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	64
Figura 28 - Análise quantitativa da imunomarcacão de VLA-4 <i>versus</i> CD62P nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	65
Figura 29 - Análise quantitativa da imunomarcacão de E-Selectina e da P-Selectina nas biopsias de pele <i>in situ</i> , das formas polares da infecção de acordo com a classificacão de Madri de pacientes com hanseníase.	66
Figura 30 - Correlacão entre a imunomarcacão de ICAM-1 com a adesina ICAM-2 nas formas TT e LL de hanseníase.	67
Figura 31 - Correlacão entre a imunomarcacão de ICAM-1 com a adesina VCAM-1 nas formas TT e LL de hanseníase.	67
Figura 32 - Correlacão entre a imunomarcacão de ICAM-1 com a adesina VLA-4 nas formas TT e LL de hanseníase.	68

Figura 33 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-1 com a selectina CD62E nas formas TT e LL de hanseníase.	68
Figura 34 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-1 com a selectina CD62P nas formas TT e LL de hanseníase.	69
Figura 35 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com o VCAM-1 nas formas TT e LL de hanseníase.	70
Figura 36 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com o VLA-4 nas formas TT e LL de hanseníase.	70
Figura 37 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com a CD62E nas formas TT e LL de hanseníase.	71
Figura 38 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com o CD62P nas formas TT e LL de hanseníase.	71
Figura 39 - Correlação entre a imunomarcção de VCAM-1 com a VLA-4 nas formas TT e LL de hanseníase.	72
Figura 40 - Correlação entre a imunomarcção de VCAM-1 com o CD62E nas formas TT e LL de hanseníase.	72
Figura 41 - Correlação entre a imunomarcção de VCAM-1 com o CD62P nas formas TT e LL de hanseníase.	73
Figura 42 - Correlação entre a imunomarcção de VLA-4 com a CD62E nas formas TT e LL de hanseníase.	74
Figura 43 - Correlação entre a imunomarcção de VLA-4 com a CD62P nas formas TT e LL de hanseníase	74
Figura 44 - Correlação entre a imunomarcção de CD62E com a CD62P nas formas TT e LL de hanseníase.	75
Figura 45- Análise imunohistoquímica de molécula CD62E nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	75
Figura 46 - Análise imunohistoquímica de molécula ICAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase	75
Figura 47 - Análise imunohistoquímica de molécula ICAM-2 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase.	76
Figura 48 - Análise imunohistoquímica de molécula VCAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase	76
Figura 49 - Análise imunohistoquímica de molécula VLA-4 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BL	Borderline Lepromatosa
BT	Borderline Tuberculóide
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL-1	Interleucina
JAMs	Moléculas Juncionais
LAM	Lipoarabinomanana
LFA-1	Antígeno Lucocitário Humano I
LL	Lepromatosa
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium Leprae</i>
Mac-1	Antígeno de Macrófago-1
MAdCAM-1	Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1 $\alpha/\beta$	Macrophage Inflammatory Proteins-1 $\alpha/\beta$
NFk $\beta$	Fator Kappa B
NK	Natural Killer Cell
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Tampão fosfato salino
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEH	Atualmente o Programa de Eliminação da Hanseníase
PGL-1	2-Glicolípídeo Fenólico-1
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Beta
Cells Th	Thelper Cells
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factors</i>
TT	Tuberculóide

VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein - 1
VEGF	Fator Endotelial de Crescimento
VLA	Alpha Beta Integrin



## 1. INTRODUÇÃO

A infecção causada pelo *Micobacterium leprae* resulta em uma complexa relação entre o parasito e o hospedeiro, baseada principalmente nos aspectos imunopatológicos que fazem parte da lesão induzida por este bacilo. Apesar de ser conhecida a milhares de anos a Hanseníase ainda é fonte de diversas pesquisas que tentam desvendar esta relação.

Por ser uma bactéria intracelular e possuir fatores de virulência peculiares, o bacilo da hanseníase induz à lesões teciduais que tem como base a imunopatogenese, despertando assim em seu hospedeiro um espectro clínico que caminha entre dois polos principais: a forma tuberculóide (caracterizada por ser uma lesão granulomatosa e bem delimitada) e o pólo virchoviano (descrito como uma forma difusa da doença).

Os processos fisiopatológicos que determinam as formas clínicas da doença têm como base principal o perfil de células e citocinas presentes na lesão. As alterações imunológicas características do polo virchoviano, são determinadas principalmente por um padrão de células com perfil Th2, resultando assim uma baixa efetividade no combate do bacilo. Porém, o polo tuberculóide da doença determina uma forma clínica mais efetiva que se apresenta com um padrão imunológico Th1, promovendo uma boa resposta contra o bacilo, mas que também resulta em lesões tissulares ao paciente (RIDLEY & JOPLING, 1966)

As manifestações imunológicas ainda não estão totalmente elucidadas. Vários fatores como o crescimento lento do parasita, estrutura molecular do bacilo, o parasitismo intracelular e o perfil genético do paciente influenciam diretamente o curso da doença.

Dentro das manifestações imunológicas o processo de migração celular é uma das etapas mais importantes. O caminho que a célula percorre entre a corrente sanguínea e o tecido inflamado é mediado por moléculas conhecidas como adesinas, estas estruturas protéicas promovem o processo de adesão celular, rolagem e transmigração das células para o tecido.

Podemos citar como exemplos destas moléculas as integrinas presentes no linfócitos, as selectinas (Selectina E e P) presentes no endotélio e as Imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1) também presentes no endotélio. Porém, a expressão destas moléculas é influenciada diretamente pela presença das citocinas e quimicinas produzidas pela resposta inflamatória. Existem também estudos no tecido hepático que demonstram a diferença na expressão destas proteínas no endotélio, sugerindo a participação destas células no recrutamento seletivo de diferentes linhagens de linfócitos (KUKLA, 2009).

A característica espectral da hanseníase está bem descrita na literatura. Porém não sabemos qual o perfil de moléculas de adesão que estão expressas nas formas polares da hanseníase. Além disso, não está clara a influência do endotélio sobre o tipo de linfócitos recrutados para atuar na lesão tecidual. Outro ponto importante a ser discutido é há diferença significativa na expressão de moléculas de adesão entre as duas formas polares da hanseníase, demonstrando assim uma possível influência do endotélio no recrutamento dos linfócitos teciduais nas lesões cutâneas da hanseníase.

Assim se faz necessário investigar o microambiente tecidual durante a resposta inflamatória das formas polares de hanseníase. Para elucidar estas lacunas necessitamos avaliar o perfil de expressão da integrina  $\alpha_4\beta_1$ , das selectinas P-selectina; E-selectina e das imunoglobulinas ICAM-1; ICAM-2 e VCAM-1. Buscando o entendimento de como a migração celular ocorre na hanseníase, e qual o possível envolvimento do endotélio na formação do infiltrado de células e na seleção destes linfócitos que participam do combate à infecção por este bacilo.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 CONCEITO**

A infecção pelo *Mycobacterium leprae* promove o desenvolvimento de uma doença de evolução lenta, que leva principalmente a alterações dermatoneurológicas, e acomete indivíduos de qualquer faixa etária. Manifesta-se principalmente por meio de sinais e sintomas dermatoneurológicos: lesões de pele e lesões de nervos periféricos, em especial o mediano, radial, ulnar, tibial, fibular e o facial. Os primeiros sintomas são manchas brancas e vermelhas, que podem surgir em qualquer parte do corpo. O bacilo causador da infecção é um parasita intracelular obrigatório que leva ao comprometimento dos nervos periféricos promovendo um potencial risco de desenvolvimento de incapacidades físicas, que podem evoluir para deformidades (BRASIL, 2002; BRASIL, 2006; MOREIRA, et al., 2014).

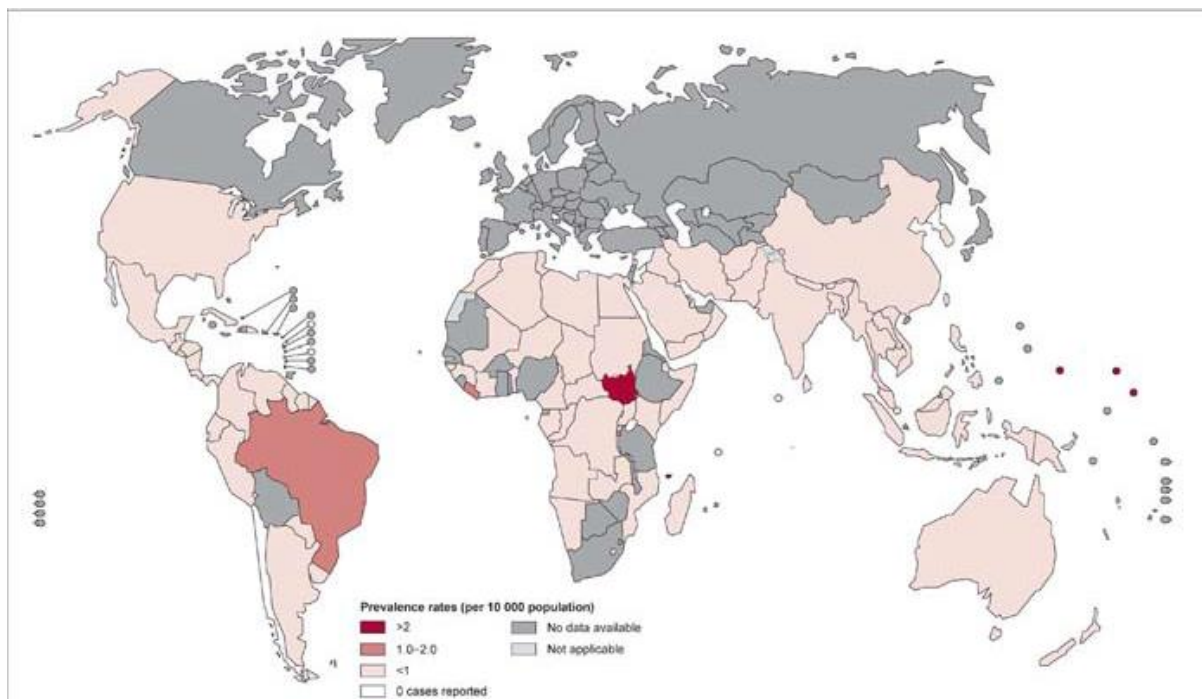
A transmissão da doença, acredita-se que ocorra através das vias respiratórias e esta diretamente relacionada ao contato íntimo e prolongado do paciente bacilífero, sendo necessário um longo período de exposição do indivíduo ao agente. O desenvolvimento da doença depende da complexa relação entre o parasita e o hospedeiro, mediado principalmente pela resposta imunológica do que é responsável por desenvolver o grau de suscetibilidade e a forma clínica da infecção.

As condições socioeconômicas desfavoráveis e o nível de endemia da região, são fatores responsáveis pela perpetuação da doença, assim como condições precárias de vida e de saúde e o elevado número de pessoas convivendo em um mesmo ambiente, influem no risco de adoecer. Entretanto, a cadeia de transmissão é interrompida quando o doente inicia o tratamento quimioterápico, deixando de ser transmissor, pois as primeiras doses da medicação reduzem os bacilos a um número que impede a infecção de outras pessoas, quebrando o curso epidemiológico da infecção e reduzindo os índices de transmissão do bacilo (BRASIL, 2002; BRASIL, 2006; BRASIL, 2009; LIMEIRA, et al. 2013 ).

## **2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE**

Hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium leprae*, e que atinge milhares de pessoas em todo o mundo. Conhecida desde os primórdios da humanidade, esta doença ainda é responsável pela morbidade de milhares de pacientes, ocorrendo principalmente em regiões com baixo índice de desenvolvimento social. Atualmente o Programa de Eliminação da Hanseníase (PEH), instituído pela Organização Mundial de Saúde (OMS), promoveu grandes avanços no combate desta infecção. O PEH conseguiu reduzir, drasticamente, a incidência de casos em diversos países antes endêmicos, atingindo a meta da OMS que é de 01 caso de hanseníase a cada 10.000 habitantes (MACHADO, et al., 2009). Porém os estudos de prevalência no Brasil demonstram que a hanseníase continua sendo um problema de saúde pública, e que apesar da redução significativa no número de casos que ocorreu nos últimos anos a luta contra esta infecção milenar está longe chegar ao fim (BRASIL, 2002).

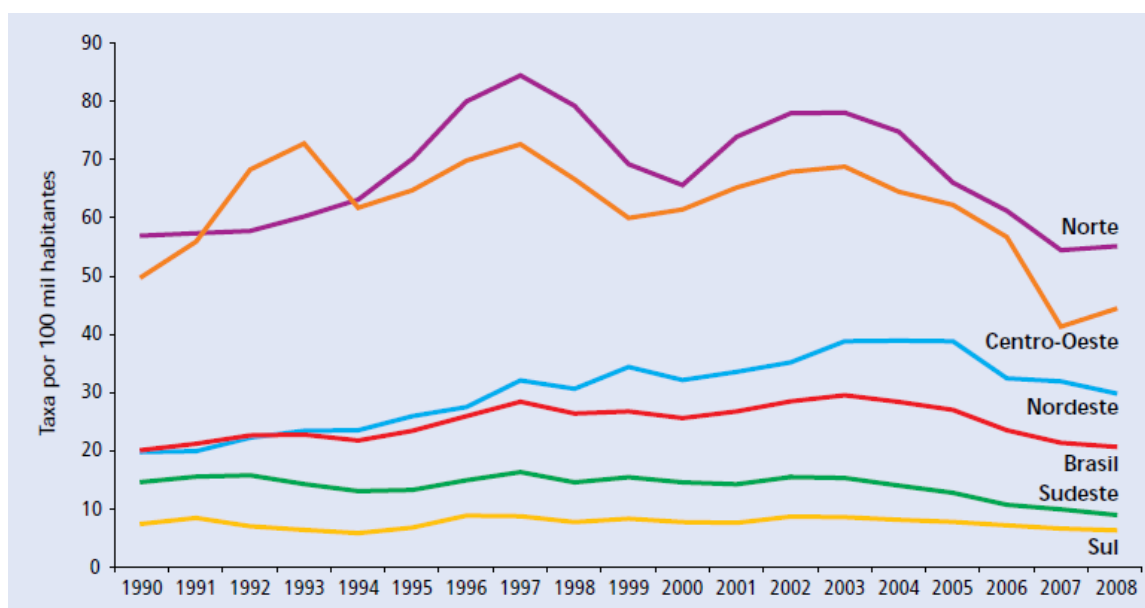
Figura 01 – Distribuição da Prevalência de hanseníase no mundo em 2012



Fonte: WHO: GLOBAL situation of leprosy control at the beginning of the 21<sup>st</sup> century, 2012.

Quando se avalia a prevalência de hanseníase por regiões percebemos uma disparidade no número de casos. Podemos observar que a região Norte é uma área hiperendêmica que apresentou um coeficiente de detecção de mais de cinco casos para cada 10.000 habitantes no ano de 2005. Entretanto, nos estados do Sul a doença atinge índices que estão abaixo do estipulado pela OMS, apresentando uma prevalência de 0,53 casos para cada 10.000 habitantes. Dentre os estados da Região Norte, somente o Pará notificou 3.329 novos casos hanseníase em 2005, chegando a uma taxa de prevalência de 4,78 casos da doença para cada 10.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Vários fatores prejudicam o combate e alimentam estes elevados números de infecção, dentre eles podemos citar o curso clínico da doença, o crescimento lento do *Mycobacterium leprae*, condições socioeconômicas desfavoráveis, e o elevado número de pessoas convivendo no mesmo ambiente, resultando assim na disseminação da bactéria (LINDOSO & LINDOSO, 2009).

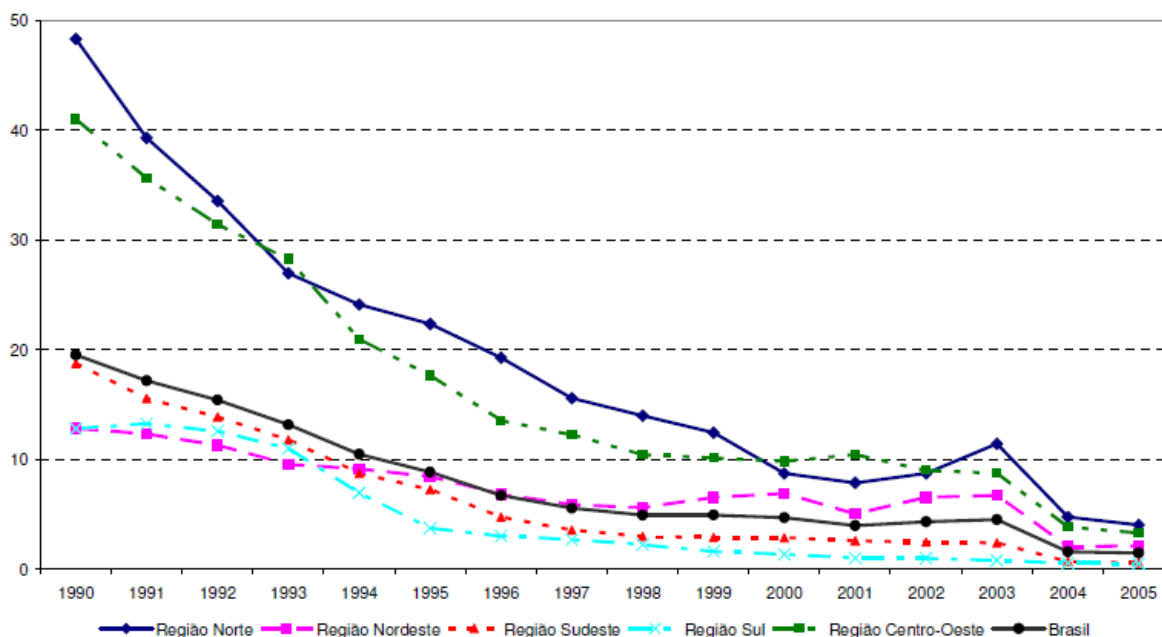
Figura 02 - Coeficiente de detecção de Hanseníase na População Geral, por Regiões - Brasil, 1990 a 2008.



Fonte: BRASIL, 2009.

O Brasil apresenta uma queda acentuada na taxa de prevalência da hanseníase em todo o país registrando em 2012 somente 33.303 casos novos e o coeficiente de detecção foi de 17,17/100 mil habitantes na população em geral. Em menores de 15 anos, o coeficiente foi de 4,81/100 mil habitantes, redução percentual acumulada de 40% na comparação com o período de 2003 a 2012 (7,98/100 mil habitantes). Porém os estados de Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Pará e Rondônia ainda apresentam uma prevalência acima de três casos por 10 mil habitantes. Mesmo com esta redução o Brasil ainda ocupa o segundo lugar em número de casos de hanseníase no mundo, com aproximadamente 34.000 casos notificados no ano de 2012, perdendo apenas para Índia que apresentou mais de 127.000 casos neste mesmo ano.

Figura 03 – Série Histórica da Prevalência de Detecção de Hanseníase de 1990 até 2005, distribuída por região.



Fonte: SINAN/SVS-MS, 2007.

### 2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da Hanseníase (*Mycobacterium leprae*) só foi descrito em 1873 pelo norueguês Amauer Hansen. É um bacilo gram positivo, álcool-ácido resistente, parasita intracelular obrigatório, com predileção por célula de Schwann e da pele. O fato de não ser cultivável dificulta o seu estudo, porém existem modelos animais (tatu e camundongos) que auxiliam no entendimento da patogenia da doença (ARAÚJO, 2003; BEIGUELMAN, 2002; MATTOS & FORNAZARI, 2005).

O contágio pelo bacilo acontece principalmente pelas vias aéreas superiores, e a doença é predominantemente uma doença de pele, mucosas e nervos periféricos. A infecção ativa pelo *Mycobacterium leprae* possui uma grande diversificação no seu curso clínico, todos os processos estão intimamente ligados a resposta imune que ocorre durante a doença. Nos pacientes infectados o bacilo se propaga para os nervos periféricos e pele onde são fagocitados pelas células de Schwann, imprimindo assim uma característica de doença crônica (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002).

O início da hanseníase pode ser insidioso e de difícil reconhecimento, o *Mycobacterium leprae* possui um período médio de incubação de dois a quatro anos (KUKLA, et al.; 2009).

Esta bactéria é um parasita intracelular obrigatório, de multiplicação lenta que pode demorar de 12 a 21 dias para se duplicar, e que possui como sítio preferencial de infecção as células cutâneas e nervos periféricos (BRASIL, 2002; MACHADO, et al., 2009). A estrutura microbiológica do bacilo *Ihe* confere a características de ser álcool-ácido resistente (BAAR), corado pelo método de Ziehl-Neelsen e a sua virulência resulta em uma baixa patogenicidade, onde o contágio se dá pelo contato íntimo e prolongado entre indivíduos sadios com pessoas contaminadas na sua forma bacilífera e não tratadas (BRASIL, 2002; GOULART; PENNA & CUNHA, 2002).

O homem é considerado o único reservatório natural do bacilo, porém existem estudos que relatam também a infecção natural de animais selvagens como tatus e macacos (MACHADO, et al.; 2009). Taxonomicamente, o *Mycobacterium leprae* pertence à família *Mycobacteriaceae*, e se apresenta como um bacilo reto ou levemente curvado e com extremidades arredondadas. A sua parede celular possui a estrutura química presentes nas micobactérias, as quais apresentam peptidoglicano entrelaçados e ligados por cadeias polissacarídeas, que servem de suporte para os ácidos micólicos. A presença na parede de uma estrutura conhecida como liporabinomanana (LAM), *Ihe* confere uma maior capacidade de resistência dentro dos fagócitos. Além de apresentar proteínas estruturais que constituem um importante alvo de ação para os linfócitos T (SOARES, 2001).

O bacilo possui como um dos componentes de virulência, a cápsula que é composta por uma grande quantidade de lipídeos, levando a um aspecto espumoso visto nos macrófagos infectados. A presença de um lipídeo capsular exclusivo do *M. leprae*, o 2-glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1), nos dá possibilidade da avaliação da presença tecidual e/ou soroprevalência do bacilo. Este antígeno bacteriano parece persistir por um longo período, mesmo após o bacilo ter sido eliminado. Além disso, o PGL-1 também atua como fator de virulência, podendo reagir com compostos de radicais livres, sugerindo que este lipídeo capsular pode proteger contra efeitos lesivos do sistema imunológico (SOARES, 2001).

O curso clínico da infecção pelo *M. leprae* pode variar em um amplo espectro, mediado principalmente pela resposta imune celular, apresentando pólos clínicos, que pode se manifestar em uma forma anérgica ou não responsiva, onde temos o aumento na proliferação bacilar, a uma forma responsiva onde temos um baixo número de bactérias. A polarização da doença nem sempre acontece, há também as formas clínicas intermediárias, que são até mais freqüentes do que as formas polares. Os aspectos que determinam o curso imunológico da

infecção não estão totalmente elucidados, vários fatores podem influenciar a patogenia da Hanseníase, inclusive as características estruturais do bacilo, sendo necessário que se conheça de forma profunda o processo imunopatológico da infecção.

#### **2.4 PATOGENIA DO *Mycobacterium leprae***

A primeira linha de defesa da resposta imunológica é a inata onde o *M. leprae* é diretamente reconhecido através de receptores padrões, do tipo *Toll-like* (TLRs), das células do hospedeiro. Estes receptores combinam-se a antígenos padrões (PAMPs) de micobactérias, sendo que os *Toll-like's* TLR-2 e TLR-4 parecem ser especialmente ativados pelas lipoproteínas do *M. Leprae*, este processo dá início a cascata de eventos que leva a secreção de citocinas, diferenciação de macrófagos e ativação de células dendríticas. A propagação deste evento se dá através da apresentação dos antígenos aos Linfócitos T, resultando na diferenciação, proliferação celular e ativação de outros eventos da resposta imunológica (LIPPOLIS, 2007; MENDONÇA, 2008).

O reconhecimento dos PAMPs efetuado pelos receptores *Toll-like* promove uma cascata de eventos citoplasmáticos, esta cadeia da resposta parece ser diretamente influenciada pelo tipo de *Toll-like* que é ativado. Por exemplo: quando temos ativação do TLR-2 ocorre um aumento na liberação de IL-4, IL-5 e TNF- $\alpha$ . Entretanto os ligantes do TLR-4 parecem induzir a expressão de IL-1, IFN- $\gamma$  e IL-12. A nível intracelular, o processo de ativação dos TLR gera uma sinalização que induzem a ativação do Fator Kappa B ou NF $\kappa$ B, um importante estimulador de genes responsáveis pela produção de citocinas e progressão da resposta (LIPPOLIS, 2007).

O bacilo penetra preferencialmente em células de Schwann, e a sua disseminação pelo tecido parasitado sofre influência direta da responsividade do hospedeiro em combater o agente infeccioso, sendo que o próprio agente possui como principal fator de virulência a sua capacidade de sobreviver dentro dos fagócitos (LIPPOLIS, 2007; MACHADO, 2004). O Macrófago infectado promove, entre outras ações, a sinalização aos linfócitos T CD4+ que são os mediadores da resposta celular e atuam na orquestração do combate ao bacilo.

Através destas células ocorre também a ativação dos linfócitos T CD8+ que possuem atividade citotóxica. A soma destes mecanismos resulta em uma maior capacidade no combate ao *M. leprae*, assim percebemos que a destruição de um parasita intracelular como o *Mycobacterium* é dependente de um perfil de resposta imunológica do tipo Th1 com a presença maciça de células T CD4+, T CD8+, citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 e IFN- $\gamma$  (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002; TELES, et. al., 2010).



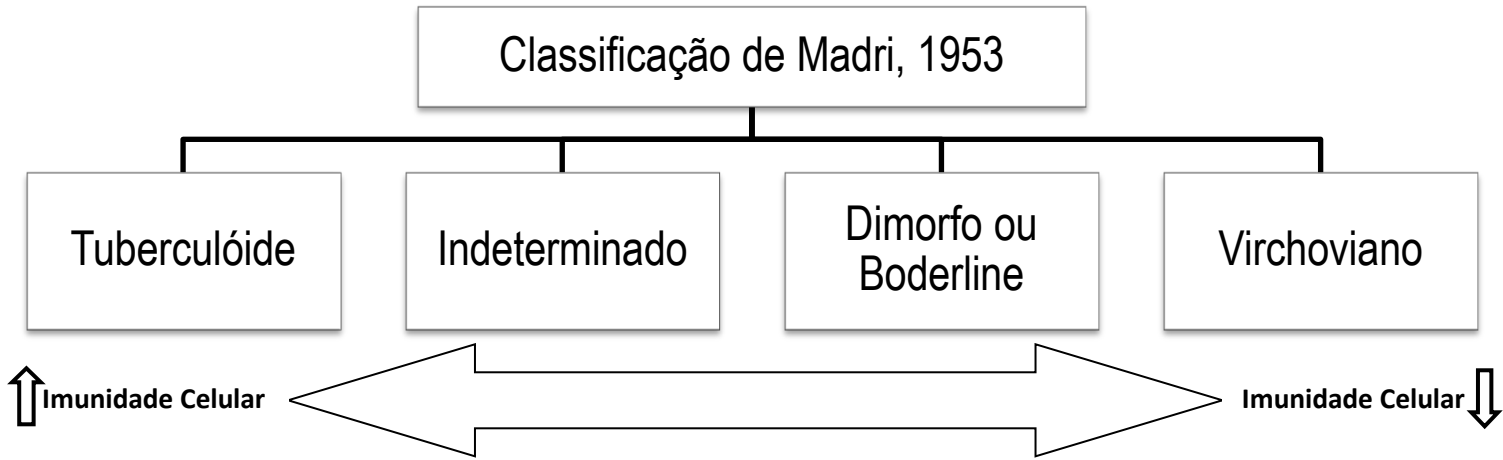
Porém, todos os fatores citados anteriormente coexistem em uma resposta imunológica, realizando as conexões necessárias entre a porção inata e adquirida da resposta imune. O que resulta em um fenótipo imunológico expressos durante a infecção, o qual nem sempre é efetivo contra o parasita. A suscetibilidade do indivíduo a doença está diretamente relacionada a mecanismo de evasão do patógeno ou a falhas na resposta do hospedeiro.

