



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

JORGE RODRIGUES DE SOUSA

**POLARIZAÇÃO DE RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS E SUAS POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGÊNESE DA DOENÇA DE HANSEN**

**BELÉM-PA
2016**

JORGE RODRIGUES DE SOUSA

**POLARIZAÇÃO DE RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS E SUAS POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA DE HANSEN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

BELÉM-PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Sousa, Jorge Rodrigues de, 1985-
Polarização de resposta dos macrófagos e suas
possíveis implicações na imunopatogênese da doença de
hansen. / Jorge Rodrigues de Sousa. - 2016.

Orientador: Juarez Antônio Simões Quaresma.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical,
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais,
Belém, 2016.

1. Hanseníase. 2. Macrófagos. 3.
Polarização. I. Título.

CDD 22. ed. 616.998

JORGE RODRIGUES DE SOUSA

**POLARIZAÇÃO DE RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS E SUAS POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGÊNESE DA DOENÇA DE HANSEN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do
Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Orientador – CCBS/UEPA

Profa. Dra. Tinara Leila de Souza Aarão
Membro Avaliador – NMT/UFPA

Profa. Dra. Luisa Caricio Martins
Membro Avaliador – NMT/UFPA

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii
Membro Avaliador – NMT/UFPA

Prof. Dr. George Alberto Dias
Membro Avaliador – CCBS/UEPA (Suplente)

Dedico esta dissertação a meus pais pelo exemplo de seres humanos que procuro seguir. Por todo carinho, amor, que sentem por mim. Por me ensinarem a trilhar o caminho do sagrado coração de Maria recheado de compaixão, humildade e fraternidade.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Jorge de Sousa e Maria do Carmo Rodrigues de Sousa

Aos meus pais, por tudo que representam em minha vida. Já passamos por tantas dificuldades que hoje sinto o peso de quanto valeu a pena termos vivido tudo que vivemos. Tenham a certeza que no quarto mandamento da sagrada família, sempre honrarei e respeitarei vocês. No meu coração de filho sempre faltaram palavras, mas tenham a certeza de uma coisa: EU AMO MUITO vocês. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos e por sempre estenderem a mão amiga e confortarem meu coração nos momentos mais difíceis de minha vida.

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Ao meu orientador, por ter acreditado em mim e por ter transformado um sonho de criança em realidade. Ao senhor professor, tenha certeza que sempre serei eternamente grato.

Hoje, a minha alegria e felicidade se traduzem na emoção de todos os momentos que a mão amiga da ciência foi estendida do pai para com o filho científico onde Juntos sonhamos, vislumbramos e caminhamos pelo mundo desconhecido e fascinante da ciência.

Meus agradecimentos ao senhor professor perpassam pelos momentos de descontração que muita das vezes me fizeram tão bem. Por todas as vezes que o senhor em meio a tantos compromissos, na correria do dia a dia, sempre esteve disposto a ouvir as minhas perturbações e apostar numa ideia nova. Pelo senhor professor, sempre nutrirei um carinho todo especial. Que deus continue lhe abençoando. Que o senhor independente da posição social continue tendo esse grande coração fraterno que é apaixonado pela vida, pela ciência, pelos seus pais e acima de tudo por Deus e Nossa Senhora. Que o senhor ainda possa formar