Este conjunto de fatores somado as ações do parasita levam a modificações histológicas que resultam nas características clínicas vistas no espectro da doença, assim podemos perceber que há uma multiplicidade de fatores influenciando o curso patogênico do bacilo (ARAÚJO, 2003; MACHADO, et. al., 2004).

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

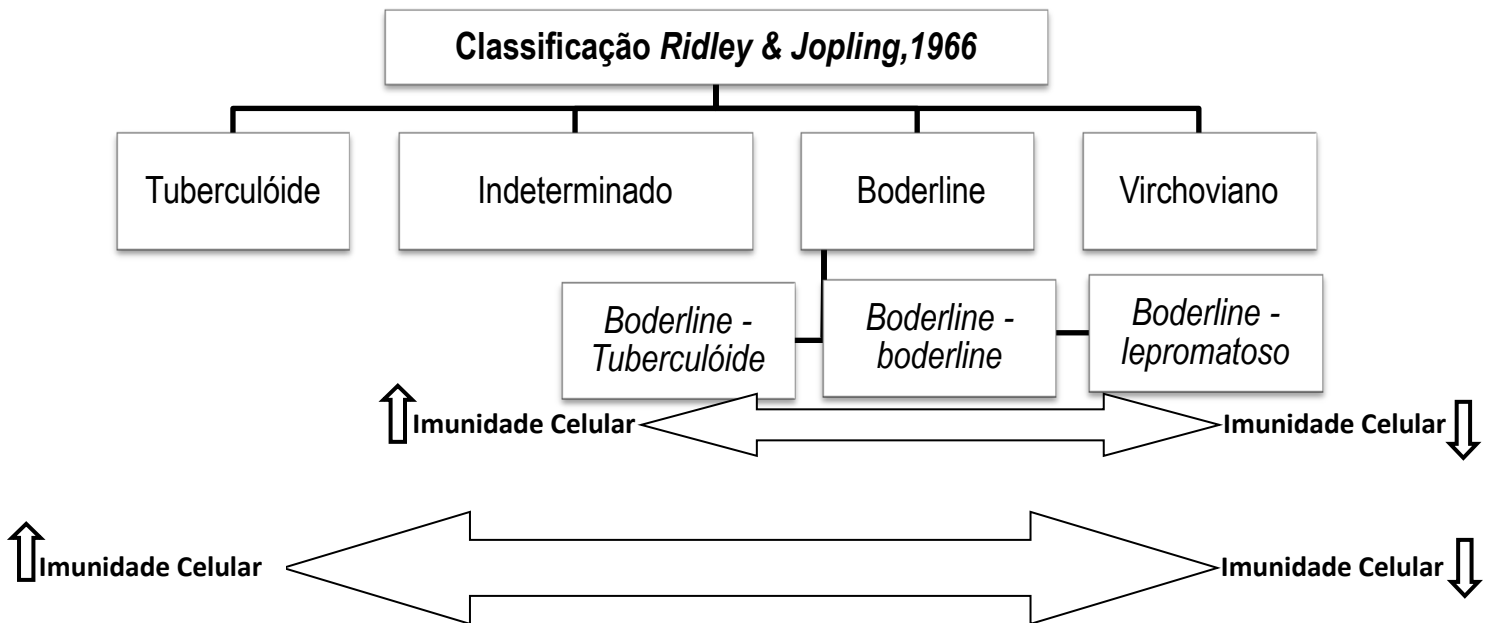
A Classificação de Madri instituída em 1953 adota critérios de polaridade da doença, e somam as características clínicas da infecção aos aspectos imunológicos, bacteriológicos e histológicos (SOUZA, 1997). Podemos distinguir diferentes padrões que se dividem em quatro quadros: indeterminado, tuberculóide, virchoviano e dimorfo ou Boderline (Figura 04). Estas designações foram adotadas para as formas estáveis da doença. Porém a classificação de Ridley & Jopling (1966) adota subgrupos dentro do espectro de Madri, diferenciando as formas instáveis da doença (na qual o padrão de hanseníase pode mudar). Esta classificação dividiu os padrões de infecção em pacientes *borderline-tuberculóide*, *borderline-borderline*, *borderline-lepromatoso* (Figura 05). Entretanto estas classificações demandam de uma estrutura especializada que conta com procedimentos de avaliação histológica da lesão, identificação do bacilo e aspectos clínicos da doença, além de mão de obra especializada e treinada. Estes fatores nem sempre estão disponíveis nas áreas endêmicas da hanseníase dificultando assim o seu diagnostico neste formato.

Figura 04- Classificação de Madri (1953):



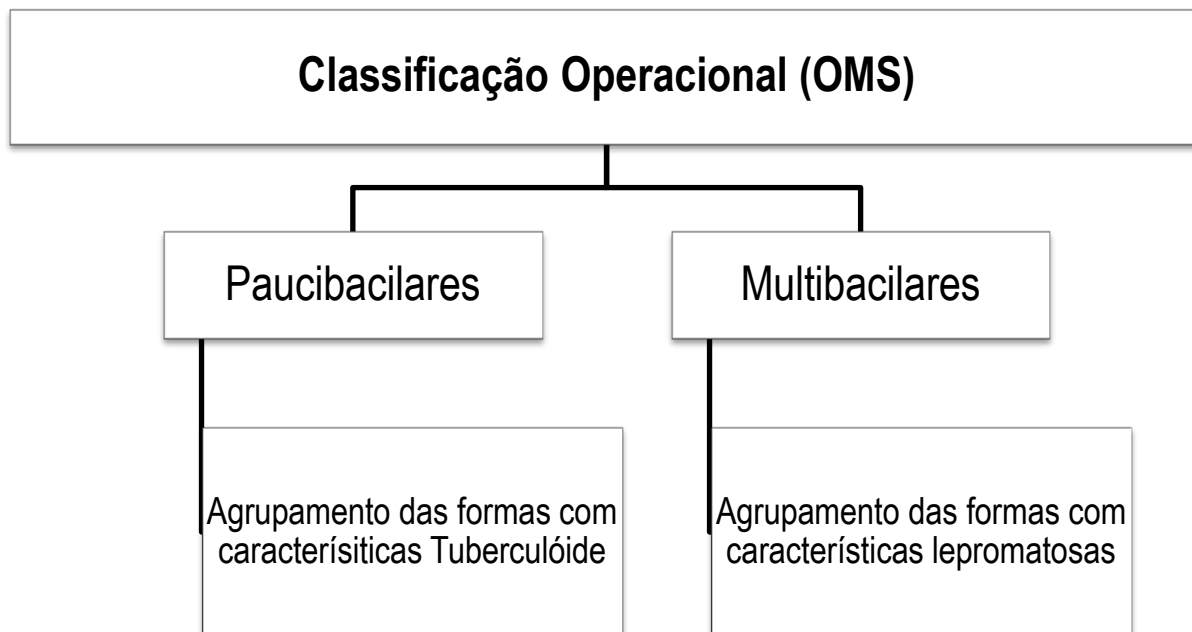
Fonte: adaptado de Immunology of Leprosy, 2008.

Figura 05 - Classificação de Ridley & Jopling (1966):



Fonte: adaptado de Immunology of Leprosy, 2008.

Figura 06 - Classificação Operacional (Organização Mundial de Saúde):



Fonte: adaptado de Immunology of Leprosy, 2008

Na busca de uma classificação simplificada e operacional, que possa proporcionar o paciente o tratamento da sua forma clínica, sem a necessidade de exames diagnósticos complexos ou de difícil acesso, a OMS adotou uma classificação que se baseia na população bacilar (Fluxograma 03), através da pesquisa do *M. leprae* em esfregaços de linfa, onde a baciloscopia é realizada em pontos específicos como orelhas, joelhos, cotovelos e lesões. Levando em conta também o número de lesões apresentadas pelo paciente. Sendo assim os critérios de Madri foram agrupados em duas grandes categorias de pacientes os Paucibacilares (pacientes com baciloscopia positiva e até 5 lesões de pele) e Multibacilares (pacientes com baciloscopia positiva e mais de 5 lesões de pele). Esta classificação foi adotada pelo Ministério da Saúde como critério para definição dos esquemas terapêuticos utilizados no tratamento dos pacientes no Brasil (BRASIL, 2002).

## 2.6 FORMAS CLÍNICAS SEGUNDO OS CRITÉRIOS DE MADRI, 1953:

Seguindo os critérios instituídos em Madri podemos diferenciar a doença através das seguintes características:

**Forma Indeterminada:** Presença de uma área de hipoestesia, definida ou não, por uma lesão visível. Surgimento de regiões hipopigmentadas, discretamente eritematosa, mais secas do que a pele circunjacente, além de lesões da inervação dérmica. Este processo

demonstra um estágio inicial e transitório da doença, dentro de uma resposta imune não definida (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002; SOUZA, 1997).

Aparente lesão demonstra perda da sensibilidade, geralmente térmica, anidrose e alopecia. Avaliação do tecido local revela a presença de células mononucleares, em focos reduzidos, localizados em torno de nervos, vasos e anexos da derme. A evolução desta forma varia de acordo com a resposta imune, havendo a possibilidade de cura ou polarização da doença.

**Forma Tuberculóide:** Este pólo se caracteriza pela forma de resistência imunológica, na tentativa de contenção do bacilo. As lesões cutâneas se apresentam em aspecto hipocrômico ou eritematoso, com bordas pronunciadas, lesões únicas ou em pequeno número e distribuída de forma assimétrica. O processo inflamatório resulta em uma forma difusamente infiltrada, com lesões que não ultrapassam 10 cm de diâmetro e danos nos ramos neurais levando a redução da sensibilidade e anestesia, ausência de pelos, hipodrótica e bloqueio da sensibilidade autonômica (BRASIL, 2002; MYRVANG; 1973; SOUZA, 1997).

O corte histológico desta lesão revela um infiltrado granulamatoso, com a borda linfocitária, e centro constituído por células gigantes de Langhans (gigantócitos) formando assim um granuloma bem definido. Alterações como perda da sensibilidade, são explicadas pelo comprometimento neural, presença do infiltrado inflamatório perivascular, periglandular e perineural. O paciente apresenta uma forte positividade ao teste de Mitsuda, além da baciloscopia negativa na grande maioria dos casos.

**Forma Virchoviana ou Lepromatosa:** Ao contrário da forma Tuberculóide este pólo o paciente apresenta anergia, com alta suscetibilidade ao bacilo, resultando uma forma disseminada da doença. A evolução desta forma pode ser insidiosa e com uma progressão lenta, avançando por anos e atingindo áreas extensas do tegumento, múltiplos troncos nervosos e outros órgãos. O paciente é Mitsuda negativo, mas demonstra uma alta taxa do bacilo, chegando a  $10^9$  bacilos/grama de tecido (MENICUCCI et al., 2005; SOUZA, 1997).

As lesões cutâneas são eritematosas, eritemoacastanhadas, eritemoamareladas, ferruginosas, espessadas e delimitadas. Podem se apresentam nas formas de infiltrações em placa, pápulas, nódulos e tubérculos. Neste caso, as lesões são simétricas, iniciando com máculas mal definidas, discretamente hipocrômica ou eritematosas, muitas vezes pouco visíveis (BRASIL, 2002; HUBBARD & ROTHLEIN, 2000; RIDLEY & JOPLING, 1966; SOUZA, 1997).

Entre as regiões mais comprometidas estão a porção frontal, centromedial da face e os lóbulos da orelha. O infiltrado favorece a acentuação dos sulcos naturais do rosto que somado ao outros aspectos da lesão caracteriza o que é conhecido como “face leonina”. O espessamento ocorre também nas mucosas nasais, orofaríngea e ocular. Histologicamente podemos observar uma epiderme atrófica, com uma faixa de Unna (faixa de fibras colágenas correspondente a derme papilar) e o infiltrado com tendência a difusão, atingindo a derme, hipoderme e órgãos. Há também a presença de células de Virchow, que são macrófagos contendo numerosos bacilos formando globias, gotículas de gorduras com aparência espumosa, vacuolizados e muito volumosos (BRASIL, 2002; HUBBARD & ROTHLEIN, 2000; RIDLEY & JOPLING, 1966; SOUZA, 1997).

Todo este processo gera o comprometimento de múltiplos troncos nervosos, de forma simétrica, os quais se tornam espessados e firmes, fibrosos, endurecidos levando à perda da função, atrofia muscular, paralisias, deformidades e contraturas progredindo ao comprometimento severo de órgãos e sistemas

**Forma *Borderline* OU DIMORFA:** neste caso podemos observar uma instabilidade imunológica, onde as características da lesão podem evoluir para um dos pólos da doença (tuberculóide ou virchoviano). O processo de desenvolvimento da resposta imunológica pode ser modulado por diversos fatores, sendo que o não tratamento pode conduzir o paciente para o polo anérgico da doença.

As lesões podem se apresentar com características virchovianas e tuberculóides. Por exemplo: o tecido espessado, de coloração ferruginosa simétrica ou não, máculas, eritematosas, em pele claras e hipocrômicas ou em peles escuras, sendo comum apresentarem pápulas, tubérculos, nódulos e placas (BRASIL, 2002; HUBBARD & ROTHLEIN, 2000; RIDLEY & JOPLING, 1966; SOUZA, 1997).

Os aspectos histopatológicos revelam infiltrados virchowianos e de granuloma tuberculóide. Presença de células gigantes, fenótipo imunológico instável e dependente de fatores que influenciem a relação entre o *Mycobacterium leprae* e o hospedeiro. Porém temos que levar em conta que mesmo com a dificuldade operacional da classificação proposta por Ridley & Jopling (1966), este formato nos permite uma visão mais ampla e fiel do modelo de lesão que ocorre durante a infecção, resultando em uma terapêutica personalizada e uma cura mais efetiva da doença. Permitindo também a execução de estudos que buscam elucidar a

patogenia do *M. leprae*. Este modelo proposto em 1966 descreve as seguintes formas clínicas da doença (BRASIL, 2002; RIDLEY & JOPLING, 1966; SOUZA, 1997).

Segundo a classificação de Ridley & Jopling podemos dividir esta forma em *Borderline-tuberculóide (BT)*, *Boderlin-lepromatoso (BL)* e *borderline-borderline (BB)*. A forma BT possui uma maior proximidade ao pólo tuberculóide apresentando áreas de lesão bem delimitadas, anestésicas e de superfície seca com pouco ou nenhum bacilo. Já a forma BL apresenta mais características do pólo virchowiano com lesões mais numerosas, brilhantes, menos delimitadas e uma perda, não tão intensa, da sensibilidade, além da presença de um número maior de bacilos (MENDONÇA, et al., 2008).

O grupo BB ou *borderline* clássico apresenta como características as lesões com aspecto anular, circulares, ovais ou faveolar. Esta última possui bordas pouco delimitadas, formando placas eritematosas, tipo queijo-suíço. A lesão anular possui um anel eritematoacobreado, mais delimitado interna e externamente (MENDONÇA, et al., 2008). Esta forma clínica é a mais instável, apresentando um polimorfismo de alterações que podem estar na forma de lesões cutâneas, de distribuição simétrica, com diversos tipos de dimensões, ou formação de máculas, pápulas e placas de tamanhos variados. Além da indefinição de margens das lesões apresentadas.

## **2.7 PAPEL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE**

Por ser uma doença espectral a Hanseníase varia entre os pólos tuberculóide (que se apresenta de forma localizada, com uma resposta imune celular vigorosa, poucos bacilos e lesões limitadas), ou na forma virchowiana, o pólo de extrema suscetibilidade ao *M. leprae*, no qual temos a proliferação disseminada do bacilo, com lesões difusas da pele e potente resposta humoral (MACHADO et al., 2004).

O espectro da doença é visível histologicamente onde o infiltrado reflete os dois pólos da doença. A forma Tuberculóide, apresenta um perfil de resposta Th1, onde podemos observar a formação de granuloma, constituído por um agregado de células fagocitárias mononucleares, presença de células gigantes multinucleadas do tipo Langhans no centro da lesão e com linfócitos que lhe conferem o halo do infiltrado (MACHADO et al., 2004).

O polo virchowiano ou Lepromatoso, o perfil Th2 é predominante e a lesão histopatológica ocorre na forma de um extenso infiltrado celular composto de histiócitos carregados de bacilos citoplasmáticos, multivacuolados, conferindo um aspecto de células

espumosas. Este infiltrado não atinge a camada basal da epiderme, ficando separado por uma faixa de fibras colágenas correspondente a derme papilar (faixa de Unna).

A resposta imunológica dos grupos de pacientes *borderline* é altamente complexa e instável, contendo características dos dois pólos. Neste espectro os pacientes *borderline-borderline* são os mais raros, e podem tender para um dos pólos, apresentando um número maior de bacilos, com células epitelióides difusamente espalhadas por todo o granuloma e não focalizadas por zonas de linfócitos, caracterizando a forma *borderline-lepromatosa* (BL) ou na forma *borderline-tuberculóide* (BT) onde é encontrada uma relativa resistência, lesões com um número menor de bacilos e o granuloma focalizados por zonas periféricas de linfócitos (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002).

Estudos imunohistoquímicos demonstram uma variação no padrão de citocinas, diferenciando as formas polares da doença. A forma tuberculóide pura (TT) apresenta um alto número de células positivas para IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Neste tipo de lesão os clones de linfócitos CD4<sup>+</sup> produzem altos níveis de IFN- $\gamma$ . Entretanto, nas lesões lepromatosas (LL) os clones de linfócitos CD8<sup>+</sup> são produtores de altos níveis de IL-4 e encontramos baixos índices de IFN- $\gamma$ . Este perfil resulta em uma resposta inadequada contra o *M. leprae*, resultando nas características clínicas vistas neste pólo da doença (COSSERMELLI-MESSINA & COSSERMELLI, 1995).

A produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  resulta na ativação do Antígeno Leucocitário Humano I (LFA-1) e também na síntese de moléculas co-estimuladoras e de adesão (ICAM-1), facilitando a interação entre as células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T. A IL-2 atua como fator autócrino induzindo a expansão clonal de células T produtoras de IFN- $\gamma$ , estas citocinas levam a um aumento na atividade dos macrófagos, resultando na produção de TNF- $\gamma$  o que favorece ainda mais atividade citolítica destas células (SPOELSTRA, et al., 1999; GOULART; PENNA & CUNHA, 2003).

Outro importante agente responsável pelo direcionamento para resposta Th1 é a IL-12. Esta citocina atua como um dos mais potentes fatores de crescimento para células T, e quando liberada ela age sobre as células NK estimulando a produção IFN- $\gamma$ , além de induzir a diferenciação de clones de células T CD4<sup>+</sup> com padrão Th1 (QUARESMA, et al., 2010).

No pólo Virchoviano da Hanseníase podemos observar uma tendência à resposta Th2, neste caso há altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, os quais contribuem para uma baixa ativação de macrófagos e uma falha na resposta contra o bacilo. O braço humoral desta resposta pode ser comprovado através da presença de altos índices de anticorpos anti-PGL-1. Além da presença de IL-4, que contribui para proliferação de Linfócitos B, exercendo assim um efeito

imunorregulatório através de um bloqueio na ativação dos monócitos, inibição da ação da IL-2 e redução dos eventos celulares contra o parasito (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002).

Estes processos resultam no paradigma dentre o perfil Th1 e Th2 da resposta imunológica. Embora os dois perfis de resposta coexistam na Hanseníase, o fenótipo Th1 está presente de forma mais efetiva nas lesões TT, onde podemos observar que a taxa CD4:CD8 é de 2:1. Na resposta Th2 a população de linfócitos CD8<sup>+</sup> predomina com uma taxa de CD4:CD8 de 0,6:1 (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002, MENDONÇA, et al., 2008).

Os Linfócitos T CD4<sup>+</sup> presentes no centro granuloma de paciente TT estão em justaposição com macrófagos e as células T CD8<sup>+</sup> contornam o granuloma. Estes linfócitos CD4<sup>+</sup> apresentam fenótipo T-memória e possuem papel primordial na ativação dos macrófagos, estimulando a sua maturação e destruição do parasita. Porém, na forma LL, as células CD8<sup>+</sup> estão associadas a macrófagos e células CD4<sup>+</sup>. Neste caso os linfócitos são primariamente do fenótipo *naïve* e os CD8<sup>+</sup> possuem o fenótipo T-supressor atuando na supressão da resposta imune mediada por células (GOULART; PENNA & CUNHA, 2002, MENDONÇA, et al., 2008).

Outras citocinas também contribuem para o efeito imunossupressor desta via, a IL-10 é produzida predominante em macrófagos, porém sua atuação pode induzir a uma diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> resultando em uma linhagem de linfócitos T-reg que tem um papel imunossupressor. Podemos citar também a presença do fator transformador de crescimento ou TGF- $\beta$ . Estudos demonstram que uma modificação de sinalização intracelular promovida pela própria atuação do *M. leprae* podem induzir a síntese deste fator. O TGF- $\beta$  atua como um dos mais potentes imunossupressores endógenos, resultando em uma inibição na atividade dos macrófagos, apoptose de células citotóxicas e contribuindo com a perpetuação da infecção. Os efeitos promovidos por estas citocinas se apresentam de forma diferente entre os pacientes com as formas TT e LL da doença. Um aumento espontâneo na apoptose de células mononucleares, especialmente linfócitos T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, pode ser observado em pacientes multibacilares, ocorre também uma redução na intensidade de ativação dos macrófagos presentes nestas lesões, sinalizando uma falha na capacidade destrutiva contra o bacilo (QUARESMA, et. al., 2010).

Entretanto, somado ao perfil de citocinas, temos que levar em conta a capacidade de escape que o *M. leprae* pode apresentar, através de antígenos PGL-1 e LAM (lipoarabinomanana) os quais potencializam a função supressora da ativação de macrófagos (SOARES, 2001).



## 2.8 PARTICIPAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA CASCATA DE MIGRAÇÃO CELULAR

O processo inflamatório é um dos principais mediadores da disfunção endotelial, atuando diretamente na ativação das células do vaso, e promovendo alterações que resultam em mecanismos pró-inflamatórios como a abertura de junções celulares, perda da barreira endotelial e remodelagem vascular. Além de participar da complexa relação entre as células endoteliais e os leucócitos sanguíneos, mediando através da expressão de adesinas a rolagem e migração de células em direção ao tecido inflamado.

O endotélio atua como uma das primeiras linhas de defesas contra agentes inflamatórios, atuando diretamente sobre a resposta imunológica inata e adquirida. Durante a fase inicial da inflamação, onde a resposta inata está mais presente, as células endoteliais levam a ativação de proteínas TLR mediando a resposta imunológica, principalmente através da expressão de receptores do tipo TLR2 e TLR4. O TLR2 é um agente crucial na resposta inflamatória contra bactérias e alguns outros agentes patogênicos, já o TLR4 é um forte regulador da resposta imunológica inata e adaptativa. Porém antes da ativação das células endoteliais estas moléculas se apresentam em baixa quantidade, e o sistema de ativação do endotélio leva a uma maior estimulação dos receptores TLR (JINGWEN & QING, 2014).

Além dos receptores padrões para antígenos do tipo 2 e 4 o endotélio é responsável pela expressão de mediadores da família das imunoglobulinas como as moléculas ICAM-1 e VCAM-1, outras adesinas como a E-selectina e a P-selectina também se apresentam em maior quantidade durante a resposta inflamatória, mediada principalmente pelos estímulos das citocinas. Estas adesinas são moléculas que se expressam de forma constitutiva na membranas de células endoteliais, porém quando os níveis de agentes pró-inflamatórios aumentam ocorre um estímulo levando a elevação da expressão destas adesinas. Este fato leva a uma maior interação entre os leucócitos sanguíneos e os seus ligantes endoteliais, atraindo estas células para a cascata que leva a rolagem, adesão firme e diapedese das células do sistema imunológico (JINGWEN & QING, 2014).

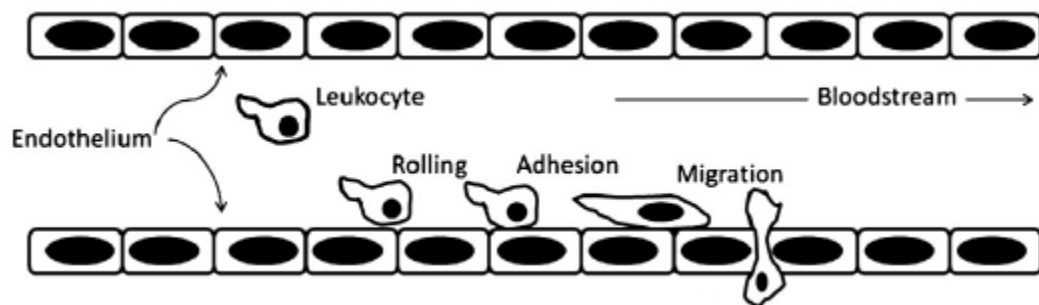
Durante a inflamação as células endoteliais sofrem a influência de diversos fatores que atuam diretamente na ativação do endotélio, facilitando a formação infiltrado inflamatório. Dentre os mecanismos responsáveis por esta alteração, se destaca o estresse oxidativo que atua como resultante da resposta imunológica, aumentando a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-2 e as Selectinas: CD62E e CD62P. Entretanto as citocinas do sistema imunológico atuam como agentes diretos na mediação do estresse

oxidativo, e também influenciam o mecanismo de adesão de leucócitos (DIMITRIS et al. 2013).

A resposta imunológica está associada ao aumento na expressão de citocinas como o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ , a IL-1a e IL-1b as quais atuam também sobre o aumento da expressão de moléculas de adesão. O IFN- $\gamma$  parece ser um dos mais importantes fatores indutores da expressão do MHC de classe II e também como um importante agente de formação de moléculas co-estimulatórias, incluindo as moléculas de adesão como o ICAM-1 e a E-selectina. O TNF- $\alpha$  leva ao aumento na expressão de moléculas como o VCAM-1 e ICAM-1. Sendo que dependendo do fenótipo e da intensidade dos estímulos inflamatórios podemos observar diferentes moléculas de adesão na membrana das células endoteliais, modificando o processo de rolagem e transmigração tecidual dos leucócitos (CÉCILE et al., 2012).

O mecanismo de transmigração celular através do endotélio só é possível com a ruptura da integridade da parede endotelial, mediada principalmente pelas alterações células induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias, uma cascata de eventos intracelulares levam a uma modificação sobre o citoesqueleto celular, o que permita o extravasamento de líquido, mediadores químicos e células em direção ao tecido. Este processo resulta na formação do edema perivascular e também na melhora do combate contra o agente parasitário diretamente no sítio da infecção.

Figura 07 – Sequencia da Migração Celular através do endotélio.



**Fonte:** adaptado de Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches, 2013.

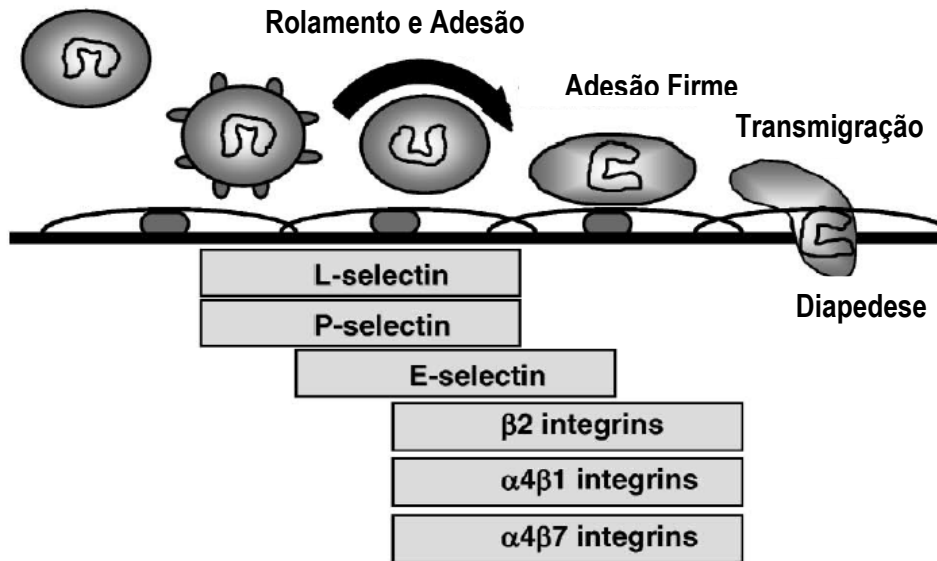
## 2.9 FORMAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Durante os eventos inflamatórios a formação do infiltrado e a sinalização intercelular ganham destaque como um importante fator que conduz para as formas polares da doença. Para que este processo ocorra será necessário uma sequência de etapas de sinalização, adesão e migração das células plasmáticas em direção ao tecido, que só são possíveis através da formação de complexos envolvendo moléculas co-estimulatórias de linfócitos, proteínas de

adesão celular e vascular além de citocinas indutoras da síntese destas moléculas (KUKLA, et. al., 2009).

O processo de migração ocorre através de quatro etapas principais: etapa de rolamento, etapa de adesão celular, etapa de diapedese ou transmigração e fase de migração tecidual.

Figura 08 – Etapas de Migração Celular e Moléculas de Adesão



Fonte: adaptado de The role of adhesion molecules in cutaneous inflammation, 2010.

**Rolamento:** inicialmente ocorre uma interação entre os ligantes celulares e endoteliais de forma fraca, mediado pela associação e dissociação das moléculas de adesão da célula, o que permite que cada célula reduza o seu movimento e inicie o seu rolamento em direção ao tecido, neste processo o TNF- $\alpha$  atua diretamente induzindo a produção de fator tecidual pelas células do endotélio, este fator leva a ativação da cascata de coagulação, e à inibição da trombomodulina resultando no aumentando da viscosidade do sangue e permitindo que as células fluam mais lentamente. A presença de TNF- $\alpha$  e IL-1 ativa também a expressão de selectinas que possuem o papel de proporcionar adesão de fraca afinidade das células sanguíneas ao endotélio vascular, facilitando assim a rolagem inicial do leucócito em direção a fenda de transmigração celular. Além disso participam desta etapa as quimiocinas como a MCP-1, IL-8, RANTES e MIP-1 $\alpha/\beta$ , que atuam no estímulo da expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos sanguíneos (KADONO, 2010; LAWSON & WOLF, 2009).

**Adesão celular:** durante esta etapa a célula inicia a sua associação ao endotélio de maneira mais firme (etapa de fixação firme), a presença de citocinas quimiotáticas produzidas

por macrófagos ativados, induz através da ativação de seus receptores o aumento da expressão de moléculas de adesão com alta afinidade proporcionando a forte adesão entre as moléculas expressas pelo endotélio e as células sanguíneas (KADONO, 2010; LAWSON & WOLF, 2009).

O TNF- $\alpha$  também atua nesta etapa induzindo a expressão de integrinas e imunoglobulinas que são responsáveis pela adesão firme. A presença de citocinas como a IL-8 resulta na expressão de integrinas com alta afinidade pelas imunoglobulinas facilitando assim o próximo passo que é a diapedese (KADONO, 2010).

**Diapedese:** neste momento a célula está aderida ao endotélio inicia-se então a fase de transmigração mediada pela presença de imunoglobulinas, como o PCAM-1 expressas pelas células do endotélio. Nesta etapa ocorre a penetração das células na membrana basal endotelial e nos espaços intersticiais, sendo assim a célula consegue prosseguir e ultrapassar a barreira endotelial. Este processo é mediado pela presença de proteínas juncionais e imunoglobulinas, as quais facilitam a entrada da célula no tecido (KADONO, 2010; LAWSON & WOLF, 2009).

**Migração Tecidual:** última fase do processo de migração ocorre quando as células chegam ao tecido, nesta etapa a presença de fatores quimiotáticos promove o direcionamento para esta célula, auxiliando também na expressão de adessinas que se relacionam com as estruturas da matriz extracelular presentes no local. Estes fatores quimiotáticos podem ter atividades específicas sobre um determinado tipo de célula, assim eles atuam direcionando o recrutamento seletivo destas células, um exemplo disso é a presença de IL-8 que aumenta a quimiotaxia dos neutrófilos ao tecido (KADONO, 2010; LAWSON & WOLF, 2009).

Porém, o deslocamento celular ocorre pela interação entre as moléculas de adesão expressas pelas células e as moléculas presentes na matriz extracelular. Durante esta etapa os leucócitos ultrapassam a barreira endotelial migrando através de proteínas de adesão como o PECAM-1, VE-caderina e moléculas juncionais (JAMs) (LUDWING, et al., 2009).

O mecanismo visto nas etapas de migração celular envolve a atuação de um conjunto de moléculas de adesão com diferentes características estruturais. Este conjunto de adessinas pode ser dividido em selectinas, ligantes de selectinas, integrinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas. Algumas destas moléculas estão relacionadas na tabela nº 01 logo abaixo.

Tabela 01 – Moléculas de adesão e seus ligantes expressos durante as etapas de migração celular.

<b>ETAPAS DE MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO</b>	
<b>Rolagem e Adesão Fraca</b>	<b>Ligantes</b>
L- Selectina	Sialyl Lewis X, CD3, GlyCAM-1)
PSGL-1	P-selectina
Syalyl Lewis X	E-selectina
<b>Adesão Firme</b>	<b>Ligantes</b>
LFA-1	ICAM-1
Mac-1	ICAM-1
$\alpha_4\beta_1$ Integrina	VCAM-1
$\alpha_4\beta_7$ Integrina	MAdCAM-1, VCAM-1
<b>Transmigração</b>	<b>Ligantes</b>
PECAM-1	PECAM-1
LFA-1, Mac-1	ICAM-2
JAM-A, LFA-1	JAM-A
$\alpha_4\beta_1$ Integrina	JAM-B
JAM-C, Mac-1	JAM-C

Fonte: adaptado de the role of adhesion molecules in cutaneous inflammation, 2010.

**Selectinas e ligantes de selectinas:** foram descritas três diferentes selectinas a E-selectina (CD62E), presente no endotélio, L-selectina (CD62L) presente principalmente nos leucócitos e a P-selectina (CD62P) presente principalmente nas plaquetas e no endotélio. Apesar de estarem presente nas membranas destas células, algumas selectinas não são constitutivas e a sua expressão é induzida pela presença de fatores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , IL-1, isso acontece com a E-seletina que se expressa no endotélio aproximadamente seis horas após sua ativação. A molécula CD62E não se apresenta no endotélio em condições basais, porém rapidamente é induzida pelo processo inflamatório, através da sua translocação para superfície depois da ativação da célula endotelial (GRAILER, KODERA, STEEBER, 2010; SIMINIYAK, et al., 1997; KAISA, SIRPA, MARKO, 2014; OKANISHI, KAGAWA, WATARI, 2014).

Porém ao contrario da CD62E a L-selectina é constitutiva da membrana de leucócitos (principalmente linfócitos navie, memória, neutrófilo, monócitos e eosinófilos), já a P-

selectina está pré-estocada em células em repouso, sendo translocada para superfície celular quanto ocorre ativação por histamina, trombina e ânion superóxido (GONZÁLEZ-AMARO, et al., 2000; SIMINIAK, et al., 1997).

Todas as selectinas se ligam aos açúcares do tipo sulfatado, os quais recebem o nome de Sialil Lewis X, estas estruturas estão presentes principalmente no endotélio ativado, mas também se encontram nos linfócitos sanguíneos. Porém existem afinidades mais específicas entre as selectinas e outros ligantes como, por exemplo, a P-selectina que se liga ao PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), sendo assim podemos perceber que este ligante possui uma alta afinidade por esta selectina (RAJENDRAN, et al., 2011; SIMINIAK, et al., 1997).

**Integrinas e os ligantes de integrinas (superfamília das imunoglobulinas):** estas moléculas possuem cadeias estruturais do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ . Podemos enumerar ao menos oito tipos de cadeias  $\beta$  e mais de nove tipos de cadeia  $\alpha$  as quais podem formar inúmeros heterodímeros com diferentes funções na migração celular. As funções mais conhecidas são das moléculas com que possuem as cadeias  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , as cadeias  $\beta_2$  são conhecidas como CD18 e podem estar associadas as diferentes cadeias  $\alpha$  (CD11), desta forma podemos descrever diferentes moléculas formadas por várias combinações (EVANS, et al., 2009; HALACHEVA, et al., 2002).

- $\alpha_1\beta_2$  – CD11a/CD18; LFA-1;
- $\alpha_m\beta_2$  – CD11b/CD18; Mac-1;
- $\alpha_x\beta_2$  – CD11c/CD18; p150,95
- $\alpha_d\beta_2$  – CD11d/CD18
- $\alpha_1\beta_1$  – VLA-1
- $\alpha_2\beta_1$  – VLA-2; CD49b/CD29
- $\alpha_3\beta_1$  – VLA-3; CD49d/CD29
- $\alpha_4\beta_1$  – VLA-4; CD49d/CD29
- $\alpha_5\beta_1$  – VLA-5
- $\alpha_6\beta_1$  – VLA-6

As moléculas do tipo  $\beta_2$  participam ativamente da etapa de adesão celular e diapedese, ligando-se principalmente as imunoglobulinas presentes no endotélio vascular. Durante esta etapa da migração celular ocorre a adesão firme entre as integrinas  $\beta_2$  com o seu ligante (ICAM-1), sendo um processo primordial na migração celular, onde alguns estudos apontam para uma redução da resposta inflamatória cutânea quando bloqueamos esta integrina ou o seu ligante (KADONO, 2010).

A estrutura  $\beta_1$  pode se associar com todas as moléculas  $\alpha$ , formando importantes integrinas que tem como papel principal a ligação com a matriz extracelular. Estas moléculas são denominadas antígenos tardios ou VLA que dependendo da sua sub-estrutura  $\alpha$  pode ser classificado como VLA-1 ( $\alpha_1\beta_1$ ), VLA-2 ( $\alpha_2\beta_1$ ), VLA-3 ( $\alpha_3\beta_1$ ), VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) e outros. Estas moléculas se ligam as estruturas da matriz extracelular como a fibronectina, laminina e colágeno. Porém o VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) é um dos poucos que excede a esta regra, ligando assim a imunoglobulina VCAM-1 participando das etapas de adesão celular e transmigração (MARTIN et al., 2014; FUTOSI, FODOR, MÓCSAI, 2013).

## **2.10 SUPERFAMÍLIA DAS IMUNOGLOBULINAS:**

Os ligantes das integrinas são pertencentes a superfamília das imunoglobulinas. Existem cinco moléculas principais pertencentes ao grupo que participa do processo de migração celular, são estas o ICAM-1 ou CD54 (expresso no endotélio ativado), ICAM-2 ou CD102 (expresso no endotélio em repouso) e ICAM-3 ou CD50 (presente principalmente nas células apresentadora de antígeno e atuando assim na sinalização celular aos linfócitos T CD4+), o VCAM-1 (expresso no endotélio, macrófagos, células dendríticas e estroma da medula óssea) e o MadCAM-1 (presente no endotélio de vênulas dos linfonodos) (MONCADA et al., 1993). A expressão do ICAM-1 e do VCAM-1 nas células endoteliais demonstra ativação deste endotélio, sendo este um processo primordial na atuação dos leucócitos durante a resposta imunológica. Apesar destas moléculas estarem em baixa concentração no endotélio em repouso, durante a inflamação seus níveis aumentam de forma significativa demonstrando assim o importante papel que estas imunoglobulinas exercem (HUBBARD & ROTHLEIN, 2002; LAWSON & WOLF, 2009; RAJENDRAN, et al., 2011).

Tabela 02 – Integrina e o ligante de integrina (Imunoglobulina)

<b>Integrina</b>	<b>Presença na Célula</b>	<b>Ligante – Imunoglobulina</b>
LFA-1	Monócitos, granulócitos, linfócitos	ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3
CR3 (CD11b/CD18)	Células mielóides, NK)	ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 e iC3b
CR4 (CD11/CD18)	Células dendríticas, macrófago, neutrófilos, NK	iC3b
VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ )	Células de Memória	VCAM-1
VLA-5 ( $\alpha_5\beta_1$ )	Linfócitos T memória, monócitos, plaquetas	VCAM-1

Fonte: adaptado de the role of adesion molecules in curtaneous inflammation, 2010.

Estruturalmente as imunoglobulinas se apresentam como uma molécula transmembrana que possui uma porção extracelular protéica e um pequeno domínio citoplasmático. O domínio interno do ICAM-1 aparentemente se relaciona com as proteínas do citoesqueleto, actina e outras moléculas estruturais citoplasmáticas. Esta relação resulta em uma sinalização intracelular que promove, não somente, a migração de leucócitos, mas também no aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular, ativação de proteínas quinases, fatores (NF $\kappa$ B) e vias transcrição. Isso tudo leva em uma regulação sustentada e positiva da produção de citocinas pró-inflamatórias, e da própria produção de moléculas de adesão. Apesar dos mecanismos exatos deste processo não estarem completamente elucidados, esta cascata de sinalização parece ser extremamente importante durante a resposta inflamatória (HUBBARD & ROTHLEIN, 2002; LAWSON & WOLF, 2009; RAJENDRAN, et al., 2011).

## **2.11 RELAÇÃO ENTRE PERFIL DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA Th1 E Th2 E A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO**

O reconhecimento de antígenos apresentados pelas APCs é realizado pelos linfócitos T auxiliares através de receptores do tipo MHC classe II com ajuda das proteínas co-estimulatórias. Este processo conduz os Linfócitos T CD4 a se diferenciarem em Linfócitos T efetores do tipo Th1 ou Th2. O perfil resposta imunológica e a sua polarização é dependente de diversos fatores, dentre eles podemos citar a afinidade entre as moléculas presentes nas APCs e no próprio linfócito T, além da presença de citocinas pró-inflamatórias.



O padrão de citocinas afeta também as fases de migração celular, modificando o perfil de expressão das adressinas. A etapa de rolamento, por exemplo, tem como principais estimuladores a presença de TNF- $\alpha$ , IL-1 e INF- $\gamma$ , os quais aumentam na expressão das moléculas E-selectina e P-selectina pelas células endoteliais. Isso pode ser visto em resposta com perfil Th1, onde observamos a expressão de altas taxas de PSGL-1 o qual tem alta afinidade por estas selectinas. Na pele a expressão de integrinas vista nos linfócitos T efetores permite que estas células iniciem a fase de rolagem. Porém as células Th2 expressam um PSGL-1 com baixa afinidade pela E-selectina e P-selectina, resultando assim em uma possível modificação na migração de células com este perfil (KADONO, 2010).

Em estudos que avaliaram o processo de rolagem demonstraram que o bloqueio com anticorpos da P-selectina não influencia a rolagem de linfócitos do tipo Th1. Porém, o bloqueio das integrinas  $\alpha_4$  demonstrou exercer uma redução significativa em aproximadamente 70% do influxo dos linfócitos Th1 em direção ao tecido, este processo foi visto em células do endotélio pós sinusoidais do tecido hepático inflamado. Outras avaliações na pele demonstraram que neste tecido a P-selectina exerce um papel extremamente importante na rolagem e no recrutamento de linfócitos com perfil Th1, o bloqueio desta selectina parece não interferir somente no recrutamento dos linfócitos, mas também é importante na migração de neutrófilos, reduzindo em até 40% o influxo destas células para o tecido (XU et al., 2004). Avaliação da migração de células da linhagem Th2 não demonstrou ser influenciada pelo bloqueio da P-selectina ou das integrinas  $\alpha_4$  (BONDER et al., 2005).

A possível seletividade das imunoglobulinas no recrutamento de células Th1 ou Th2 não esta totalmente elucidada, entretanto o bloqueio da imunoglobulina VCAM-1 resultou também em uma inibição da adesão de linfócitos Th1. Isso demonstra também a o importante papel da integrina  $\alpha_4\beta_1$  a qual é o ligante do VCAM-1. Devemos ressaltar ainda a preferência das células Th1 pelo VCAM-1 durante a migração. Este estudo também demonstrou que o bloqueio do ICAM-1 e do VCAM-1 influencia na migração dos linfócitos T CD8+ modificando assim a presença de células citotóxicas no tecido (BONDER et al., 2005; RADHAKRISHNAM, et al., 2007).

Os altos níveis de IL-4 e a presença de TGF- $\beta$  atua reduzindo a expressão de VCAM-1 resultando em uma modificação na formação do infiltrado inflamatório. Podemos verificar ainda que o aumento na expressão de VCAM-1 esta correlacionado a uma maior presença de macrófagos no infiltrado e uma concomitante presença de linfócitos CD4+ e CD8+ no tecido inflamado (HENSELEIT, et al., 1995; KADONO, 2010; SPOELSTRA, et al., 1999).

Desta forma correlacionamos a expressão das moléculas de adesão ao perfil de resposta imunológica presente na lesão. Na hanseníase os pacientes com a forma lepromatosa apresentam uma resposta imunológica com o perfil Th2 o que resulta em uma baixa expressão de ICAM-1 e LFA-1, este fato pode contribuir na modulação da resposta imunológica e assim auxiliar na disseminação da doença (SULLIVAN, *et.al.* 1991; ISHII, *et.al.* 1993). Porém, o papel destas moléculas no recrutamento de Linfócitos T em direção ao tecido parece ser bem mais complexo. Em lesões crônicas a expressão de E-selectina é sustentada pela presença contínua da IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , assim podemos verificar que a presença de linfócitos T pode manter o estado de ativação do endotélio e o aumento de expressão de adesinas, conseqüentemente a manutenção no recrutamento de células (HAWORTH, *et al.*, 2008; SUNDERKOTTER, *et al.*, 1996; DE VRIES, *et al.*, 1998).

As linhagens de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressam diferentes moléculas de adesão, apesar destas integrinas não distinguirem entre as linhagens de linfócitos, podemos observar que as células T CD4<sup>+</sup> expressam uma maior quantidade de moléculas do tipo CD11b e CD11c, as quais se relacionam com ICAM-1 e VCAM-1 respectivamente. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também expressam CD11b e CD11c porém, as células T CD8<sup>+</sup> supressoras apresentam somente CD11b e a linhagem de T CD8<sup>+</sup> citotóxica expressam CD11c. Todos os linfócitos possuem em sua membrana a forma CD11a, que parece não variar de acordo com a linhagem de células. As integrinas de classe  $\beta$ 1 não restringem as classes específicas de linfócitos. Porém foi observado que esta molécula está presente em maior proporção nas células T CD8<sup>+</sup> do que nas T CD4<sup>+</sup> (AGREWALA, KUMAR, VOHRA, 1997; CAVERS, *et al.*, 2002).

Outras moléculas também diferem quanto à linhagem de células, é o caso da L-selectina (CD62L) que está presente, em altas quantidades, nas células T CD4<sup>+</sup>, fato este que pode contribuir para o acúmulo destas células, observado nos processos inflamatórios crônicos (CAVERS, *et al.*, 2002). O conjunto destas interações moleculares aponta para uma seletividade em relação às linhagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> que migram em direção ao ambiente tecidual demonstrando que a presença destas células no tecido não representa um infiltrado aleatório, e que há uma possível seleção endotelial exercida por moléculas de adesão (BONDER, *et al.*, 2005; CAVERS, *et al.*, 2002; COSTA, *et al.*, 2003; OGAWA, *et al.*, 2010).

O fato da hanseníase apresentar-se como uma doença espectral pode correlacionar com todos estes achados imunológicos. Porém, não sabemos qual o perfil de moléculas de adesão que estão expressas nas formas polares da hanseníase. Além disso, não está claro qual

a influência que o endotélio pode exercer sobre o tipo de linfócitos recrutados nesta lesão tecidual.

### 3. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser conhecida pelo homem há milhares de anos, a hanseníase continua atingindo milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil a infecção pelo *Mycobacterium leprae* ainda está longe de ser controlada. O Pará é um dos estados que mais apresenta casos, chegando a índices hiperendêmicos, com mais 4,5 casos para cada 10.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Vários fatores dificultam o controle e combate a infecção causada pelo *M. leprae*. A resposta imunológica é preponderante para determinar o curso clínico e o prognóstico da doença. Neste sentido o endotélio vascular in loco e a interação dos seus ligantes com ligantes das células inflamatórias sanguíneas, contribui de maneira central em uma resposta específica. Conhecer através das moléculas de adesão, a estreita relação que ocorre entre o endotélio e as células do sistema imunológico pode ajudar a definir o caminho que leva ao desenvolvimento das formas clínicas de Hanseníase.

A seleção de diferentes linhagens de linfócitos exercida pelo endotélio foi vista nas hepatites virais, comprovando também a ação de diferentes integrinas e moléculas de adesão celulares neste processo (BONDER, et al., 2005). Porém, ainda não há estudos conclusivos que demonstre como isso pode ocorrer nas formas polares da Hanseníase, sabemos somente a o perfil da resposta imunológica encontrada nos dois polos pode influenciar a expressão de selectinas e imunoglobulinas pelo endotélio, resultando assim em uma possível seleção das células que seguem em direção ao combate do bacilo.

Outro fator que justifica o nosso estudo é o de que na hanseníase o padrão imunológico celular presente no sangue nem sempre é visto no ambiente tecidual, criando assim uma lacuna de como este processo ocorre. A análise proposta pelo nosso estudo pode auxiliar na elucidação das características de migração de células em direção ao tecido inflamado, demonstrando o papel do endotélio nesta seletividade e também as diferentes características do perfil de expressão das formas polares de infecção.

Outros estudos já apontam para diferentes perfis de expressão das adesinas endoteliais nos diferentes polos de doenças espectrais, demonstrando uma diferença na expressão e imunoglobulinas, selectinas e integrinas com relação a presença da resposta imunológica do tipo Th1 em comparação ao perfil Th2 (SULLIVAN, et.al. 1991; ISHII, et.al. 1993). Porém,

estas características ainda não estão claras na infecção pelo bacilo da Hansen, o que fortalece a necessidade do estudo proposto.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil da expressão de moléculas de adesão e a participação do endotélio na seleção de células para a formação do infiltrado inflamatório presente na Hanseníase e correlacionar estes achados com as formas clínicas polares da doença.

##### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar a expressão das moléculas de adesão: ICAM-1; ICAM-2, VCAM-1; VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ); E-selectina; P-selectina; nos cortes histológicos estudados.
- Analisar a expressão das moléculas de adesão de acordo com o tipo ao padrão do infiltrado histopatológico expresso nos polos tuberculóide de virchoviano da infecção.
- Avaliar de forma quantitativa a presença das moléculas de adesão e correlacionar estas adesinas com os diferentes padrões celulares vistos nos dois polos da infecção.

#### **5. METODOLOGIA**

##### **5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Foram utilizados 30 blocos de parafina que continham amostras de pele de pacientes que realizaram o exame histopatológico. Os blocos foram retirados do arquivo de exames Histopatológicos do Laboratório Celso Matos de Santarém-PA. As amostras de pele foram coletadas entre os anos de 2009 a 2011. O material foi classificado de acordo com as características histológicas apresentadas, seguindo o laudo emitido em cada amostra.

As amostras de pele foram seccionadas em micrótomo a uma espessura de 5- $\mu$ m. As porções retiradas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e pelo método de Ziehl-Neelsen, para que fossem realizadas as avaliações morfológicas. As lâminas já coradas foram analisadas utilizando como parâmetros: atrofia da epiderme, zona subepidérmica livre de infiltrado inflamatório, distribuição do infiltrado inflamatório, presença de células epitelióides e células gigantes, linfócitos, presença de granuloma, envolvimento neural e presença e quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Assim as amostras foram agrupadas nos dois polos da infecção, sendo que os cortes histológicos que apresentavam as características como infiltrado perineural, perivascular e periglandular dos histiócitos contendo bacilos, com a formação de globias (células de Virchow) e alta carga de bacilos

eram classificado como polo virchoviano e as amostras que apresentavam presença de granuloma tipo tuberculóide de células epitelióides, linfócitos, células gigantes tipo Langhans e baixa quantidade de bacilos foram classificadas como polo tuberculóide. Posteriormente os cortes histológicos das diferentes amostras foram submetidas a análise imunohistoquímica através de anticorpos monoclonais contra as adesinas ICAM-1; ICAM-2 ; VCAM-1; VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ); P-selectina e a E-selectina.

## 5.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

Utilizou-se o método imunohistoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase, segundo o protocolo de Hsu *et al* (1981), parcialmente adaptado por Quaresma *et al* (2006).

Para as etapas iniciais de desparafinização e hidratação os cortes foram colocados em estufa pré-aquecida a 60°C, durante 12 horas. Em seguida, foram imersos em xilol I e II (20 e 10 minutos, respectivamente), álcool etílico absoluto I e II (5 e 2 minutos, respectivamente), álcool etílico 90%, 80% e 70% por 2 minutos, cada. No fim desta etapa as lâminas foram lavadas por 1 minuto em água destilada e 5 minutos em PBS (tampão fosfato salino).

Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em três incubações de quinze minutos cada, em câmara escura.

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6 a 95 °C em Câmara de Pascal, por 20 minutos, seguida da lavagem das lâminas em água destilada por 1 minuto e PBS por 5 minutos.

Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário diluído em BSA 1% em câmara úmida a 4-8 °C por 12 a 14 horas.

As lâminas foram lavadas duas vezes por cinco minutos cada em PBS para posterior incubação com anticorpo secundário biotilado por 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em PBS, os preparados foram incubados com Estreptavidina durante 30 minutos a 37°C. Após lavagem, os cortes foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina acrescida de peróxido, seguindo recomendações do fabricante.

Após lavagem em água corrente, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Meyer's por dois minutos. As lâminas foram submetidas às etapas de desidratação em concentrações crescentes de álcool. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com lamínulas e Permount.

### 5.3 RELAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA

Especificações dos anticorpos primários utilizados para imunomarcação em biópsias de pele de pacientes com hanseníase e suas respectivas diluições:

Tabela 03 – Relação de anticorpos primários utilizados no estudo.

Anticorpo primário	Descrição	Diluição/ Tempo de Incubação	Fabricante
$\alpha_4\beta_1$ – VLA-4; CD49d/CD29 ICAM-2 ou CD102	Ac monoclonal de coelho anti Integrin alpha 4 clone (EPR1355Y)	1:100 Overnight	Novus Biologicals
	Ac policlonal de coelho anti-ICAM2	1:200 Overnight	Novus Biologicals
VCAM-1	Ac monoclonal de cam clone [1.4C3] anti VCAM1, prediluted	Pronto para uso Overnight	Abcam
		1:100	
ICAM-1 ou CD54	Ac de cam anti ICAM1, Clone MEM-111	Overnight	Abcam
	Ac monoclonal de cam clone [AK-6] anti	1:100	
P-selectina (CD62P)	CD62P	Overnight	Abcam
	Ac monoclonal de cam clone [16G4] anti	1:100	
E-selectina (CD62E)	CD62E	Overnight	Abcam

### 5.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS

Para contagem das células marcadas por imunohistoquímica com os anticorpos citados anteriormente, os cortes foram observados e analisados em microscópio Zeiss, modelo 456006 com a lente A-plan objetiva de 40x. Selecionaram-se aleatoriamente cinco campos diversos na área do infiltrado inflamatório dérmico das lesões histológicas. Uma vez determinada a quantidade de células presentes, obteve-se a média das células dos diversos campos, com resultados expressos em células por campo.

### 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados estatisticamente através do programa Graph Pad Software, San Diego, CA Prism 5.0®. Os resultados foram expressos de modo quantitativo e submetidos aos testes estatísticos t de Student e Correlação Linear de Pearson r, sendo  $p < 0,05$ , estabelecido como nível de significância.

## 5.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Amostras coletadas entre os anos de 2009 a 2011 confirmadas pelo laudo como positiva para mal de hansen e que tenha características histológicas das formas polares da doença.

## 5.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Amostras que não tiveram o laudo confirmatório como positiva para infecção pelo *Mycobacteriu leprae* ou que o laudo indicava a forma indeterminada da doença, a qual não é objeto do estudo.
- Amostras que não possuíam material suficiente para confecção de laminas ou que a quantidade de material era escassa, ao ponto de comprometer o armazenamento de uma parte, para o retorno ao arquivo de blocos do laboratório.

## 5.8 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O projeto foi enviado ao comitê de ética de acordo com a resolução do CNS nº 196/96, sendo aprovado através do Parecer Número 103.560 de 21/09/2012 e todos os procedimentos de biossegurança foram tomados para minimizar os riscos do estudo.

Com relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) e todo material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório foram descartados de modo seguro de acordo com o manual de segurança do Laboratório.

O material biológico foi armazenado sob a responsabilidade dos pesquisadores e instituição que realizara os testes. Sendo que o sigilo e respeito à confidencialidade foi mantido através da codificação das amostras. Foi criado um mecanismo de contato que assegure a possibilidade de contato com os doadores para o fornecimento de informações do seu interesse caso seja necessário.

## 5.9 AVALIAÇÃO DE RISCOS

- A população estudada está sob o risco de quebra de sigilo sobre a identidade do pesquisado ou da perda do material coletado.
- Porém para que não ocorra a quebra do sigilo os laudos foram codificados e somente o pesquisador responsável manipulará as amostras e também os laudos.

- Para que não ocorra a perda do material coletado, todas as amostras foram previamente analisadas, dispensando o uso de blocos que estejam com material escasso ou que não tinham uma estrutura adequada para o corte histológico.

#### **5.10 AVALIAÇÃO DE BENEFÍCIOS**

- A conclusão do estudo deve auxiliar na descrição do processo fisiopatológico que envolve a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, assim melhorar o entendimento dos mecanismos que levam as lesões na hanseníase.
- Auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos que permitem a suscetibilidade do indivíduo e a polarização da doença.
- O estudo também complementa outros trabalhos que juntos permitirão traçar o caminho que envolve a contaminação e processo inflamatório da lesão causada pela doença.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE COMPARATIVA DOS IMUNOMARCADORES ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P ENTRE OS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECCÃO

As amostras de hanseníase que continham as formas polares da doença foram analisadas de forma quantitativa. Os resultados foram avaliados através comparação entre a forma tuberculóide e a forma virchoviana da infecção, realizou-se também a correlação de presença dos anticorpos entre os imunomarcadores estudados.

A imunomarcação da adesina ICAM-1 demonstrou, de forma significativa ( $p=0,0084$ ), que esta molécula está presente em um maior número de células endoteliais na forma tuberculóide (TT) com  $9,92\pm 1,11$  células/ $\text{mm}^2$ , quando comparado com as amostras do polo virchoviano (LL) que apresentaram  $5,87\pm 1,01$  células/ $\text{mm}^2$  (Fig. 9).

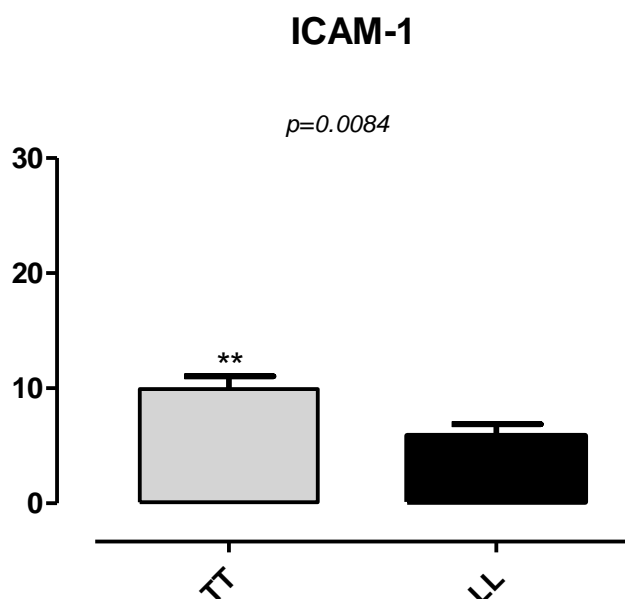


Figura 9 – Análise quantitativa da imunomarcação de ICAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase. Cada barra representa a médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT e LL in situ das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri. \*\* Representa que as amostras das formas TT apresentaram um número significativamente ( $p=0,0084$ ) maior de células endoteliais marcadas em comparação aos valores obtidos com a imunomarcação das amostras LL (Teste t Student).

Análise da presença da molécula ICAM-2 demonstrou que não há diferença significativa ( $p=0,5160$ ) no número de células endoteliais que expressaram ICAM-2, quando comparamos as amostras das formas tuberculóides ( $13,21\pm 1,27$  células/ $\text{mm}^2$ ) em relação as amostras que apresentaram o polo virchoviano ( $14,30\pm 1,02$  células/ $\text{mm}^2$ ) (Fig. 10).

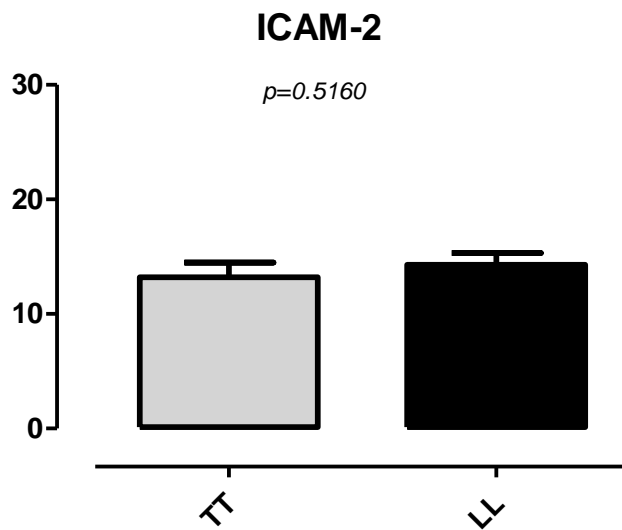


Figura 10 - Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-2 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase. Cada barra representa a médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT e LL in situ das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri. Análise estatística não demonstrou diferença significativa ( $p=0,5160$ ) na comparação entre as amostras estudadas (Teste t Student).

O número de células endoteliais imunomarcadas para molécula VCAM-1 demonstrou ser significativamente ( $p=0,0002$ ) maior na forma tuberculóide. Análise quantitativa mostrou que as biopsias de pele da forma tuberculóide da doença, apresentaram em média  $18,28\pm 1,46$  células/mm<sup>2</sup> marcadas para adesina VCAM-1, quando comparada a forma virchoviana que apresentou em média  $10,67\pm 1,25$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 11).

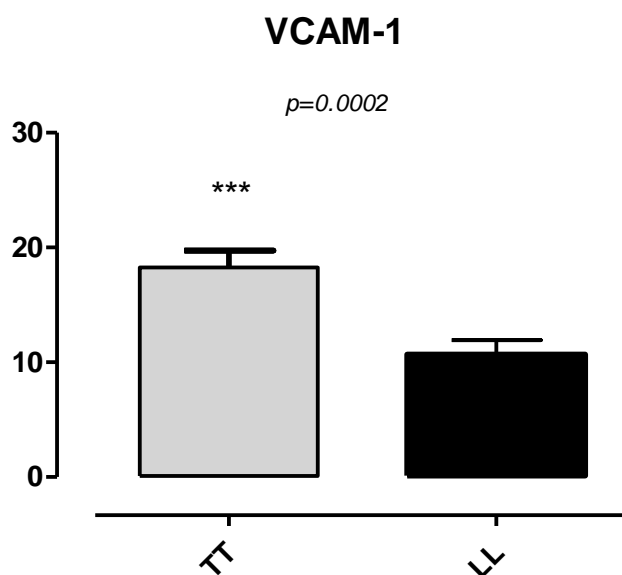


Figura 11 - Análise quantitativa da imunomarcção de VCAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase. Cada barra representa a médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT e LL in situ das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri. \*\*\* Representa que as amostras das formas TT apresentaram um número significativamente ( $p=0,0002$ ) maior de

células endoteliais marcadas em comparação aos valores obtidos com a imunomarcagem das amostras LL (Teste t Student).

Semelhante ao seu ligante VCAM-1 a integrina VLA-4 também demonstrou, de forma significativa ( $p=0,0024$ ), estar mais presente nas amostras do polo tuberculóide da infecção. Estas amostras apresentaram  $22,46\pm 1,38$  células/mm<sup>2</sup> marcadas pelo anticorpo Anti-VLA-4 em comparação ao polo virchoviano que mostrou apenas  $16,04\pm 1,56$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 12).

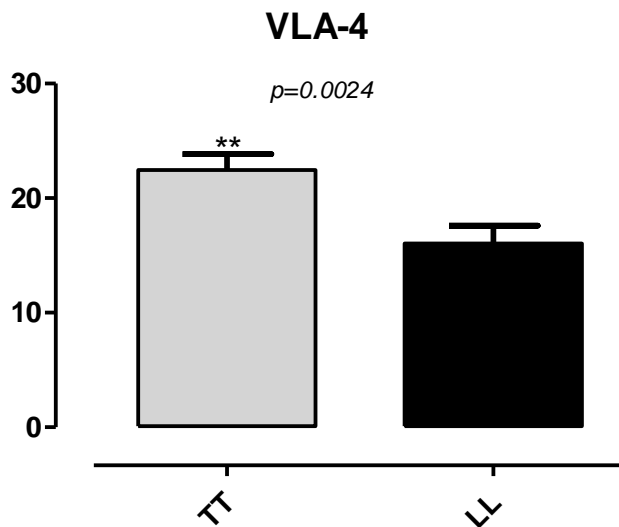


Figura 12 – Análise quantitativa da imunomarcagem de VLA-4 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase. Cada barra representa a médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT e LL in situ das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri. \*\* Representa que as amostras das formas TT apresentaram um número significativamente ( $p=0,0024$ ) maior de células endoteliais marcadas em comparação aos valores obtidos com a imunomarcagem das amostras LL (Teste t Student).

A avaliação da imunomarcagem das duas selectinas (E-Selectina e P-Selectina) presentes no endotélio, foi realizada e realizou-se a comparação dos dados das biopsias de pele com características do polo tuberculóide versus virchoviano da doença. Com relação a presença destas adesinas, podemos perceber que houve uma diferença significativa na imunomarcagem destas estruturas entre as formas polares da doença. Verificamos que no polo tuberculóide da infecção há uma quantidade ( $13,00\pm 1,59$  células/mm<sup>2</sup>), significativamente ( $p<0,0001$ ) maior da E-Selectina em comparação ao polo virchoviano que apresentou apenas  $2,58\pm 0,38$  células/mm<sup>2</sup> desta mesma molécula (Fig. 13).

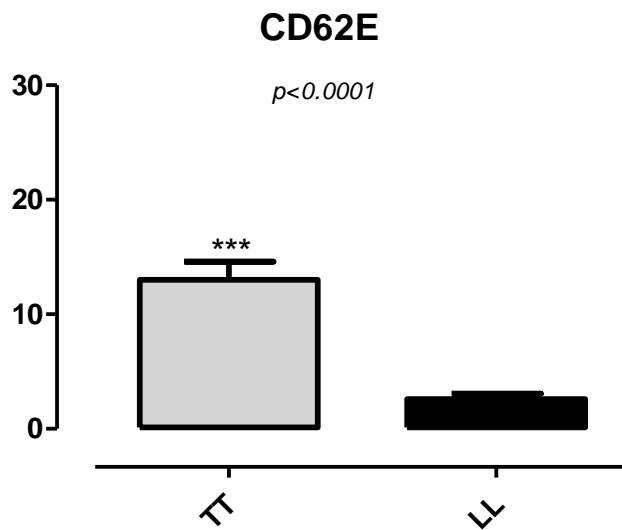


Figura 13- Análise quantitativa da imunomarcção de E-Selectina nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase. Cada barra representa a médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT e LL in situ das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri. \*\*\* Representa que as amostras das formas TT apresentaram um número significativamente ( $p < 0,0001$ ) maior de células endoteliais marcadas em comparação aos valores obtidos com a imunomarcção das amostras LL (Teste t Student).

Quando realizamos análise da presença da P-Selectina, observamos uma diferença no perfil de imunomarcção desta molécula quando comparado ao que foi visto na marcação da E-Selectina. Avaliação demonstrou que a CD62P está mais presente no polo virchoviano da infecção, que expressou em média  $3,25 \pm 0,56$  células/ $\text{mm}^2$  em comparação ao polo tuberculóide que apresentou apenas  $1,17 \pm 0,24$  células/ $\text{mm}^2$  endoteliais marcadas para esta adesina ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 14).

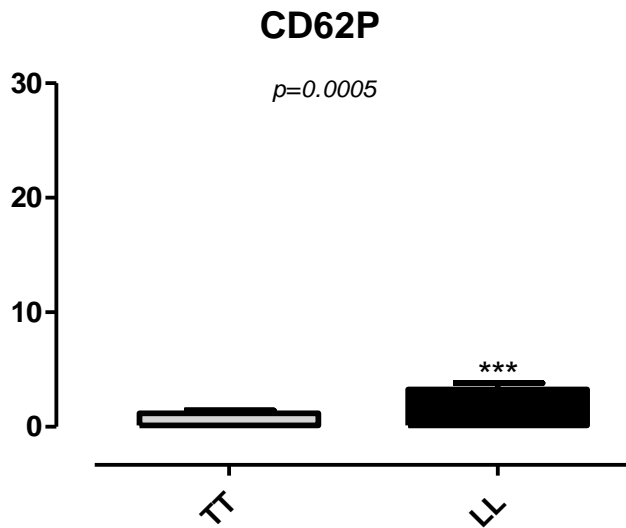


Figura 14- Análise quantitativa da imunomarcção de P-Selectina nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase. Cada barra representa a médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT e LL in situ das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri. \*\*\* Representa que as amostras das formas LL apresentaram um número significativamente ( $p<0,0001$ ) maior de células endoteliais marcadas em comparação aos valores obtidos com a imunomarcção das amostras TT (Teste t Student).

## 6.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO ICAM-1 *versus* ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

A análise de comparação realizada entre os marcadores ICAM-1 *versus* ICAM-2 demonstrou em ambos os polos da infecção houve uma maior presença da molécula ICAM-2. Porém somente na forma virchoviana da doença este resultado foi significativo com valor de  $p<0,0001$ , apresentando uma média de  $6,61\pm 0,99$  células/mm<sup>2</sup> para o marcador ICAM-1 e  $11,73\pm 1,18$  células/mm<sup>2</sup> para o marcador ICAM-2, apesar de percebermos uma maior presença da imunomarcção da molécula ICAM-2, também no polo tuberculóide da infecção, o teste estatístico não demonstrou haver uma diferença significativa apresentando um valor de  $p=0,2138$  (Fig. 15, A e B).

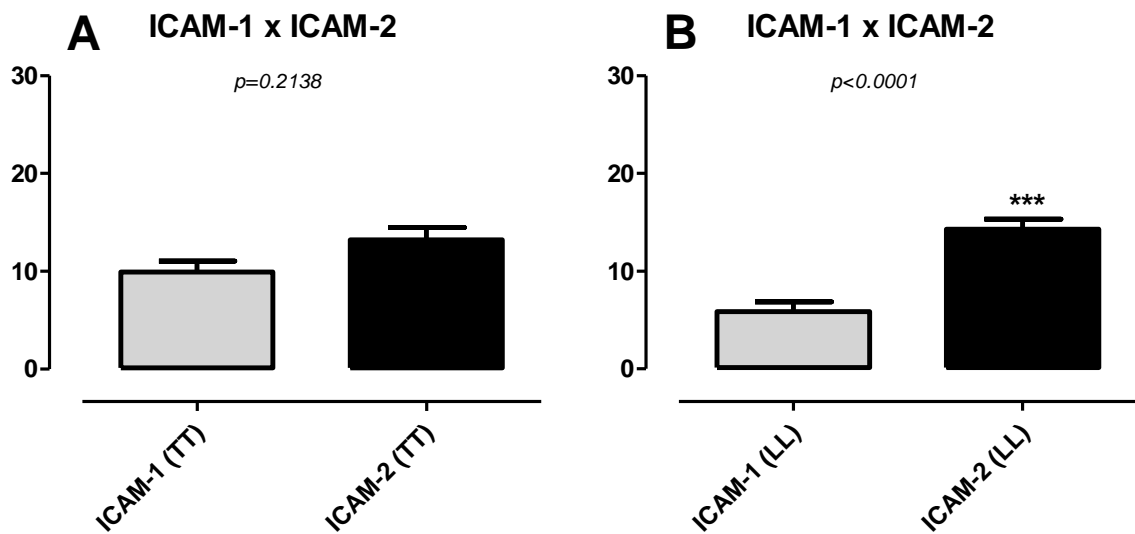


Figura 15 - Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 *versus* ICAM-2 nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença não significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p=0,2138$ . (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p<0,0001$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

Os resultados da contagem de células imunomarcadas para ICAM-1 quando comparados a marcação do VCAM-1, demonstraram que houve uma maior presença do VCAM-1 em ambas as formas polares da infecção. Onde o polo tuberculóide apresentou em média  $9,92\pm 1,11$  células/ $\text{mm}^2$  para o marcador de ICAM-1 enquanto o houve uma marcação de  $18,28\pm 1,46$  células/ $\text{mm}^2$  para a molécula VCAM-1 ( $p<0,0001$ ). No polo virchoviano houve uma marcação de  $6,61\pm 0,99$  células/ $\text{mm}^2$  para o marcador ICAM-1 e  $11,73\pm 1,18$  células/ $\text{mm}^2$  para o marcador VCAM-1 com um valor de  $p=0,0012$  (Fig. 16, A e B).

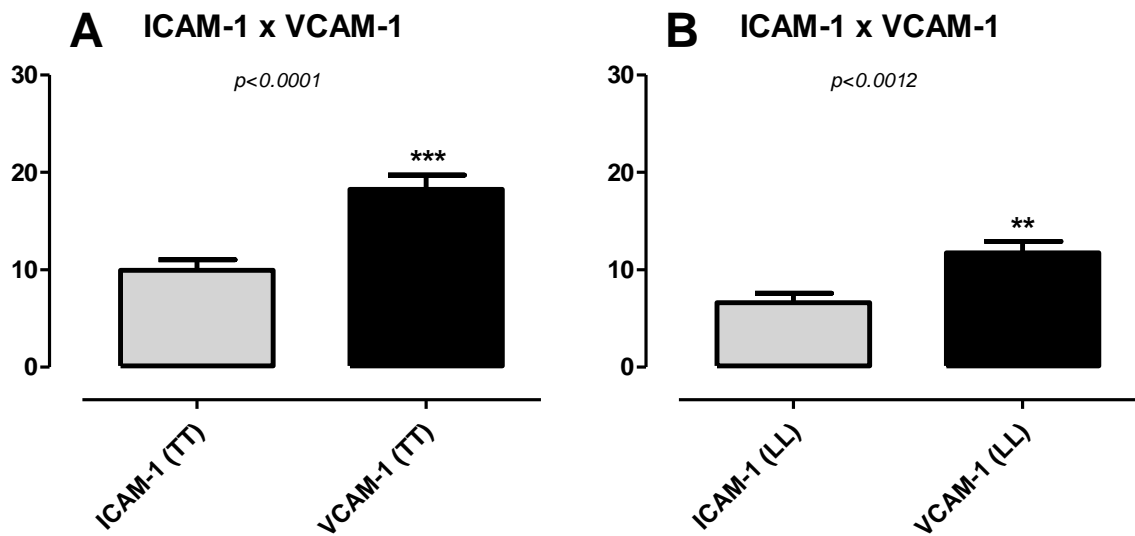


Figura 16 - Análise quantitativa da imunomarcagem de ICAM-1 *versus* VCAM-1 nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,0012$ \*\* (Teste *t* Student).

Verificando a presença da molécula de ICAM-1 em comparação a VLA-4 nas amostras do polo tuberculóide e virchoviano, percebemos que em ambos os polos da infecção houve uma maior presença da molécula VLA-4. Sendo que o polo tuberculóide da infecção apresentou em média  $9,92 \pm 1,11$  células/mm<sup>2</sup> para a molécula ICAM-1 enquanto a adesina VLA-4 obteve uma marcação de  $22,46 \pm 1,38$  células/mm<sup>2</sup>. No polo virchoviano, podemos observar que houve em média uma marcação de  $6,61 \pm 0,99$  células/mm<sup>2</sup> para o ICAM-1 enquanto verificamos uma média de  $16,04 \pm 1,56$  células/mm<sup>2</sup> para molécula VLA-4 (Fig. 17, A e B)

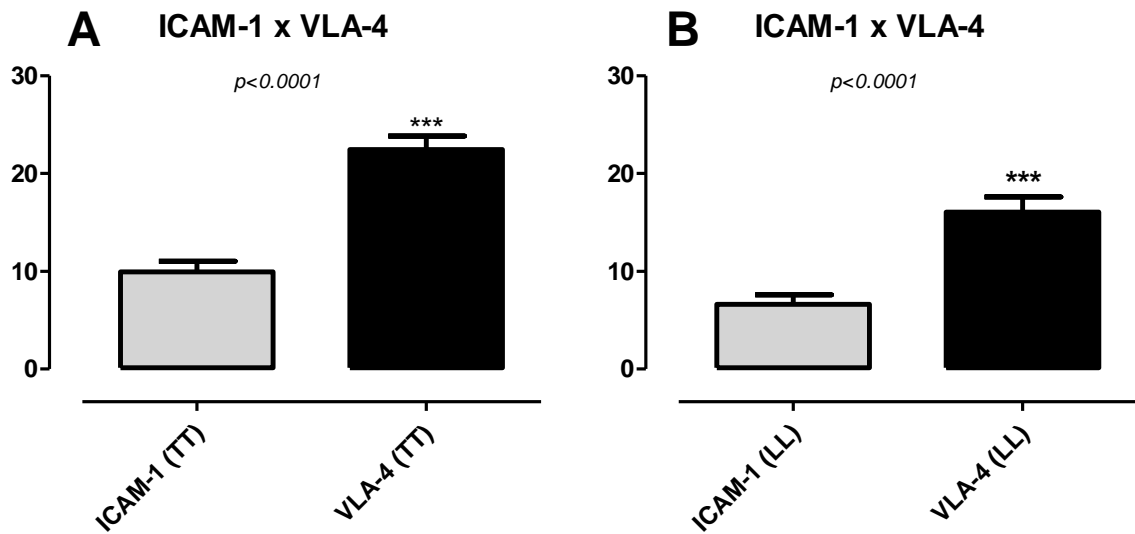


Figura 17 – Análise quantitativa da imunomarcagem de ICAM-1 *versus* VLA-4 nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

Quando analisamos a presença da molécula de ICAM-1 em comparação a E-Selectina nas amostras do polo tuberculóide, percebemos que houve uma diferença significativa ( $p = 0,0016$ ) entre estas duas moléculas, e observamos que a CD62E apresenta em média  $13,00 \pm 1,59$  células/ $\text{mm}^2$ , sendo superior a marcação do ICAM-1, que apresentou  $9,92,00 \pm 1,11$  células/ $\text{mm}^2$  neste polo da doença. Porém este perfil não se repetiu no polo virchiviano da infecção, onde podemos verificar que a presença do adesina ICAM-1 foi superior a da molécula CD62E, e obteve uma média de  $6,61 \pm 0,99$  células/ $\text{mm}^2$ , enquanto a E-Selectina apresentou uma média de  $2,58 \pm 0,48$  células/ $\text{mm}^2$  marcadas neste polo (Fig. 18, A e B).



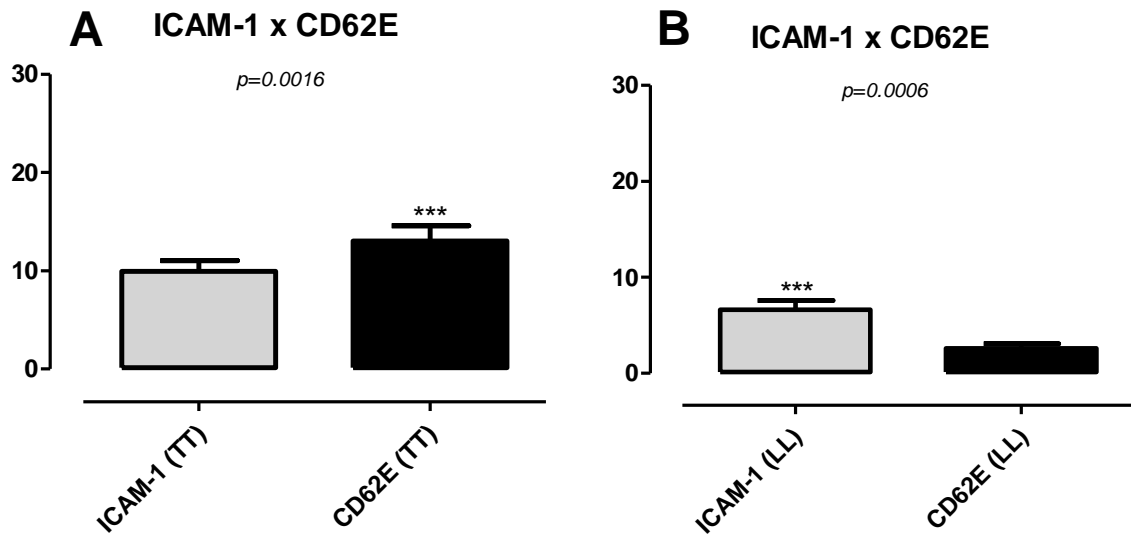


Figura 18- Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-1 *versus* CD62E nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p=0,0016^{***}$ . (B) Representa diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p=0,0006^{***}$ . (Teste *t* Student).

Ao compararmos a imunomarcção do ICAM-1 com presença da molécula CD62P nas células endoteliais, podemos verificar um padrão semelhante de expressão destas moléculas nas duas formas polares de hanseníase. Nas amostras que apresentavam a forma tuberculóide da infecção observamos que a média da marcação de ICAM-1 foi de  $9,92\pm 1,11$  células/mm<sup>2</sup>, sendo significativamente ( $p<0,0001$ ) superior a presença da molécula CD62P que apresentou apenas  $1,17\pm 0,24$  células/mm<sup>2</sup> neste polo da doença. Observando o polo virchoviano podemos verificar que o ICAM-1 está presente em  $6,61\pm 0,99$  células/mm<sup>2</sup> e a selectina CD62P apresentou uma imunomarcção de  $3,25\pm 0,56$  células/mm<sup>2</sup> ( $p<0,0053$ ) (Fig. 19 A e B).

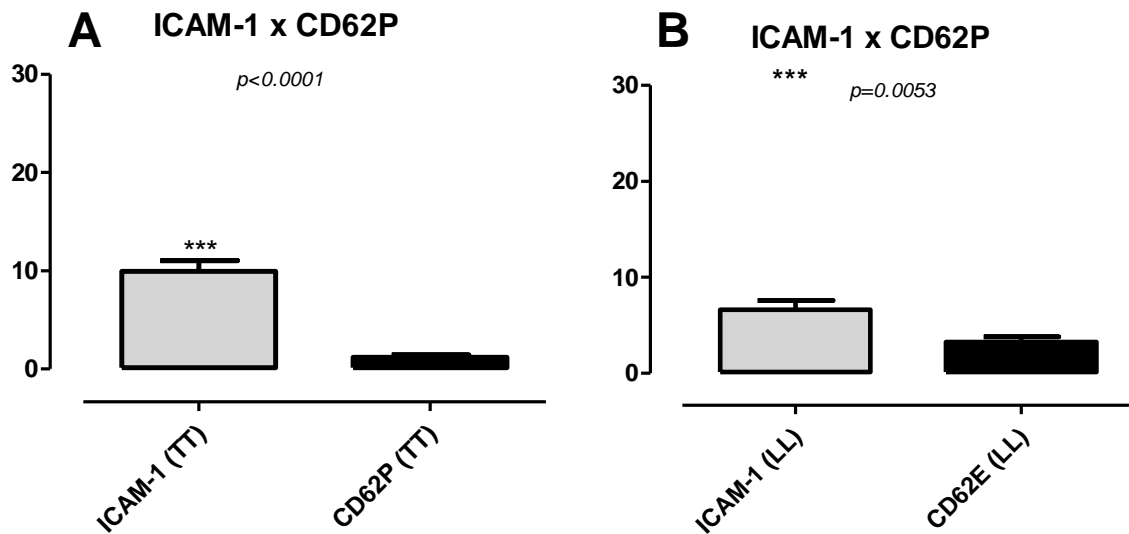


Figura 19- Análise quantitativa da imunomarcação de ICAM-1 *versus* CD62P nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infec o de acordo com a classifica o de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p = 0,0053$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

### 6.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCA O DO ICAM-2 *versus* VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFEC O

A avalia o comparativa entre as moléculas ICAM-2 e VCAM-1 demonstrou perfis diferentes de expressão destas moléculas nos dois polos da infec o. Sendo que no polo tuberculóide podemos observar uma maior presença da imunoglobulina VCAM-1, que apresentou em média  $18,28 \pm 1,46$  células/mm<sup>2</sup> imunomarcadas, enquanto o ICAM-2 apresentou  $13,21 \pm 1,27$  células/mm<sup>2</sup> neste mesmo polo da infec o. No polo virchoviano da infec o podemos observar um perfil diferente da expressão destas moléculas, neste tipo de lesão houve uma maior presença da molécula ICAM-2, que apresentou  $14,30 \pm 1,02$  células/mm<sup>2</sup> marcadas, a molécula VCAM-1 foi marcada em  $10,67 \pm 1,25$  células/mm<sup>2</sup> neste polo da doença (Fig. 20, A e B).

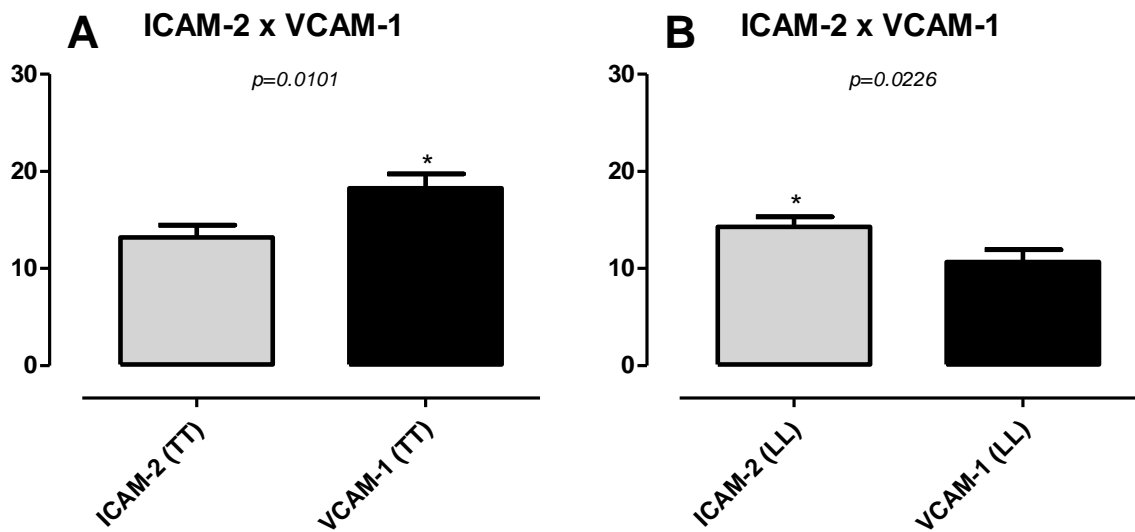


Figura 20 - Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-2 *versus* VCAM-1 nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p=0,0101^*$ . (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p=0,0226^*$ . (Teste *t* Student).

A comparação entre a presença das moléculas ICAM-2 e VLA-4 demonstrou uma diferença significativa ( $p<0,0001$ ) somente na forma tuberculóide da infecção, sendo que a molécula VLA-4 demonstrou estar mais presente nesta forma da doença em comparação com a imunoglobulina ICAM-2. A molécula VLA-4 apresentou a imunomarcção de  $22,46\pm 1,10$  células/ $\text{mm}^2$ , enquanto que a molécula ICAM-2 apresentou  $13,12\pm 1,27$  células/ $\text{mm}^2$  marcadas neste perfil da doença. No polo virchoviano não houve diferença significativa entre estas duas moléculas (Fig. 21, A e B).

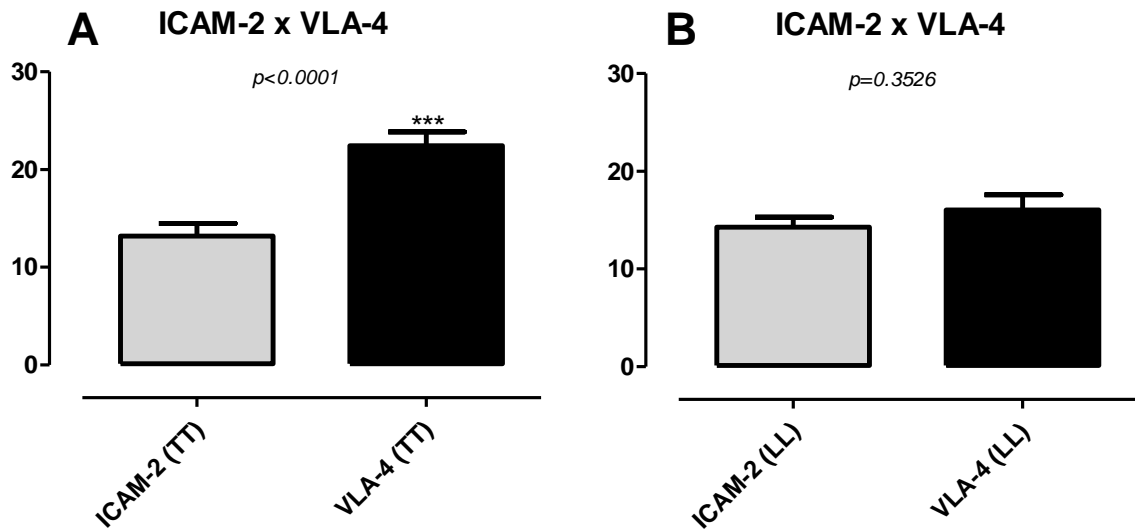


Figura 21- Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-2 *versus* VLA-4 nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa que não houve uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p = 0,3526$ . (Teste *t* Student).

Quando realizamos análise comparativa entre as moléculas ICAM-2 e CD62E no polo tuberculóide da infecção, percebemos que não houve uma diferença significativa entre estas duas adesinas. Porém, na análise do polo virchoviano podemos verificar que a molécula ICAM-2 é significativamente ( $p < 0,0001$ ) mais presente, quando comparado com a E-Selectina. A imunoglobulina ICAM-2 apresentou uma imunomarcção de  $14,30 \pm 1,02$  células/ $\text{mm}^2$ , enquanto a molécula E-Selectina obteve uma marcação de  $2,58 \pm 0,48$  células/ $\text{mm}^2$ , estes resultados estão representados na Figura 22, A e B.

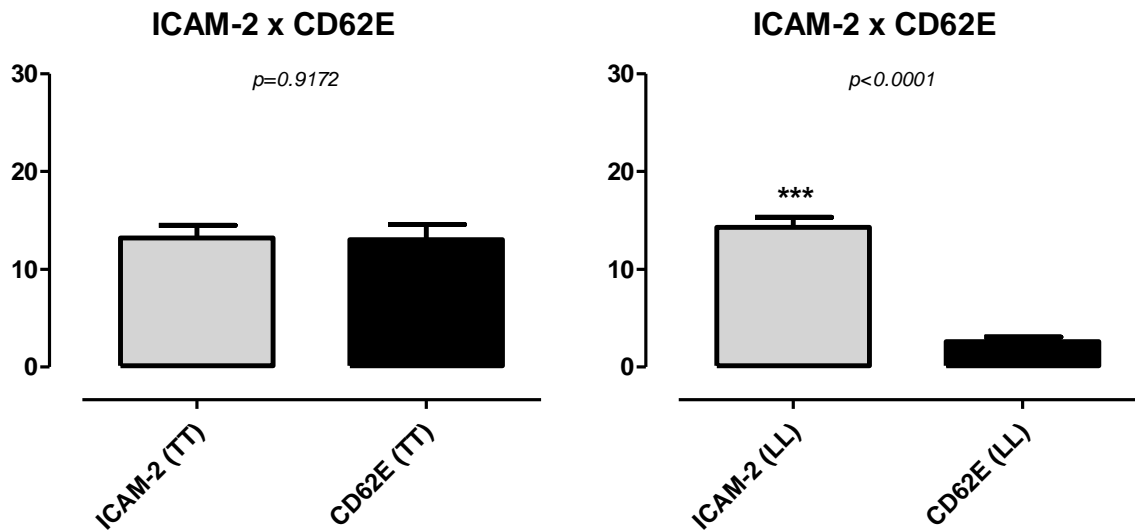


Figura 22 – Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-2 *versus* CD62E nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa que não houve uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p=0,9172$ . (B) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p<0,0001$ . (Teste *t* Student).

Análise da marcação da molécula ICAM-2 em comparação a P-Selectina demonstrou em ambos os polos da doença houve uma diferença significativa na presença destas duas moléculas. Podemos verificar que no polo tuberculóide da infecção o ICAM-2 apresentou  $13,21\pm 1,27$  células/mm<sup>2</sup> imunomarcadas, e houve uma diferença significativa ( $p<0,0001$ ) em comparação a molécula CD62P que apresentou uma média de  $1,17\pm 0,24$  células/mm<sup>2</sup>. No polo virchoviano este mesmo padrão foi visualizado, onde a molécula ICAM-2 apresentou  $14,30\pm 1,02$  células/mm<sup>2</sup>, enquanto a P-Selectina apresentou uma marcação de  $3,25\pm 0,56$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 23, A e B).

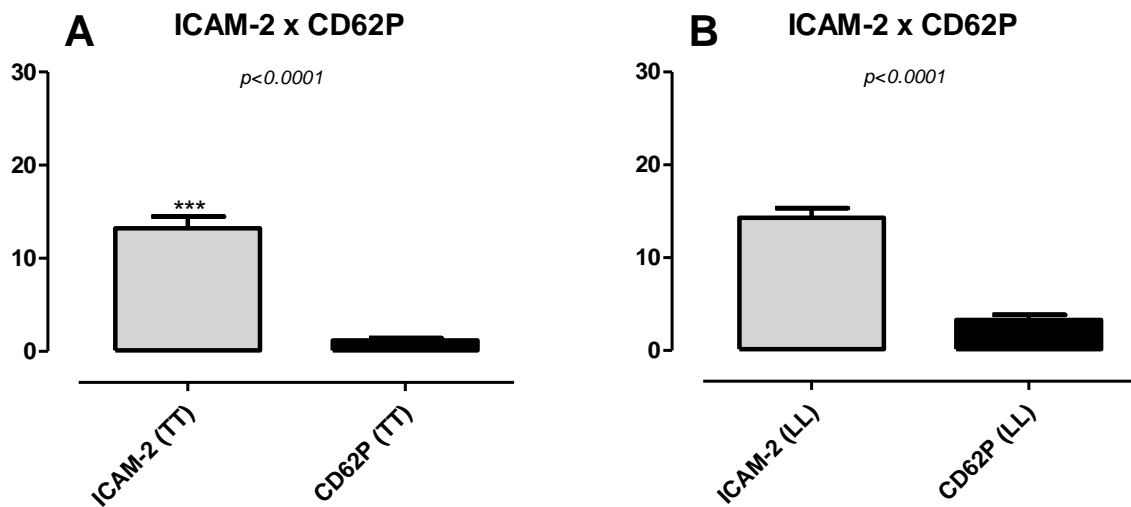


Figura 23 - Análise quantitativa da imunomarcção de ICAM-2 *versus* CD62P nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

#### 6.4 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO VCAM-1 *versus* VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECCÃO

Os resultados demonstraram que a molécula VLA-4 foi imunomarcada em uma quantidade maior quando comparada ao VCAM-1 em ambas as formas polares de hanseníase. Os dados obtidos mostraram uma imunomarcção significativamente ( $p < 0,0397$ ) maior de  $22,46 \pm 1,38$  células/mm<sup>2</sup> para a molécula VLA-4 em comparação ao VCAM-1, que apresentou  $18,28 \pm 1,46$  células/mm<sup>2</sup> marcadas para esta molécula no polo tuberculóide da infecção. A forma virchoviana não demonstrou uma diferença significativamente ( $p < 0,2993$ ) na presença das moléculas VLA-4, que estava presente em média  $16,04 \pm 1,56$  células/mm<sup>2</sup>, enquanto que a molécula VCAM-1 apresentou uma imunomarcção de  $18,28 \pm 1,46$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 24, A e B).

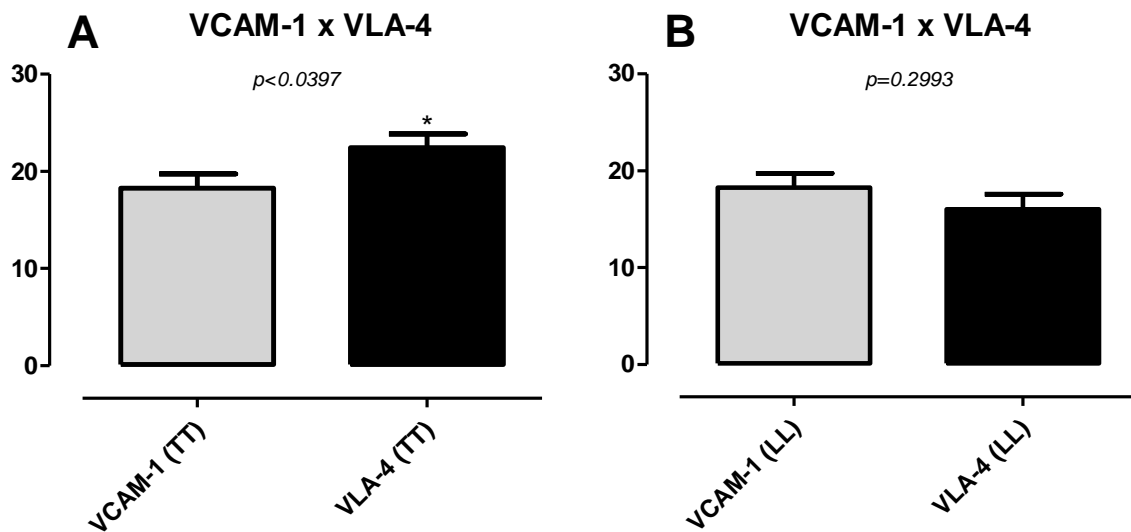


Figura 24 – Análise quantitativa da imunomarcagem de VCAM-1 *versus* VLA-4 nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0397^*$ . (B) Representa diferença não significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,2993$ . (Teste *t* Student).

Os resultados da comparação entre as moléculas VCAM-1 e CD62E apresentaram um perfil semelhante em ambos os polos da infecção. Apesar do nível da E-Selectina aparentar estar elevado no polo tuberculóide, podemos verificar que houve uma diferença significativa ( $p < 0,0159$ ) na imunomarcagem entre as moléculas VCAM-1 e CD62E. As análises demonstram que a molécula VCAM-1 apresentou  $18,28 \pm 1,46$  células/mm<sup>2</sup>, enquanto que a molécula CD62E apresentou  $13,00 \pm 1,59$  células/mm<sup>2</sup> imunomarcadas. No polo virchoviano da infecção a diferença entre a presença destas duas moléculas foi mais expressiva, o VCAM-1 apresentou uma média de  $10,67 \pm 1,25$  células/mm<sup>2</sup>, enquanto que a E-Selectina apresentou somente uma média de  $2,58 \pm 0,48$  células/mm<sup>2</sup> marcadas neste polo da infecção (Fig. 25, A e B).

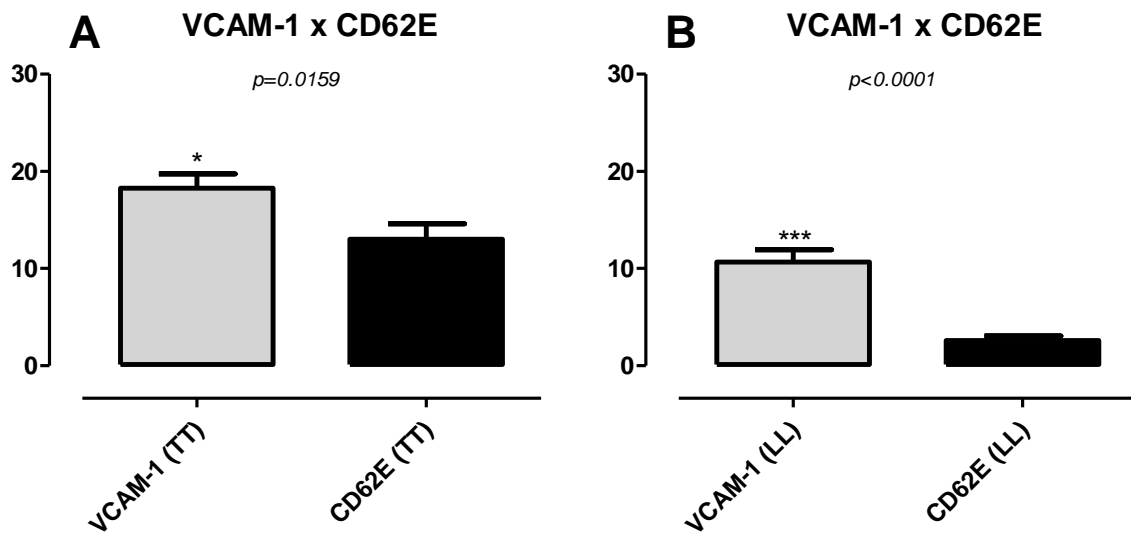


Figura 25 – Análise quantitativa da imunomarcagem de VCAM-1 *versus* CD62E nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p<0,0159^*$ . (B) Representa diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p<0,0001^{***}$ . (Teste *t* Student).

Avaliação da presença das moléculas VCAM-1 e CD62P demonstraram características de expressão semelhantes em ambos os polos. A imunoglobulina VCAM-1 se apresenta em maior quantidade quando comparado a expressão da P-Selectina. Podemos observar que na forma tuberculóide da infecção a molécula VCAM-1 apresentou  $18,28\pm 1,46$  células/ $\text{mm}^2$ , enquanto que a molécula P-Selectina apresentou somente  $1,17\pm 0,24$  células/ $\text{mm}^2$  marcadas para esta adesina. Na forma virchoviana da infecção as características foram semelhantes, o VCAM-1 apresentou uma média de  $10,67\pm 1,25$  células/ $\text{mm}^2$  marcadas por campo contabilizado, e a molécula CD62P expressou somente  $3,25\pm 0,56$  células/ $\text{mm}^2$  marcadas. Ambos os polos demonstraram uma diferença significativa na expressão destas moléculas com um  $p<0,0001$  (Fig. 26, A e B).



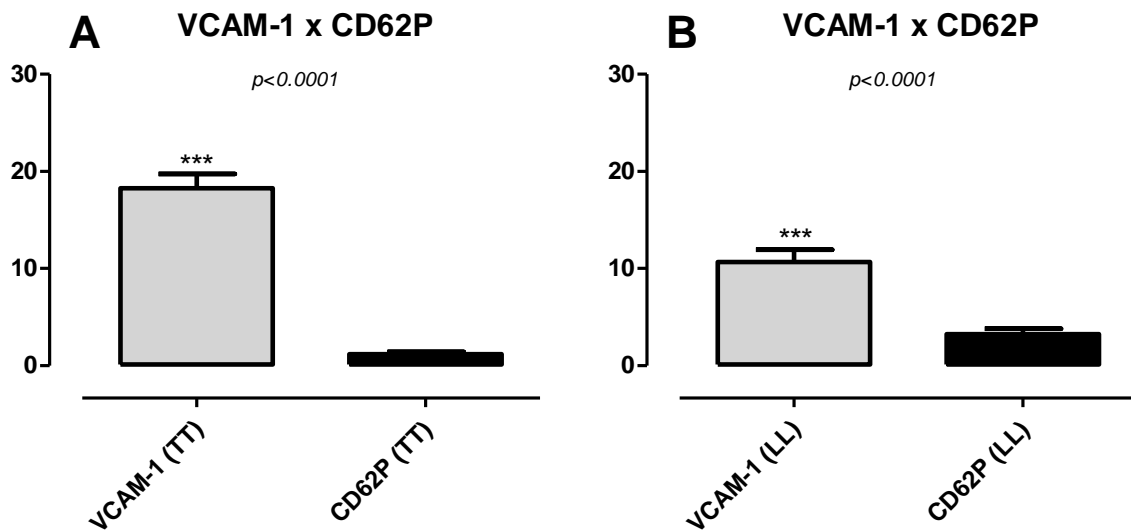


Figura 26 - Análise quantitativa da imunomarcção de VCAM-1 *versus* CD62P nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

### 6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO VLA-4 *versus* CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que em ambas as formas polares das amostras de hanseníase estudadas, a molécula VLA-4 está mais presente que a E-Selectina. Podemos observar esta diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na forma tuberculóide da infecção onde o VLA-4 apresentou  $22,46 \pm 1,38$  células/mm<sup>2</sup> enquanto que a molécula CD62E apresentou  $13,00 \pm 1,59$  células/mm<sup>2</sup> imunomarcadas neste polo da infecção. Na forma virchoviana da doença podemos observar que as duas moléculas analisadas sofreram redução nas suas expressões, porém a presença molécula VLA-4 demonstrou ser superior que a da molécula CD62E, apresentando  $16,04 \pm 1,56$  células/mm<sup>2</sup> enquanto que a molécula E-Selectina apresentou somente  $2,58 \pm 0,48$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 27, A e B).

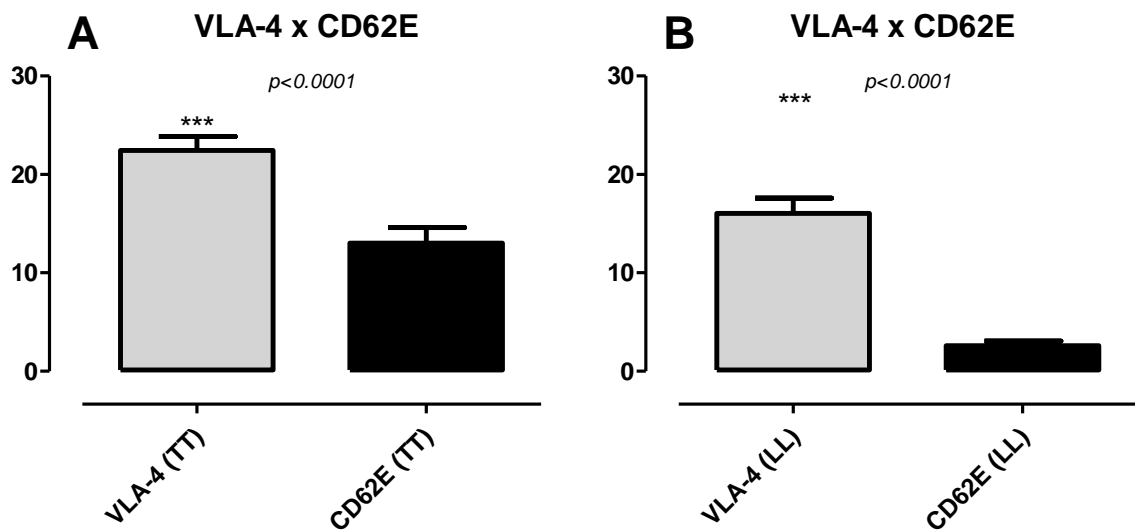


Figura 27 – Análise quantitativa da imunomarcção de VLA-4 *versus* CD62E nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

As amostras analisadas demonstraram que o polo tuberculóide apresenta uma imunomarcção de VLA-4 ( $22,46 \pm 1,38$  células/mm<sup>2</sup>) significativamente ( $p < 0,001$ ) superior ao apresentado pela expressão da molécula CD62P ( $1,17 \pm 0,24$  células/mm<sup>2</sup>). Este perfil se repete no polo virchoviano em que molécula VLA-4 apresentou  $16,04 \pm 1,56$  células/mm<sup>2</sup> marcadas para esta molécula enquanto que a CD62P apresentou  $3,35 \pm 0,56$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 28, A e B).

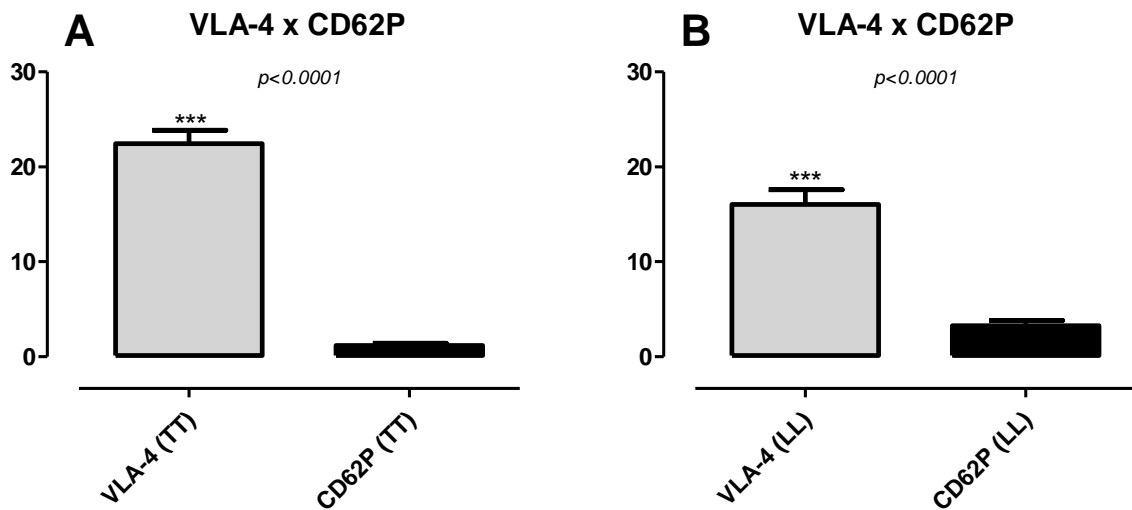


Figura 28 – Análise quantitativa da imunomarcagem de VLA-4 *versus* CD62P nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença significativa entre as médias±e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (Teste *t* Student).

## 6.6 ANÁLISE COMPARATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DO CD62E *versus* CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

A imunomarcagem das moléculas CD62E *versus* CD62P permitiu uma comparação da presença destas selectinas, diferenciando entre os polos da infecção. No polo tuberculóide das amostras de biopsias de pele analisadas demonstraram uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ), na presença de E-Selectina  $13,00 \pm 1,59$  células/mm<sup>2</sup> em comparação a presença a imunomarcagem da molécula P-Selectina, que apresentou uma expressão média de  $1,17 \pm 0,24$  células/mm<sup>2</sup>. Esta mesma análise foi realizada no polo virchoviano que não demonstrou uma diferença significativa ( $p = 0,3683$ ) entre a expressão destas duas moléculas. A CD62E apresentou uma marcação de  $2,58 \pm 0,48$  células/mm<sup>2</sup> em comparação a selectina CD62P que apresentou  $3,25 \pm 0,56$  células/mm<sup>2</sup> (Fig. 29, A e B).

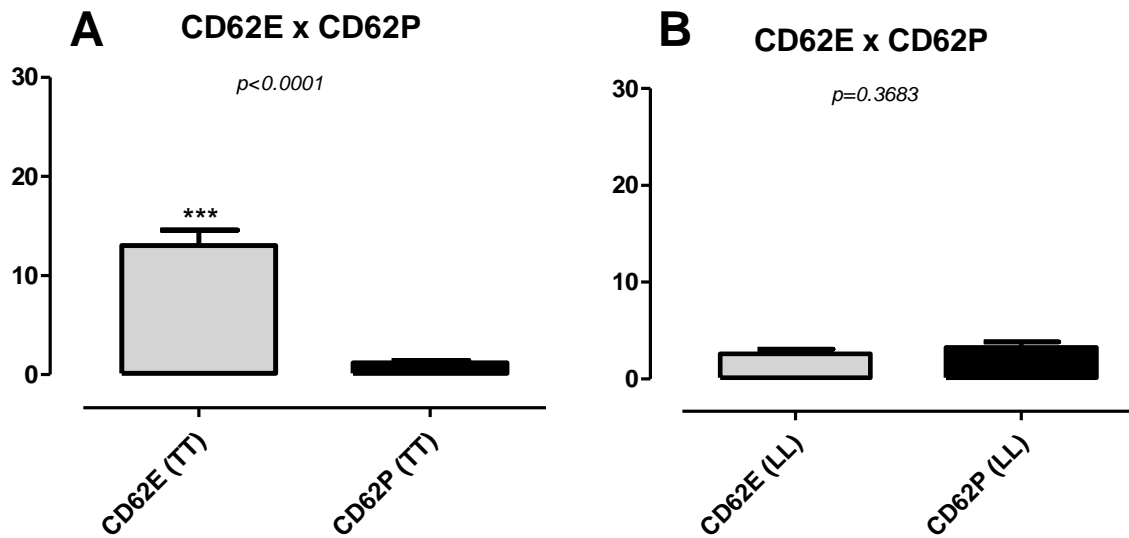


Figura 29 - Análise quantitativa da imunomarcagem de E-Selectina e da P-Selectina nas biopsias de pele *in situ*, das formas polares da infecção de acordo com a classificação de Madri de pacientes com hanseníase. (A) Representa uma diferença significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras TT,  $p < 0,0001$ \*\*\*. (B) Representa diferença não significativa entre as médias $\pm$ e.p.m. de células endoteliais imunomarcadas nos cortes histológicos amostras LL,  $p = 0,3683$ . (Teste *t* Student).

## 6.7 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CORRELAÇÕES AVALIADAS ENTRE AS MOLÉCULAS ICAM-1; ICAM-2, VCAM-1; VLA-4 (A<sub>4</sub>B<sub>1</sub>); E-SELECTINA; P-SELECTINA;

Os resultados expressos até agora demonstraram uma maior presença das adesinas no polo tuberculóide da doença. A partir da análise individual das moléculas estudadas, pode se estabelecer correlações entre a expressão destas adesinas considerando as formas clínicas polares da infecção.

## 6.8 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA ICAM-1 COM O ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

A correlação entre as Imunoglobulinas ICAM-1 e ICAM-2 entre as amostras do polo tuberculóide foi significativa ( $p < 0,003$ ). Análise demonstrou haver uma correlação positiva e moderada ( $r = 0,3963$ ) entre estas duas moléculas (Fig. 30, A). Porém, quando analisamos a correlação no polo virchoviano da infecção, podemos observar que houve uma correlação ínfima negativa ( $r = -0,004521$ ;  $p = 0,9704$ ), porém não significativa entre as adesinas ICAM-1 e ICAM-2 (Fig. 30, B).

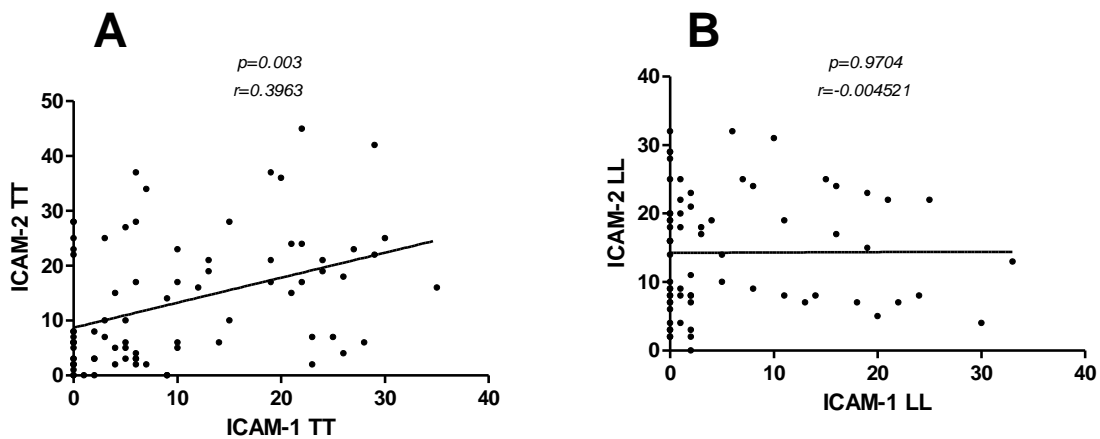


Figura 30 – Correlação entre a imunomarcção de ICAM-1 com a adesina ICAM-2 nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva e moderada significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-1 e ICAM-2  $r=0,3963$ ;  $p<0,003^{**}$ . (B) Representa a correlação ínfima negativa não significativa na forma Virchowiana entre as moléculas ICAM-1 e ICAM-2,  $r=-0,004521$ ;  $p=0,9704$ . (Correlação de Pearson  $r$ ).

Ao analisarmos a correlação entre o ICAM-1 versus VCAM-1, sobre a forma tuberculóide, podemos observar uma correlação positiva moderada ( $r=0,4828$ ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 31,A). A forma virchowiana da doença apresentou uma correlação negativa ínfima ( $r=-0,005731$ ;  $p=0,9624$ ) (Fig. 31, B).

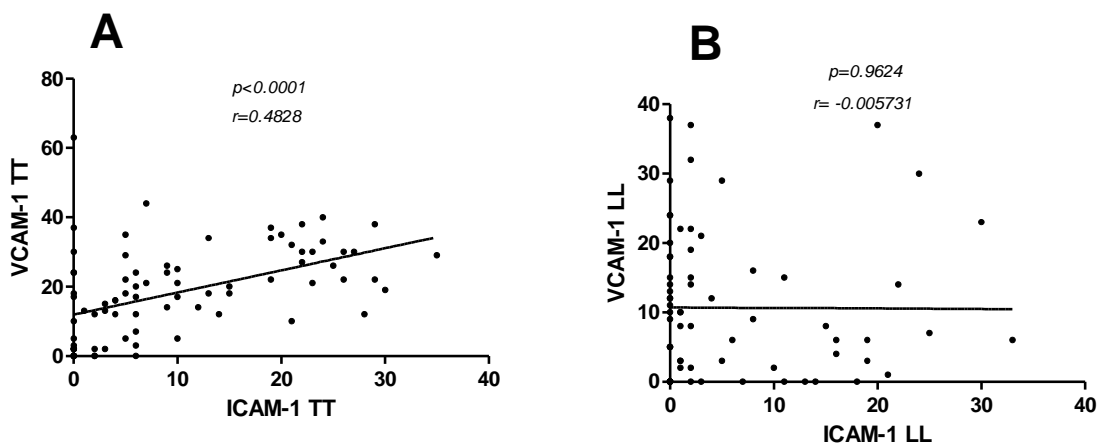


Figura 31 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-1 com a adesina VCAM-1 nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, moderada e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-1 e VCAM-1  $r=0,4828$ ;  $p<0,0001^{***}$ . (B) Representa a correlação negativa, ínfima não significativa na forma Virchowiana entre as moléculas ICAM-1 e VCAM-1,  $r=-0,005731$ ;  $p=0,9624$ . (Correlação de Pearson  $r$ ).

As amostras do polo tuberculóide analisadas demonstraram uma correlação positiva moderada entre as adesinas ICAM-1 versus VLA-4 ( $r=0,5154$ ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 32, A). Sendo

que a análise de correlação destas mesmas moléculas quanto aplicada ao polo virchoviano da doença apresentaram uma correlação positiva fraca ( $r=0,2091$ ;  $p<0,823$ ) (Fig. 32, B).

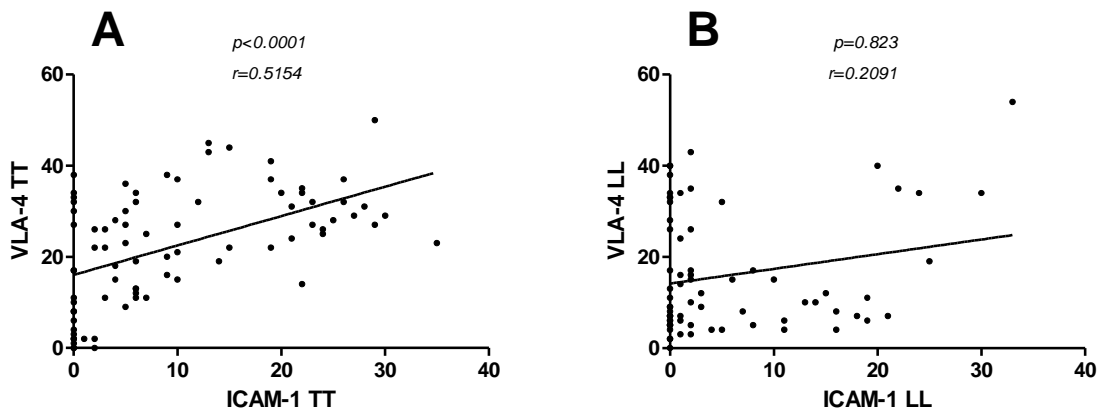


Figura 32 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-1 com a adesina VLA-4 nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, moderada e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-1 e VLA-4  $r=0,5154$ ;  $p<0,0001$ \*\*\*. (B) Representa a correlação positiva, fraca significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-1 e VLA-4,  $r=0,2091$ ;  $p=0,823$ . (Correlação de Pearson  $r$ ).

A análise da imunomarcção entre as moléculas ICAM-1 e CD62-E, demonstrou uma correlação positiva moderada nas amostras do polo tuberculóide ( $r=0,3671$ ;  $p=0,0008$ ) (Fig. 33, A). Quando aplicamos esta mesma análise de correlação no polo virchoviano da infecção percebemos que não houve significância nos resultados, apresentando uma correlação ínfima entre estas duas moléculas neste polo da doença ( $r=0,002641$ ;  $p=0,9827$ ) (Fig. 33, B).

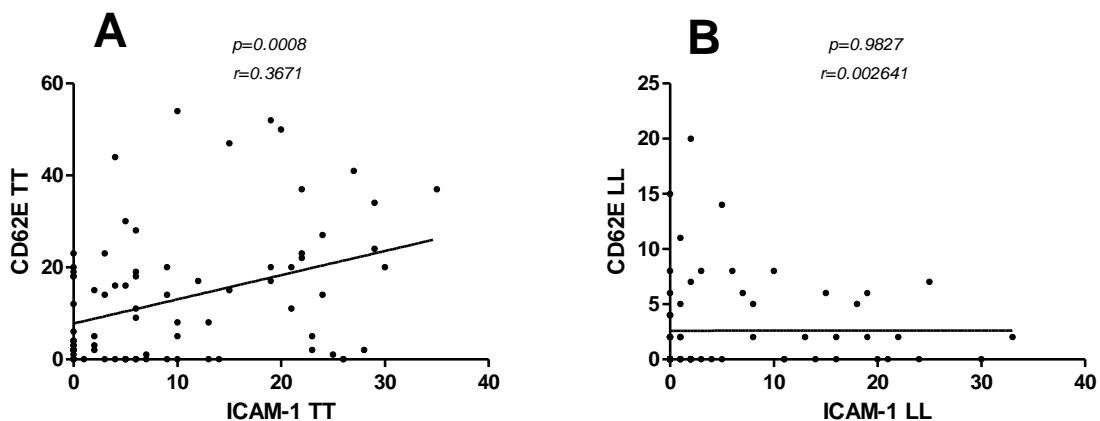


Figura 33 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-1 com a selectina CD62E nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, moderada e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-1 e CD62E  $r=0,3671$ ;  $p=0,0008$ \*\*\*. (B) Representa a correlação positiva, ínfima não

significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-1 e CD62E,  $r= 0,002641$ ;  $p=0,9827$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

Os resultados analisados da correlação entre as moléculas ICAM-1 e a P-Selectina, demonstraram uma correlação positiva, ínfima entre as amostras do polo tuberculóide ( $r=0,026370$ ;  $p=0,8347$ ) (Fig. 34, A). Sendo que em nenhum dos dois polos da infecção esta correlações foram significativas, e na forma virchoviana, os resultados se apresentaram uma correlação negativa e ínfima entra estas duas moléculas ( $r= -0,1372$ ;  $p=0,2575$ ) (Fig. 34, B).

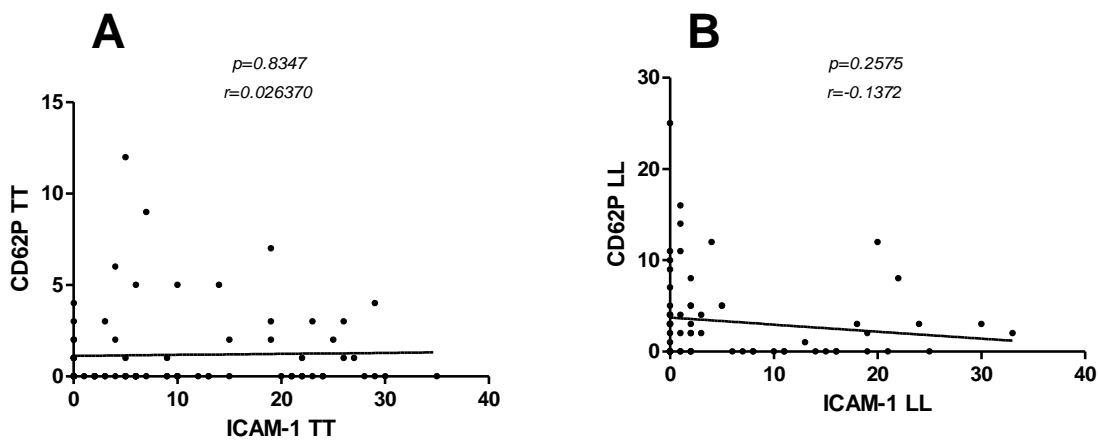


Figura 34 - Correlação entre a imunomarcagem de ICAM-1 com a selectina CD62P nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, ínfima e não significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-1 e CD62P  $r=0,026370$ ;  $p=0,8347$ . (B) Representa a correlação negativa, ínfima não significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-1 e CD62P,  $r= 0,1372$ ;  $p=0,2575$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

## 6.9 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA ICAM-2 COM O VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

A correlação entre o ICAM-2 e o VCAM-1 na forma tuberculóide apresentou-se positiva moderada ( $r=0,4911$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 35, A). Porém a análise da forma virchoviana demonstrou ser significativa, negativa fraca ( $r=0,5594$ ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 35, B).

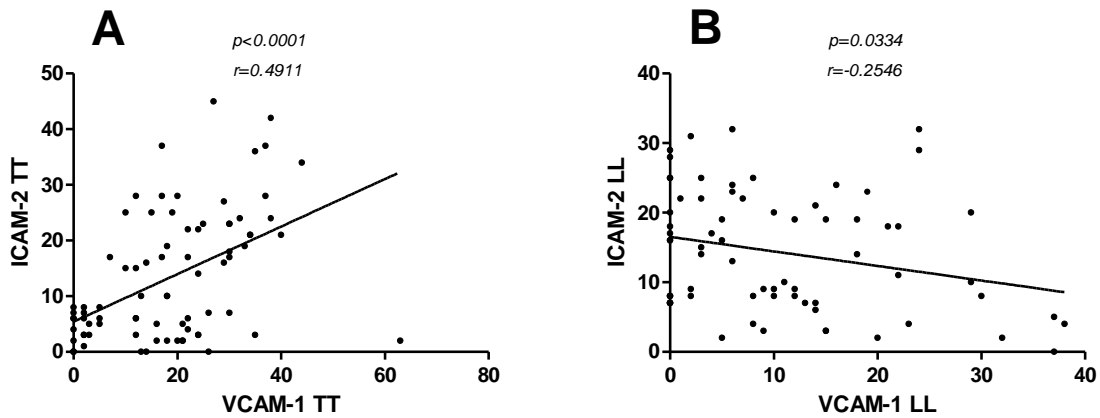


Figura 35 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com o VCAM-1 nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, moderada e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-2 e VCAM-1  $r=0,4911$ ;  $p<0,0001$ . (B) Representa a correlação negativa, fraca e significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-2 e VCAM-1,  $r=-0,2546$ ;  $p=0,0334$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

Avaliação realizada através da correlação das moléculas ICAM-2 e VLA-4 demonstraram um perfil diferente entre as formas polares das biópsias de pele estudadas. No polo tuberculóide, podemos observar uma correlação positiva moderada entre a expressão destas duas moléculas ( $r=0,5594$ ;  $p=0,0001$ ) (Fig. 36, A). Fato este que não se repete no polo virchoviano da infecção, onde podemos observar que houve uma correlação fraca negativa, entre as moléculas ICAM-2 e o VLA-4 ( $r= -0,2633$ ;  $p=0,0183$ ) (Fig. 36, B).

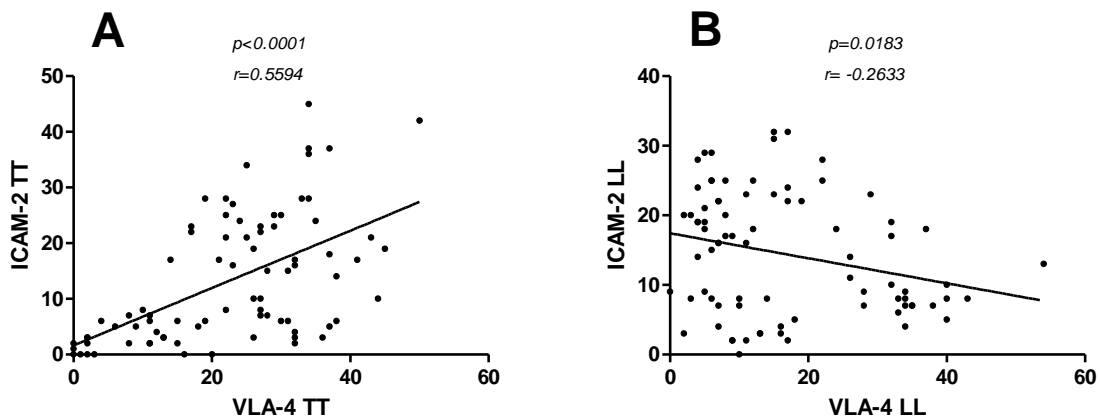


Figura 36 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com o VLA-4 nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, moderada e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-2 e VLA-4  $r=0,5594$ ;  $p<0,0001$ . (B) Representa a correlação negativa, fraca e significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-2 e VLA-4,  $r= -0,2633$ ;  $p=0,0183$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

A correlação entre as moléculas ICAM-2 e E-Selectina, demonstraram ser semelhantes em ambos as formas polares de hanseníase. No polo tuberculóide da doença podemos



observar uma correlação positiva fraca com  $r=0,2660$  e  $p<0,0171$  (Fig. 37, A). No polo virchoviano da infecção o perfil de correlação se reproduziu através de uma correlação positiva fraca, porém com resultado não significativo ( $r=0,2077$  e  $p=0,0645$ ) (Fig. 37, B).

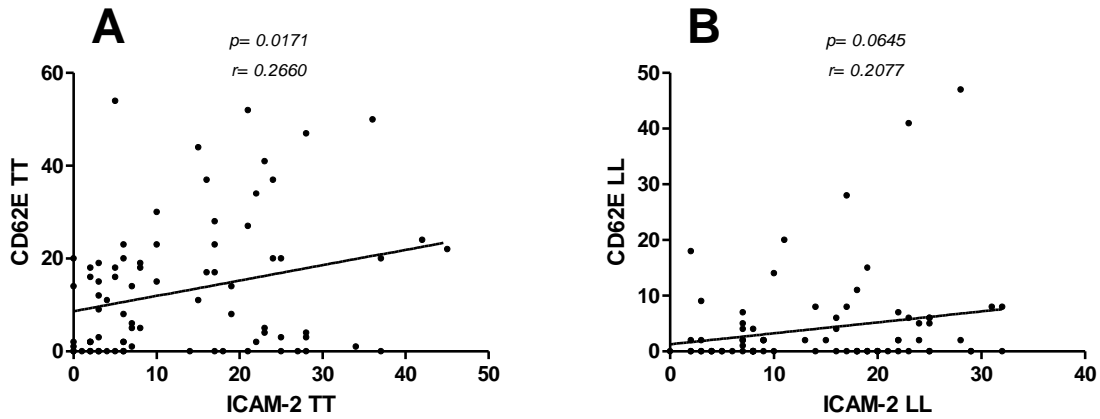


Figura 37 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com a CD62E nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, fraca e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-2 e CD62E  $r=0,2660$ ;  $p=0,0171$ . (B) Representa a correlação positiva, fraca e não significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-2 e CD62E  $r=0,2077$ ;  $p=0,0645$ . (Correlação de Pearson r)

Quando foi realizada a análise da correlação entre as moléculas ICAM-2 e CD62P podemos observar que ambos os polos apresentam uma correlação ínfima. A forma tuberculóide da infecção apresentou uma correlação positiva ínfima ( $r=0,02660$  e  $p<0,8148$ ) (Fig. 38, A). Na análise da correlação no polo virchoviano da infecção se apresentou ínfima e negativa com o resultado de  $r=-0,04342$  e  $p=0,7211$  (Fig. 38, B).

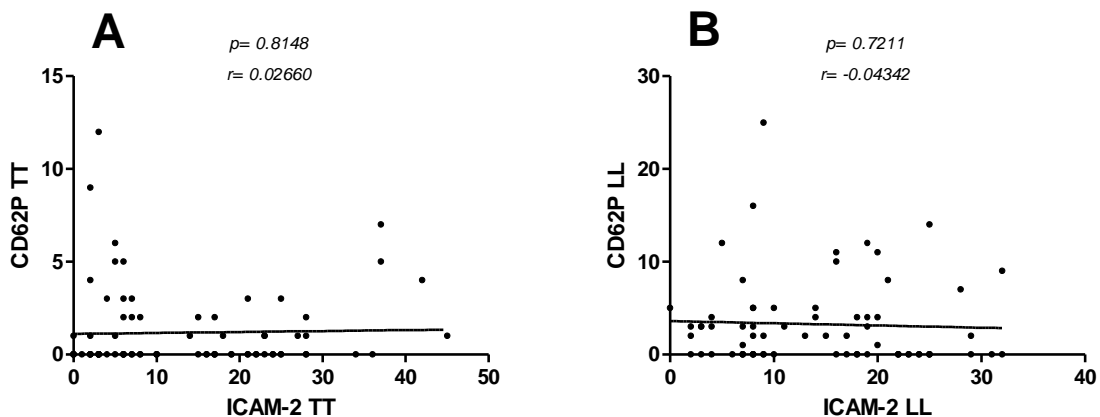


Figura 38 - Correlação entre a imunomarcção de ICAM-2 com o CD62P nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, ínfima e não significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas ICAM-2 e CD62P  $r=0,02660$ ;  $p=0,8148$ . (B) Representa a correlação negativa, ínfima e não significativa na forma Virchoviana entre as moléculas ICAM-2 e CD62P,  $r=-0,04342$ ;  $p=0,7211$ . (Correlação de Pearson r)

## 6.10 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA VCAM-1 COM A VLA-4, CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

Análise da correlação entre a imunoglobulina VCAM-1 e o seu ligante a integrina VLA-4 nas amostras do polo tuberculóide apresentou um resultado positivo moderado ( $r=0,3770$  e  $p=0,006$ ) (Fig. 39, A). Enquanto que correlação entre as mesmas adesinas no polo virchoviano se apresentou positiva fraca ( $r=0,2227$ ;  $p=0,0639$ ) (Fig. 39, B).

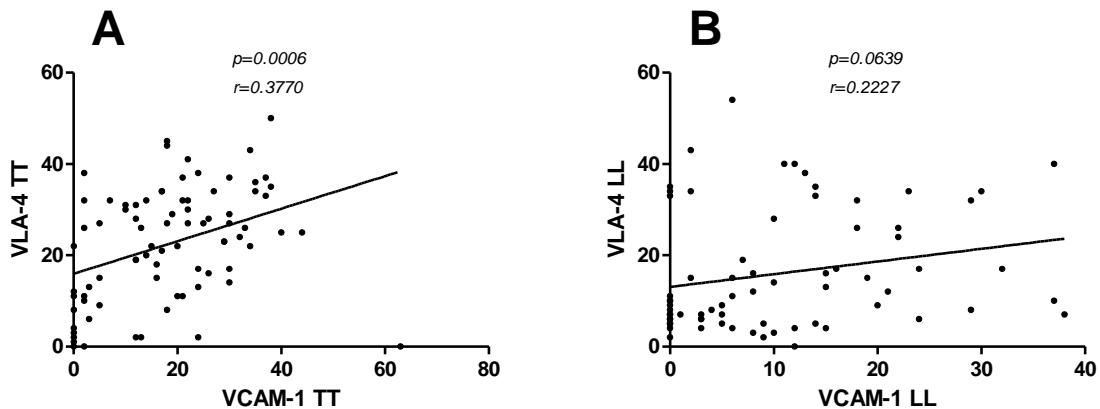


Figura 39 - Correlação entre a imunomarcção de VCAM-1 com a VLA-4 nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, moderada e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas VCAM-1 e VLA-4  $r=0,3770$ ;  $p=0,0006$ . (B) Representa a correlação positiva, fraca e significativa na forma Virchoviana entre as moléculas VCAM-1 e VLA-4,  $r=0,2227$ ;  $p=0,0639$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

Ao analisarmos a correlação entre as moléculas VCAM-1 e CD62E percebemos uma correlação positiva fraca entre estas duas moléculas no polo tuberculóide da infecção ( $r=0,1611$ ;  $p=0,1535$ ) (Fig. 40, A). O polo virchoviano apresentou uma correlação positiva ínfima entre estas duas moléculas ( $r=0,01310$ ;  $p=0,9143$ ) (Fig. 40, B).

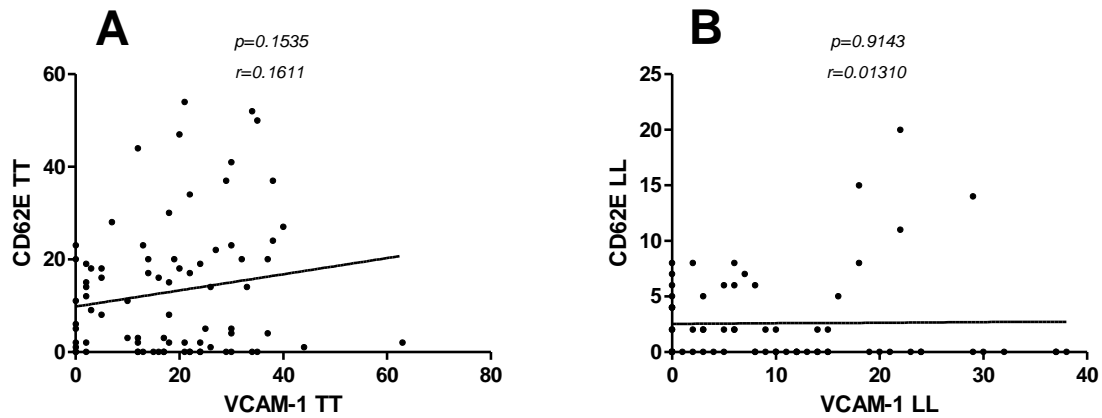


Figura 40 - Correlação entre a imunomarcção de VCAM-1 com o CD62E nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, fraca e não significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas VCAM-1 e CD62E  $r=0,1611$ ;  $p=0,0001$ . (B) Representa a correlação positiva, ínfima e não significativa na forma Virchowiana entre as moléculas VCAM-1 e CD62E,  $r=0,01310$ ;  $p=0,9143$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

Quando analisamos a correlação entre as moléculas VCAM-1 e a P-Selectina percebemos que em ambos os polos, tuberculóide e virchowiano, apresentaram uma correlação positiva fraca entre as moléculas representadas na figura 41 A e B respectivamente (Forma Tuberculóide  $r=0,2432$ ;  $p=0,0297$  e Forma Virchowiana  $r=0,1398$ ;  $p=0,2483$ ).

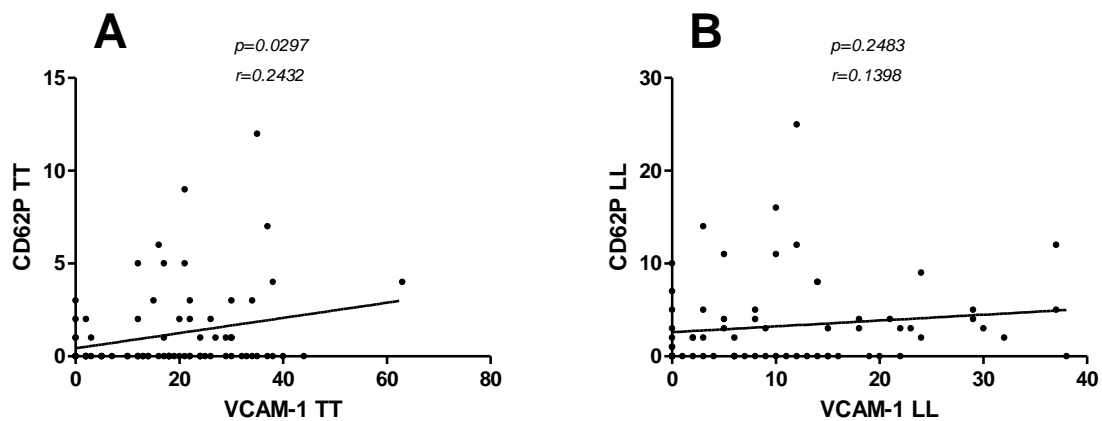


Figura 41 - Correlação entre a imunomarcção de VCAM-1 com o CD62P nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, fraca e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas VCAM-1 e CD62P  $r=0,2432$ ;  $p=0,0297$ . (B) Representa a correlação positiva, fraca e significativa na forma Virchowiana entre as moléculas VCAM-1 e CD62P,  $r=0,1398$ ;  $p=0,2483$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

## 6.11 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA MOLÉCULA VLA-4 COM A CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

A avaliação realizada pela análise da correlação entre as moléculas VLA-4 e a Selectina CD62E demonstraram serem semelhantes em ambos os polos da infecção. Na forma tuberculóide da infecção houve uma correlação positiva fraca com  $r=0,2146$  e não significativa com o  $p=0,2146$  (Fig. 42, A). O polo virchoviano também apresentou uma correlação positiva fraca e não significativa ( $r=0,0646$ ;  $p=0,2221$ ) (Fig. 42, B).

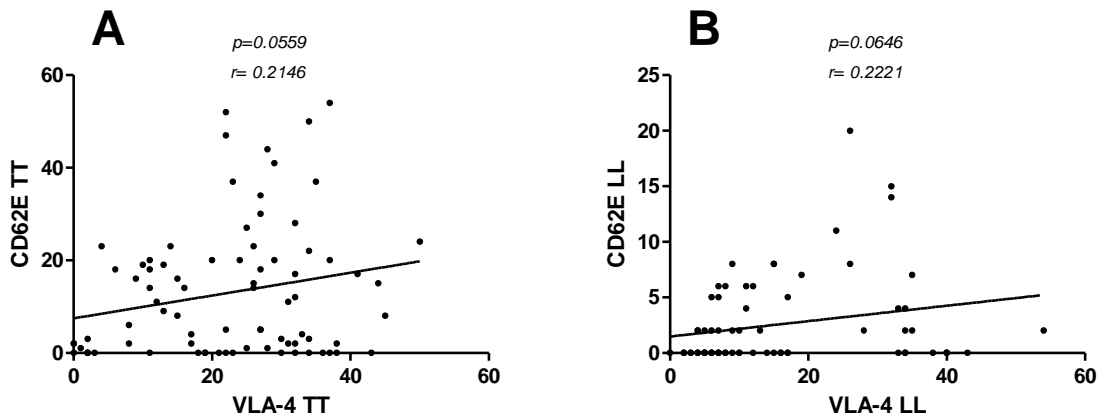


Figura 42 - Correlação entre a imunomarcção de VLA-4 com a CD62E nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, fraca e significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas VLA-4 e CD62E  $r=0,2146$ ;  $p=0,0559$ . (B) Representa a correlação positiva, fraca e significativa na forma Virchowiana entre as moléculas VLA-4 e CD62E,  $r= 0,2221$ ;  $p=0,0646$ . (Correlação de Pearson  $r$ )

Análise de correlação entre as moléculas VLA-4 e a CD62P das amostras estudadas demonstraram não ser significativas em ambos os polos da infecção. Porém, esta análise positiva e fraca pelo tuberculóide ( $r=0,1194$ ;  $p=0,2915$ ) e no polo virchoviano ela apresentou-se negativa e fraca com  $r= -0,1419$ ;  $p=0,2412$ ) (Fig. 43, A e B).

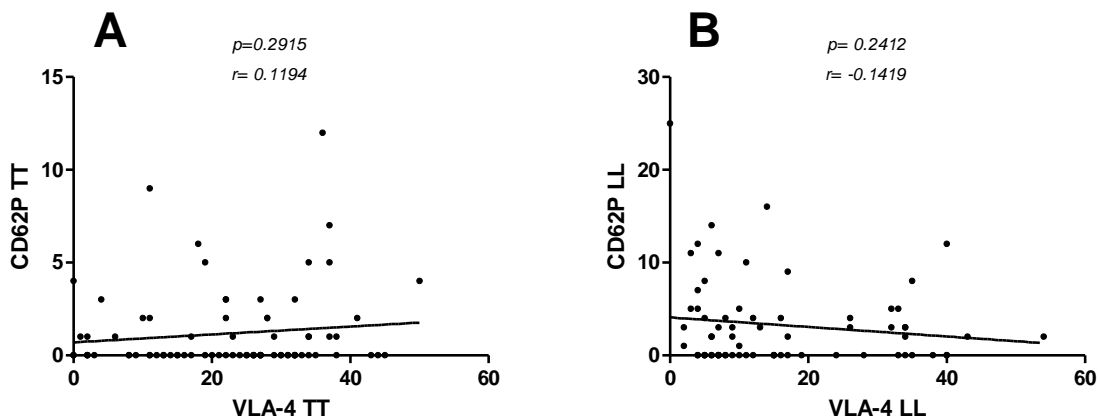


Figura 43 - Correlação entre a imunomarcção de VLA-4 com a CD62P nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação positiva, fraca e não significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas VLA-4 e CD62P  $r=0,1194$ ;  $p=0,2915$ . (B) Representa a correlação negativa, fraca e não significativa na forma Virchoviana entre as moléculas VLA-4 e CD62P,  $r= -0,1419$ ;  $p=0,2412$ . (Correlação de Pearson r)

## 6.12 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DAS MOLÉCULAS CD62E E CD62P NOS POLOS TUBERCULÓIDE E VIRCHOVIANO DA INFECÇÃO

Os resultados da análise de correlação entre as duas Selectinas estudadas a CD62E e a CD62P apresentaram em ambos os polos uma correlação negativa e ínfima com os valores de  $r= -0,03342$  e  $p= 0,7685$  no polo tuberculóide e  $r= -0,07529$  com  $p=0,5356$  (Fig. 44, A e B)

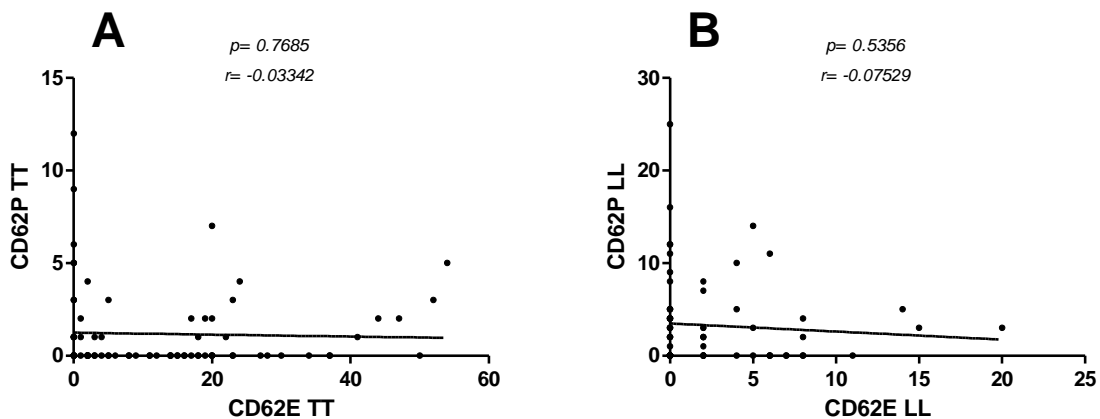


Figura 44 - Correlação entre a imunomarcção de CD62E com a CD62P nas formas TT e LL de hanseníase. (A) Representa a correlação negativa, ínfima e não significativa na forma Tuberculóide entre as moléculas CD62E e CD62P  $r= -0,03342$ ;  $p=0,7685$ . (B) Representa a correlação negativa, ínfima e não significativa na forma Virchoviana entre as moléculas CD62E e CD62P,  $r= -0,07529$ ;  $p=0,5356$ . (Correlação de Pearson r)

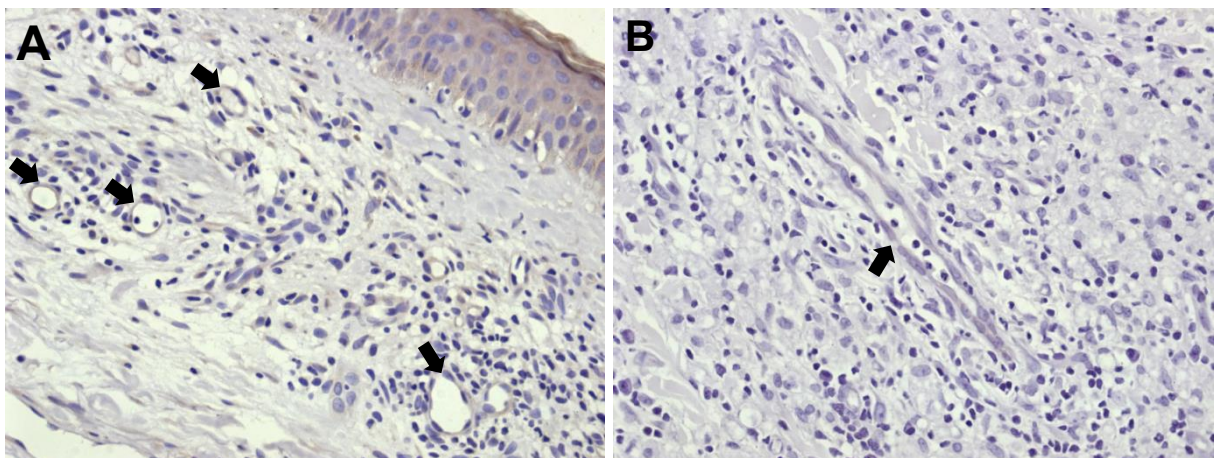


Figura 45- Análise imunohistoquímica de molécula CD62E nas amostras de pele de pacientes com hanseníase na forma Tuberculóide (TT) em aumento de 200x (A); Análise imunohistoquímica de molécula CD62E nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase na forma Virchoviana (LL) em aumento de 200x (B).

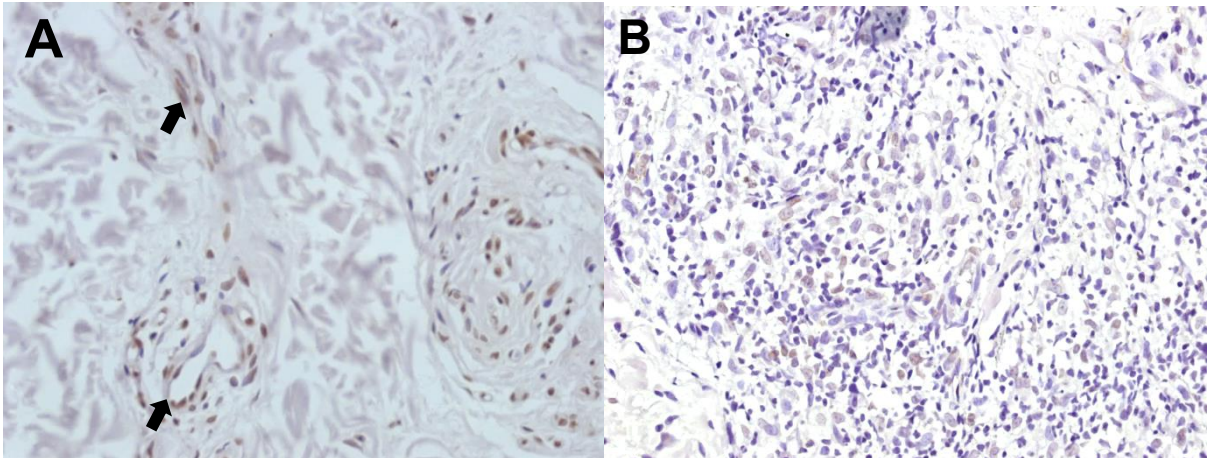


Figura 46 - Análise imunohistoquímica de molécula ICAM-1 nas amostras de pele de pacientes com hanseníase na forma Tuberculóide (TT) em aumento de 200x (A); Análise imunohistoquímica de molécula ICAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase na forma Virchowiana (LL) em aumento de 200x (B).

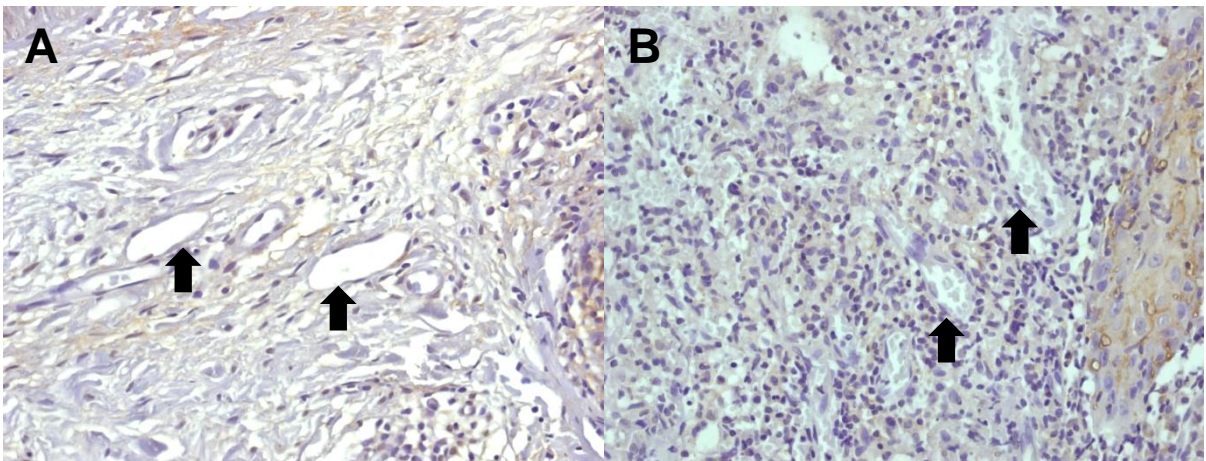


Figura 47 - Análise imunohistoquímica de molécula ICAM-2 nas amostras de pele de pacientes com hanseníase na forma Tuberculóide (TT) em aumento de 200x (A); Análise imunohistoquímica de molécula ICAM-2 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase na forma Virchowiana (LL) em aumento de 200x (B).

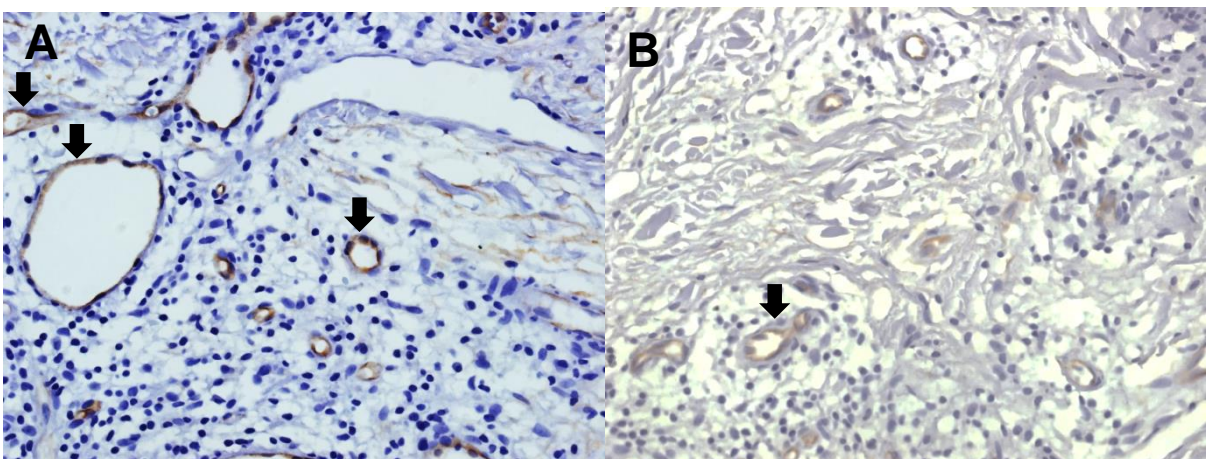


Figura 48 - Análise imunohistoquímica de molécula VCAM-1 nas amostras de pele de pacientes com hanseníase na forma Tuberculóide (TT) em aumento de 200x (A); Análise imunohistoquímica de molécula VCAM-1 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase na forma Virchowiana (LL) em aumento de 200x (B).

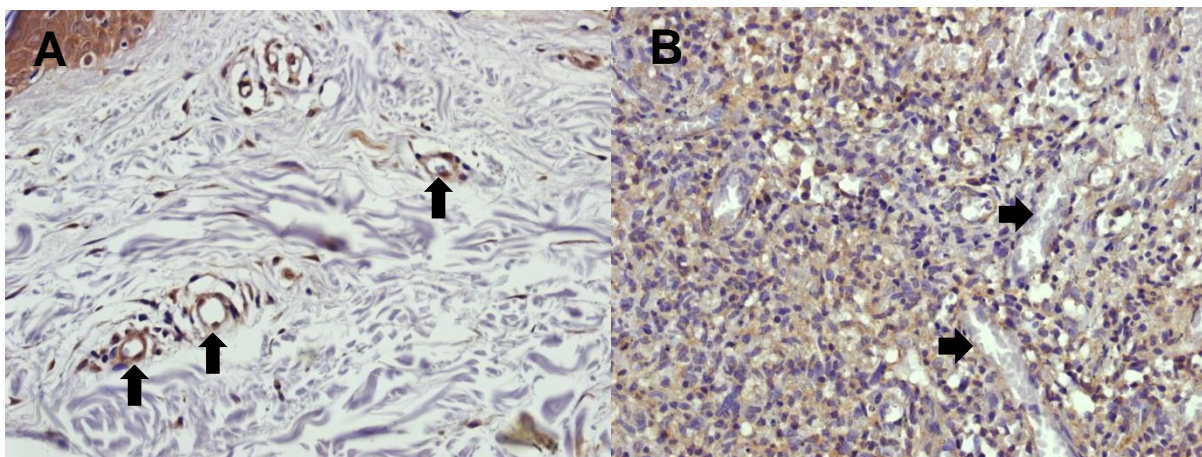


Figura 49 - Análise imunohistoquímica de molécula VLA-4 nas amostras de pele de pacientes com hanseníase na forma Tuberculóide (TT) em aumento de 200x (A); Análise imunohistoquímica de molécula VLA-4 nas biopsias de pele de pacientes com hanseníase na forma Virchoviana (LL) em aumento de 200x (B).

## 7. DISCUSSÃO

As características fisiopatológicas que definem o processo de formação do infiltrado inflamatório são dependentes de diversos fatores envolvidos na complexa relação entre o parasita e o hospedeiro, neste aspecto o estudo da hanseníase se destaca como ferramenta para análise do mecanismo envolto na seleção de células que migram em direção ao tecido inflamado. Sendo que as características clínicas da infecção pelo bacilo da Hansen estão relacionadas diretamente a resposta imunológica, diferenciando a lesão em formas clínicas polares, as quais foram alvos do nosso estudo.

O endotélio participa ativamente da resposta inflamatória, a presença de células do sistema imunológico no sítio de infecção se deve ao processo de transmigração endotelial. Este processo se apresenta em sequências de etapas de sinalização, adesão e migração das células plasmáticas em direção ao tecido, o que só é possível através da formação de complexos envolvendo moléculas co-estimulatórias de leucócitos, proteínas de adesão celular e vascular além de citocinas indutoras da síntese destas moléculas (KUKLA et.al., 2009; MULLER, 2011).

A expressão destas moléculas pelo endotélio sofre influência direta das citocinas plasmáticas. Entretanto, o próprio vaso sanguíneo, através da expressão de moléculas de adesão, pode influenciar o perfil de células que sofrem transmigração celular, e por sua vez pode atuar sobre o perfil de resposta imunológica vista no tecido.

### 7.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VLA-4, CD62E E CD62P

Devido as características clínicas e o perfil imunológico apresentados durante a infecção pelo bacilo da Hanseníase, podemos verificar alterações na presença de adesinas expressas pelo endotélio nas formas polares desta infecção. A alta marcação da molécula ICAM-1 e VCAM-1 na forma tuberculóide da doença, vista em nosso estudo, pode ser explicada pela estimulação da resposta imunológica apresentada neste polo. A forma tuberculóide leva a um aumento na expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , os quais são responsáveis pela ativação do endotélio e indução na expressão destas moléculas de adesão (HUBBARD & ROTHLEIN, 2000; D’ALESSIO et al., 1998)

O aumento das imunoglobulinas ICAM-1 e VCAM-1 são mediados pela ativação da produção intracelular do NF- $\kappa$ B, este fator de transcrição é induzido pela presença de TNF- $\alpha$  resultando no fortalecimento da sinalização de transmigração tecidual, através da relação entre o LFA-1 (integrina expressa na membrana de linfócitos) com o seu ligante endotelial o ICAM-1. Este mesmo mecanismo parece também estar envolvido na indução da produção de VCAM-1, o que fortalece ainda mais a relação entre o endotélio e migração de células com o perfil de Th1 em direção ao tecido (KIM et al., 2011; FOTIS et al., 2012).

Além da participação ativa do TNF- $\alpha$  na expressão do ICAM-1 em células endoteliais, outros mediadores incluindo a trombina, IL-1 $\beta$ , Lipopolissacarídeo (LPS), fator endotelial de crescimento (VEGF), stress, agentes oxidantes e agentes infeccioso também podem atuar nesta expressão (BURNS et al., 1999; RAHMAN & FAZAL, 2009). O mecanismo intracelular indutor da produção desta imunoglobulina parece ser comum a estes diversos agentes mediadores, incluindo a Interleucina-1 $\beta$  que é um dos agentes ativos no polo tuberculóide na hanseníase (NADLONEK et al., 2013).

Quando realizamos a análise do ICAM-1 em comparação com a presença das moléculas como o ICAM-2, VCAM-2, VLA-4, E e P-Selectinas, dividindo as amostras nos dois polos da doença, percebemos que o ICAM-1 esta presente em menor quantidade que estas outras moléculas em ambos os polos virchoviano e tuberculóide da infecção. Demonstrando assim, que apesar do ICAM-1 estar presente e altas quantidades no polo tuberculóide da infecção, esta imunoglobulina esta presente em menor quantidade em comparação as outras moléculas analisadas, superando somente a expressão da E-Selectina no polo virchoviano, o que pode ser explicado pela baixa indução na expressão a desta selectina neste polo, e também da P-Selectina em ambos os polos tuberculóides e virchoviano, fato este que pode estar relacionado a característica da CD62P de ser constitutiva e conseqüentemente apresentar baixa expressão em ambos os polos da infecção.



A correlação vista no polo tuberculóide, entre as moléculas ICAM-1 e VCAM-1 reforçam a importância destas imunoglobulinas na transmigração de linfócitos em direção ao tecido inflamado. O VCAM-1 parece não ser o principal agente envolvido na transmigração endotelial, porém os estudos que avaliaram o bloqueio simultâneo das moléculas ICAM-1 e do VCAM-1 demonstraram uma redução significativa na transmigração de leucócitos. Além disso, o VCAM-1 parece estar envolvido na sinalização intracelular que resulta na ruptura da junção de células endoteliais, facilitando assim o processo de diapedese das células do sistema imunológico (WITTCHEN, 2009; VAN et al., 2003; FOTIS et al., 2012).

A correlação entre o ICAM-1 as moléculas ICAM-2, VLA-4 e CD62E apresentaram-se como moderada e positiva no polo tuberculíde, fato este que não foi visto no polo virchoviano. Sabendo que a indução da expressão destas adesinas está estreitamente relacionada a quantidade de citocinas apresentadas na lesão, podemos explicar este fato através da característica imunológicas vistas no polo tuberculóide, o qual demonstra ter um alto perfil citocinas pró-inflamatórias, além de participar como mediador da ativação de células endoteliais levando a uma maior expressão destas adesinas (DIMITRIS et al. 2013)

A imunoglobulina ICAM-2, analisada no nosso estudo, demonstrou não sofrer influência na sua presença quanto ao polo da doença. As análises demonstraram não haver diferença significativa na quantidade de ICAM-2, quando comparamos os polos virchoviano e tuberculóide da infecção. Porém, podemos observar uma correlação moderada positiva entre a presença de ICAM-2 e as moléculas ICAM-1, VCAM-1 e VLA-4. Isso pode ser visualizado no polo tuberculíde da infecção. Quando analisamos o polo virchoviano, podemos verificar que houve uma correlação entre o ICAM-2 e ICAM-1 ínfima e negativa, e as correlações entre ICAM-2 e as moléculas VCAM-1 e VLA-4, neste mesmo polo, também se apresentaram fracas e negativas.

A imunoglobulina ICAM-2 é expressa de forma constitutiva por células endoteliais, e esta adesina não sofre grande influência das citocinas plasmáticas na sua expressão, isso ajuda a explicar as características visualizadas no nosso estudo. O ICAM-2 possui um papel de regulador da migração de leucócitos, sendo que a sua deficiência ou o seu bloqueio promove uma redução de 50% nos níveis de neutrófilos teciduais, chegando a apresentar uma redução em 64% no processo de transmigração celular. Esta imunoglobulina parece atuar em conjunto com o ICAM-1, que participa da etapa de estabilização e adesão firme do leucócito, enquanto o ICAM-2 trabalha mediando a transmigração celular (HUANG, et al. 2007).

Apesar do auxílio promovido pela molécula ICAM-2 na adesão firme durante a migração de leucócitos, percebemos que a presença desta imunoglobulina está reduzida na forma tuberculóide da infecção, quando comparada as outras integrinas como o VCAM-1 e o VLA-4. Entretanto os níveis de ICAM-2 não sofrem grandes modificações na sua expressão pelo virchoviano da infecção, demonstrando estar presente em uma quantidade semelhante nos dois polos da doença. Este fato reforça a característica constitutiva da expressão desta molécula. Porém, alguns estudos têm relatado alterações na expressão do ICAM-2 em patologias crônicas como doença de Crohn e algumas malignidades linfoides, outras pesquisas relatam uma redução na expressão do ICAM-2 ocasionada pela exposição prolongada a citocinas, o que pode ser um dos fatores que explicam as características vistas no nosso estudo, considerando que a hanseníase se desenvolve de forma lenta e crônica. (KRISHMA, et al. 2014; LECCE, et al. 2013; GŁOGOWSKA-LIGUS, et al. 2013).

No nosso estudo percebemos uma maior presença, da integrina VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) no polo tuberculóide. Sendo que houve uma correlação positiva moderada entre a imunoglobulina VCAM-1 e o seu ligante VLA-4 neste mesmo polo da doença. O polo virchoviano da infecção apresentou um número reduzido destas duas moléculas, (VLA-4 e o VCAM-1) além de demonstrar uma correlação fraca entre estas duas adesinas. Sabendo que os linfócitos com perfil Th1 apresentam altas taxas de VLA-4, e que o endotélio também expressa esta proteína, podemos assim criar uma correlação entre a expressão desta molécula e do seu ligante endotelial o VCAM-1 com o perfil de células encontrados nas formas tuberculóide da doença, fato este pode afetar diretamente a rolagem de linfócitos em direção ao tecido inflamado, modificando a presença de células com o perfil Th1 no sítio da infecção (BONDER et al., 2005; CAVERS, et.al., 2002; COSTA, et.al., 2003; OGAWA, et.al., 2010).

O bloqueio da integrina VLA-4 parece exercer uma redução significativa do influxo dos linfócitos com o perfil Th1 em direção ao tecido, este processo foi visto em células do endotélio pós sinusoidais do tecido hepático inflamado. Demonstrando assim a importância da integrina VLA-4 como mediador da resposta Th1, e reforça também a necessidade da presença do seu ligante endotelial o VCAM-1 neste processo. Avaliação da migração de células da linhagem Th2 não demonstrou ser influenciada pelo bloqueio da integrina  $\alpha 4\beta 1$  (BONDER et al., 2005; SCHNEIDER-HOHENDORF, et al., 2014).

Além da integrina VLA-4 estar diretamente ligada a infiltração de células da linhagem Th1, ela é responsável para migração de linfócitos que apresenta a proteína CD11b, mediando principalmente o aumento da presença de células T CD4<sup>+</sup> no tecido inflamado. O mecanismo envolto neste processo está relacionado aos efeitos pró-inflamatórios de células T efetoras,

mediadas pelo aumento da expressão do INF- $\gamma$  e IL-2, o que reforça o perfil da presença das moléculas VLA-4 encontrado no nosso estudo, o qual demonstrou ser superior no polo tuberculóide da infecção, aumentando assim a atividade desta integrina na presença de células T CD4 no tecido inflamado, realçando a participação desta células na ativação de uma resposta imunológica ativa contra o bacilo de Hansen (MINDUR, et al., 2014).

A possível seletividade das adesinas no recrutamento de células Th1 ou Th2 não está totalmente elucidada, entretanto não só o bloqueio de integrinas como o da VLA-4, mas também bloqueio das imunoglobulinas VCAM-1 pode resultar também em uma inibição da adesão de linfócitos Th1. Devemos ressaltar ainda que o bloqueio do ICAM-1 e do VCAM-1 influencia na migração dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> modificando assim a presença de células citotóxicas no tecido (BONDER et al., 2005; RADHAKRISHNAN et al., 2007).

No nosso estudo demonstramos que o polo virchoviano da infecção sofre uma redução na expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e VLA-4. O fator responsável por esta diferença entre os polos pode estar relacionado aos altos níveis de IL-4 e a presença de TGF- $\beta$  atua reduzindo a expressão destas adesinas. Podemos verificar ainda que o aumento na expressão de VCAM-1 está correlacionado a uma maior presença de macrófagos no infiltrado e uma concomitante presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no tecido inflamado, fator este que é visto no polo tuberculóide da infecção (HENSELEIT et al., 1994; SPOELSTRA et al., 1999).

As linhagens de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressam diferentes moléculas de adesão, apesar disso não distinguir entre as linhagens de linfócitos, podemos observar que as células T CD4<sup>+</sup> expressam uma maior quantidade de moléculas do tipo CD11b e CD11c, as quais se relacionam com ICAM-1 e VCAM-1 respectivamente. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também expressam CD11b e CD11c porém, as células T CD8<sup>+</sup> supressoras apresentam somente CD11b e a linhagem de T CD8<sup>+</sup> citotóxica expressam CD11c. Todos os linfócitos possuem em sua membrana a forma CD11a (LFA-1), que parece não variar de acordo com a linhagem de células (AGREWALA, KUMAR & VOHRA, 1997; CAVERS et al. 2002).

Quando realizamos a comparação entre a presença das moléculas ICAM-1 e VCAM-1, no polo virchoviano, podemos observar uma menor quantidade de ICAM-1. Sabendo que o LFA-1 se relaciona diretamente com a molécula ICAM-1, podemos reforçar a hipótese de que o déficit de ICAM-1 na membrana do endotélio influencia negativamente sobre a taxa linfócitos T CD4 observada no tecido (GOULART, PENNA & CUNHA, 2002).

Devemos ressaltar ainda que quando realizamos a comparação entre os dois polos da doença, analisando a presença marcadores VCAM-1 na forma tuberculóide em comparação ao ICAM-1 na forma virchoviana, observamos uma diferença significativa entre estas duas moléculas, demonstrando que a expressão de VCAM-1 no polo tuberculóide é superior a presença de ICAM-1 no polo virchoviano, reforçando a hipótese de que a imunoglobulina VCAM-1 participa ativamente da migração de linfócitos T CD8 citotóxicos observados na forma tuberculóide da infecção (GOULART, PENNA & CUNHA, 2002).

## **7.2 PAPEL DA E-SELECTINA E P-SELECTINA SOBRE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NAS FORMAS POLARES DE HANSENÍASE**

Além da participação ativa das imunoglobulinas e integrinas sobre o processo de migração de leucócitos durante a infecção pelo bacilo da Hansen, podemos destacar também a presença das selectinas na membrana de células endoteliais, atuando sobre a fase inicial de rolagem, resultando em uma interação entre os ligantes presentes nos leucócitos (PSGL-1, Sialyl Lewis X e LCA) com estas adesinas presentes no endotélio (CHASE, MAGNANI & SIMON, 2012).

A expressão da E-Selectina é mediada por citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1, sendo que a presença desta selectina no endotélio pode variar de acordo com a estimulação promovida por estes mediadores da resposta imunológica (STOCKER et al., 2000; HIRATA et al., 2000; KULIDJIAN, ISSEKUTZ & ISSEKUTZ, 2002). Entretanto também sabemos que a resposta inflamatória pode levar ativação de vários agentes intracelulares que atuam como mediadores do aumento destas citocinas, e conseqüentemente elevam a expressão de moléculas de adesão na parede do vaso, fortalecendo o ciclo que facilita a transmigração de células (SU et al., 2012). No caso da E-Selectina a sua expressão ocorre de forma máxima 4 horas após a estimulação das citocinas pró-inflamatórias, e a sua retirada da membrana é realizada através da internalização por endocitose e posterior degradação por lisossomos (MULLER, 2012).

Podemos observa no nosso estudo uma correlação positiva entre as moléculas CD62E e as imunoglobulinas ICAM-1, ICAM-2 e o VCAM-1, moléculas que estão mais presentes no polo tuberculóide da infecção, fortalecendo o vínculo entre a expressão destas moléculas através da indução de citocinas pró-inflamatórias. Fato este que facilita transmigração de células mediadoras da resposta Th1, aumentando a capacidade de combate ao *Mycobacterium leprae*. Podemos observar também uma variação da presença da CD62E entre as forma

polares de Hanseníase, e comprovamos através da imunomarcagem que há uma quantidade maior desta molécula na forma tuberculóide da infecção. Este fator pode favorecer de forma direta a migração linfócitos T em direção ao tecido inflamado, sendo que o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  mais presentes na forma tuberculóide da doença, pode ser o responsável pela estimulação da expressão destas selectina neste polo. Deste mesmo modo o déficit destas citocinas, apresentado pela forma virchoviana da infecção, pode afetar diretamente a presença da E-Selectina no endotélio e influenciar na redução da migração de células T em direção ao tecido (GOULART, PENNA & CUNHA, 2002; SULLIVAN, 1991).

Nas reações inflamatórias da pele os linfócitos T parecem depender da E-Selectina para sua migração demonstrando assim a importância desta molécula. As análises dos estudos que realizaram o bloqueio com anticorpos Anti-E-Selectina evidenciaram uma deficiência na migração de células T. Avaliação da migração de linfócitos da linhagem Th1 na inflamação da pele demonstrou que estas células sofrem uma redução significativa na sua migração, em camundongos que tiveram deleção da expressão desta adesina, resultado que reforça o papel da CD62E sobre o número de linfócitos desta linhagem encontrados no tecido (SU et al., 2012; MULLER, 2012). Além disso, o bloqueio combinado da E-Selectina e da P-Selectina parecem reduzir em até 70% a migração celular, demonstrando a importância destas moléculas e do estímulo indutor da expressão destas adesinas sobre o tecido inflamado.

Além de interagir com os outros ligantes leucocitários as Selectinas também pode se ligar a integrina VLA-4. Os estudos que analisaram o bloqueio simultâneo destas duas moléculas (E-Selectina e VLA-4) demonstraram uma redução em 85% no recrutamento de leucócitos, comprovando que ocorre uma cooperação entre estas duas adesinas durante a transmigração celular. O bloqueio único da integrina VLA-4 reduz em somente 60% a migração linfócitos durante a inflamação. Esta mesma análise, agora aplicado a P-Selectina, parece exercer uma influência mínima na migração de células reduzindo em apenas 10% o recrutamento de células T (ISSEKUTZ AC & ISSEKUTZ, 2002).

Alguns estudos sugerem também que a E-Selectina é um dos principais responsáveis pela adesão, sinalização, captura e rolagem de neutrófilos sanguíneos que se direcionam ao tecido (CHASE, MAGNANI & SIMON, 2012). Estes dados fortalecem a hipótese levantada pelo nosso estudo, de que a presença ou o déficit destas moléculas no endotélio pode influenciar diretamente o número de células presentes no tecido e também alterar o perfil de células de resposta imunológica encontrado no sítio da inflamação.

Quando realizamos avaliação da presença da P-Selectina no nosso estudo, podemos perceber um perfil contrário ao apresentado pela E-Selectina. A presença da molécula CD62P

foi baixa em ambas as formas polares da infecção. Porém, a imunomarcação desta molécula na forma virchoviana foi superior ao apresentado pela forma tuberculóide da doença. As lesões com características tuberculóides demonstraram ter uma maior presença da molécula E-Selectina em comparação com a expressão da P-Selectina, e quando analisamos o polo virchoviano verificamos que a presença da CD62P é semelhante a expressão da CD62E. A CD62P pode ser expressa na membrana do endotélio de forma constitutiva, sem a necessidade da indução mediada por citocinas. Entretanto, sabemos que a Interleucina-4 é encontrada principalmente na forma virchoviana da infecção, e que esta citocina pode ser responsável pela maior expressão da P-Selectina em lesões inflamatórias crônicas. Além disso, estudos demonstram que a presença de IFN- $\gamma$  pode retardar a expressão de P-Selectina em células endoteliais humanas, isso pode influenciar diretamente o equilíbrio entre as respostas Th1-Th2, atuando sobre a transmigração dos leucócitos (GOULART, PENNA & CUNHA, 2002; SULLIVAN, 1991; HICKEY et al., 1999; HIRATA et al., 2000).

O que está claro é que tanto a P-Selectina como a E-Selectina parecem agir de forma semelhante sobre o recrutamento de linfócitos, e percebemos pelo nosso estudo que o déficit na expressão da E-Selectina encontrado na forma virchoviana da doença pode estar influenciando a migração de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, fato este que prejudica diretamente a capacidade de resposta imunológica vista no tecido.

Além de participarem na transmigração de linfócitos, as duas selectinas (E-Selectina e P-Selectina) favorecem a migração de neutrófilos em direção ao tecido inflamado, a E-Selectina promove uma junção de força tensional que facilitam a redução na velocidade de passagem da célula e auxilia na primeira etapa de migração dos neutrófilos (KADONO, 2010). As análises que realizaram o bloqueio da P-Selectina demonstraram uma significativa deficiência na migração de neutrófilos em direção ao tecido inflamado. O que fortalece o papel desta molécula como mediador na migração de células polimorfonucleares (LUO et al., 2013).

A interação das selectinas com os leucócitos não favorece somente a transmigração tecidual e este mecanismo parece estar integrado ao processo de ativação de um sistema intracelular que sinaliza para produção e expressão de outras integrinas e imunoglobulinas. O papel inicial na adesão e rolagem de leucócitos mediado pela E-Selectina e a P-Selectina parece estar diretamente ligado a uma cascata de eventos celulares que cooperam, resultando na ativação das células endoteliais, que promovem a expressão de mediadores de adesão firme como as  $\beta_1$  integrinas, dando continuidade na rolagem dos leucócitos e na transmigração celular (WHYTE et al., 1996; HIRATA et al., 2000; LUO et al., 2013)

## 8. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos pelo estudo, os resultados nos permitiu concluir que:

- Houve uma maior presença das moléculas de adesão na forma tuberculóide da infecção o que pode ser diretamente influenciado pela maior presença de citocinas pró-inflamatórias neste polo da doença;
- A maior presença das imunoglobulinas ICAM-1, VCAM-1 e a integrina VLA-4 demonstram a importância destas moléculas na migração e na seleção das células que chegam ao tecido inflamado. O que determina a elevação na presença de células CD4 e maior ativação a via citotóxica do polo tuberculóide.
- As moléculas E-Selectina e P-Selectina, participam ativamente do processo de migração celular, destacando assim a presença da E-Selectina no polo tuberculóide que pode auxiliar diretamente a capacidade de migração celular e formação do infiltrado inflamatório.
- A falha na indução da expressão CD62E na forma virchoviana destas moléculas se assemelha a presença da P-Selectina. Porém as duas apresentaram uma baixa imunomarcção,. Este fator interfere diretamente na capacidade de migração celular, potencializando o déficit imunológico visto na forma virchoviana da infecção.

Em resumo podemos concluir que o polo tuberculóide não só expressa uma maior quantidade de adesinas, mas também é beneficiado através da capacidade da predileção destas moléculas pela migração de células com o perfil Th1 em direção ao tecido inflamado, fato este não foi visualizado no polo virchoviano.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGREWALA, J. N.; KUMAR, B. & VOHRA, H. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. **Clin. Exp. Immunol**, v. 111, p. 56-63, 1997.

ARAÚJO, M., G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.3, p. 373-382, 2003.

BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, 2002.

BONDER, C. S. et al. Rules of recruitment of Th1 and Th2 Lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. **Immunity**, v. 23, p. 153-163, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de Saúde: Epidemiológicas e Morbidades. **Departamento de Informação e Informática do SUS. (DATASUS)**, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados. **Departamento de Vigilância Epidemiológica**, 2009.

BURNS L.J., et al. Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. **Transplantation.**, v. 67, p.137-144,1999.



CAVERS, M., et al. Differential expression of  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrins and L-selectin on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in human blood: comparative analyses between isolated cells, whole blood samples and cryopreserved preparations. **Clin. Exp. Immunol**, v. 127, p. 60-65, 2002.

CÉCILE T. et al. Regulation of the CD4+ T cell allo-immune response by endothelial cells. **Human Immunology**, v. 73, p. 1269–1274, 2012.

CHASE, S. D.; MAGNANI, J. L.; SIMON, S. I. E-Selectin Ligands as Mechanosensitive Receptors on Neutrophils in Health and Disease. **Annals of Biomedical Engineering.**, v. 40, n. 4, p. 849–859, 2012.

COSSERMELLI-MESSINA, W. & COSSERMELLI, W. Humoral immunity in Hansen's Disease. **São Paulo: Medical Jornal**, v. 113, n. 4, p. 929-934, 1995.

COSTA, R.P., et al. Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishman patients. **Immunol Lett**, v. 90, n. 2-3, p. 155-159, 2003.

D'ALESSIO P., et al. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF- $\alpha$  are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 6, p. 979–987, 1998.

DE VRIES, I. J., et al. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: Effects of TNF-a and IL-4. **Dermatologic diseases.**, v. 102, n. 3, p. 461-468, 1998.

DIMITRIS T. et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. **Pharmacology & Therapeutics**, 2013.

EVANS, R. et al. Integrins in immunity. **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 215-225, 2009

FOTIS L., et al. M. Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis?. **Hormones.**, v. 11, n.2, p. 140-146, 2012.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 1185–1197, 2013.

GŁOGOWSKA-LIGUS, J., et al. Expression analysis of intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) in the context of classical cardiovascular risk factors in acute coronary syndrome patients. **Arch Med Sci.**, v. 9, p. 6: 1035–1039, 2013.

GONZÁLEZ-AMARO, R. et al. Co-stimulatory signals increase the reactivity of  $\gamma\delta$  T cells towards mycobacterial antigens. **Clin. Exp. Immunol**, v. 120, p. 468-475, 2000.

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

GRAILER, J. J.; KODERA, M. & STEEBER, D. A. L-selectin: Role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. **Journal of Dermatological Science**, v. 181, 2010.

HALACHEVA, K. et al. Expression of ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and TNF $\alpha$  on the endothelium of femoral and iliac arteries in thromboangiitis obliterans. **Acta histochemica**, v. 104, n. 2, p. 177-184, 2002.

HAWORTH, O. et al. A role for the integrin  $\alpha_6\beta_1$  in the differential distribution of CD4 and CD8 T-cell subsets within the rheumatoid synovium. **Rheumatology**, n. 47, p. 1329-1334, 2008.

HENSELEIT, U. et al., Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. **Exp. Dermatol.**, v. 3, n. 6, p. 249-256, 1994.

HICKEY, M.J., et al. Varying Roles of E-Selectin and P-Selectin in Different Microvascular Beds in Response to Antigen. **J. Immunol.**, v. 162, p.1137-1143, 1999.

HIRATA, T., et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. **J. Exp. Med.**, v. 192, n.11, p.1669-76, 2000.

HUANG M-T., et al. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. **Hemo., Thromb., and Vas. Biol.**, v. 107, n. 12, p. 4721-27, 2006.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (icam-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 2000.

HUBBARD, AK; ROTHLEIN R., Intercellular adhesion molecule-1 (icam-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 2000.

ISHII, N. et al. Immunohistochemical analysis of cell surface markers in leprosy patients. **Nippon Rai Gakkai Zasshi**, v. 62, n. 2, p. 49-54, 1993.

ISSEKUTZ, A.C.; ISSEKUTZ, T.B. The Role of E-Selectin, P-Selectin, and Very Late Activation Antigen-4 in T Lymphocyte Migration to Dermal Inflammation. **J. Immunol.**, v. 168, p.1934-1939, 2002.

JINGWEN, C; QING, S. Quantitative and Multiplexed Study of Endothelial Cell Inflammation. **Cell Biochem Biophys**, v. 014, p. 29-8, 2014.

KADONO T. The role of adhesion molecules in cutaneous inflammation. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**, v. 33, n. 5, p. 242-248, 2010.

KADONO T., The role of adhesion molecules in cutaneous inflammation. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**, v. 33, n. 5, p. 242-248, 2010.

KAISA, A.; SIRPA, J.; MARKO, S. Expression and function of endothelial selectins during human development. **Immunology**, v. 143, p. 406–415, 2014.

KIM Y. M., et al. Compound C independent of AMPK inhibits ICAM-1 and VCAM-1 expression in inflammatory stimulants-activated endothelial cells in vitro and in vivo. **Atherosclerosis**, v.219, p. 57–64, 2011.

KRISHMA H., et al. ICAM-2 facilitates luminal interactions between neutrophils and endothelial cells in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 127, p. 620–629, 2014.

KUKLA M., et al. sPECAM-1 and sVCAM-1: role in pathogenesis and diagnosis of chronic hepatitis C and association with response to antiviral therapy. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 2, n. 2, p 79–90, 2009.

KUKLA, et al. Specam-1 and Svcam-1: role in pathogenesis and diagnosis of chronic hepatitis C and association with response to antiviral therapy. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 2, n. 2, p.79-90, 2009.

KULIDJIAN, A.A.; ISSEKUTZ, A.C.; ISSEKUTZ, T.B. Differential role of E-selectin and P-selectin in T lymphocyte migration to cutaneous inflammatory reactions induced by cytokines. **International Immunology**, v.14, n. 7, p. 751-760, 2002.

LAWSON C.; WOLF S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 22-32, 2009.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacological Reports**, n. 61, p. 22-32, 2009.

LECCE L., et al. ICAM-2 and lipid rafts disappear from the basal plasma membrane of uterine epithelial cells during early pregnancy in rats. **Cell Tissue Res**, v. 353, p. 563–573, 2013.

LIMEIRA, O. M., et al. Active search for leprosy cases in midwest Brazil: a serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with bacillus Calmette-Guérin. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 173-177, 2013.

LINDOSO, J. A. L. & LINDOSO, A. A. B. P. Doenças tropicais negligenciadas no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, 2009.

LIPPOLIS, J.D. Immunological signaling networks: Integrating the body's immune response. **Journal of Animal Science**, v. 86, 2007.

LUDWIG, et al. Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with  $\alpha 4\beta 1$  integrin. **Immunology The Journal of cells, molecules, systems and technologies**, n. 128, p. 196-205, 2009.

LUO, J., et al. PI3K is involved in  $\beta 1$  integrin clustering by PSGL-1 and promotes  $\beta 1$  integrin-mediated Jurkat cell adhesion to fibronectin. **Mol Cell Biochem**, 2013.

MACHADO, et al. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 6, 2009.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MARTIN, S. et al., The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. **Thrombosis Research**, v. 133, p. 855–862, 2014.

MATTOS, D.M. & FORNAZARI, S.K. A lepra no Brasil: representações e práticas de poder. **Cadernos de Ética e Filosofia Política**, v. 6, n. 1, p. 45-57, 2005.

MENDONÇA, et al. Immunology of leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n. 6, p. 647-664, 2008.

MENICUCCI, et al. Microscopic leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, n. 4, p. 648-652, 2005.

MINDUR, J. E., et al., Early Treatment with Anti-VLA-4 mAb Can Prevent the Infiltration and/or Development of Pathogenic CD11b+CD4+ T Cells in the CNS during Progressive EAE. **Plos one**, v. 9, n. 6, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Informática do SUS. **[DATASUS] Informações de 2005**. Disponível em://<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acesso em: 08 agosto, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Informática do SUS. **[DATASUS] Informações de 2008**. Disponível em://<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acesso em: 08 agosto, 2011.

MONCADA, B. et al., Lack of expression of intercellular adhesion molecule ICAM-1 in lepromatous leprosy patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobact Dis.**, v. 61; n. 4, p. 581-585, 1993.

MOREIRA, A. J., et al. Ação educativa sobre hanseníase na população usuária das unidades básicas de saúde de Uberaba-MG. **Saúde Debate**, v. 38, n. 101, p. 234-243, 2014.

MULLER, W. A., Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v.6, p. 323–44, 2011.

MULLER, W.A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 6, p. 323–44, 2011.

MYRVANG, B. et al., Immune responsiveness to mycobacterium leprae and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. **Clin. exp. Immunol.**, n. 14, p. 541-553, 1973.

NADLONEK N., et al. Interleukin-1 Beta Induces an Inflammatory Phenotype in Human Aortic Valve Interstitial Cells Through Nuclear Factor Kappa Beta. **Ann. Thorac. Surg.**, v.96, p.155–62, 2013.

OGAWA, A., et al., The differential role of L-Selectin and ICAM-1 in Th1-type e Th2-type contact hypersensitivity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 1558-1570, 2010.

OKANISHI, H.; KAGAWA, Y.; WATARI, T. Expression of selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in dogs with lymphocytic–plasmacytic enteritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 161, p.42–48, 2014.

QUARESMA, J. A. S. et al. Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 49; 2010.

RADHAKRISHNAM, S. et al., Induction of a Th1 response from Th2-polarized T Cells by Activated Dendritic Cells: dependence on TCR: peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN- $\gamma$ . **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 3583-3592, 2007.

RADHAKRISHNAN S., et al. Induction of a Th1 response from Th2-polarized T Cells by Activated Dendritic Cells: dependence on TCR: peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN- $\gamma$ . **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 3583-3592, 2007.

RAHMAN A; FAZAL F., Hug Tightly and Say Goodbye: Role of Endothelial ICAM-1 in Leukocyte Transmigration. **Antioxidants & Redox Signaling.**, v.11, n. 4, p 823-839, 2009.

RAJENDRAN, R. et al.,  $\alpha 4\beta 1$  integrin-dependent cell sorting dictates T-cell recruitment in oral submucous fibrosis. **Journal of Oral and Maxillofacila Patohology**, v. 15, n. 3, p. 272-277, 2011.

RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. **A five group system. Int. J. Lepr.**, n. 34, p. 255-272, 1966.

SCHNEIDER-HOHENDORF, T., et al. VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. **J. Exp. Med.**, v. 211, n.9, 2014.

SIMINIAK, T., et al. The release of soluble adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin after acute myocardial infarction and following coronary angioplasty. **International Journal of Cardiology**, v. 61, p. 113–118, 1997.

SOARES, Claudio. Hanseníase no estado do Pará: perfil epidemiológico da população que demanda internação por reações hansênicas. **Dermatologic Diseases.**, n. 3, p. 461-468, 2001.

SOUZA, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 325-334, 1997.

SPOELSTRA, F.M., et al. Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. **Eur. Respir. J.** v. 14, p. 759-766, 1999.

SPOELSTRA, F.M., et al., Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. **Eur. Respir.**, v. 14, p. 759-766, 1999.

STOCKER, C. J., et al. TNF- $\alpha$ , IL-4, and IFN- $\gamma$  Regulate Differential Expression of P and E-Selectin Expression by Porcine Aortic Endothelial Cells. **J. Immunol.**, v.164, p. 3309-3315, 2000.

SU, Y., et al. The role of endothelial cell adhesion molecules P-selectin, E-selectin and Intercellular adhesion molecule-1 in leucocyte recruitment induced by exogenous methylglyoxal. **Immunology.**, n. 137, p. 65–79, 2012.

SULLIVAN, L. et al. Expression of Adhesion Molecules in Leprosy Lesions. **Infection and Immunity**, v. 59; n. 11, p. 4154-4160, 1991.

SUNDERKÖTTER, C. et al. Activated T cells induce expression of E-selectin *in vitro* and in an antigen-dependent manner *in vivo*. **European Journal of Immunology**, v. 26 n. 7, p1571-1579, 2005.

TELES, R. M. B. et al. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of Mycobacterium leprae by schwann cells in human leprosy. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4634-4643, 2010.

VAN W. S., et al. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 285, p.343-352, 2003.

WHYTE, A., et al. Lymphocyte subsets and adhesion molecules in cutaneous inflammation induced by inflammatory agonists: correlation between E-selectin and gamma delta TcR+ lymphocytes. **Lab Invest.**, v. 75, n.3, p. 439-49, 1996.

WITTCHEN E. S., Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. **Front Biosci.**, v.4, p. 2522-2545, 2009.

XU, H., et al., Recruitment of IFN- $\gamma$ -producing (Th1-like) cells into the inflamed retina *in vivo* is preferentially regulated by P-selectin glycoprotein ligand 1:P/E-selectin interactions. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3215–3224, 2004.

**ANEXO**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP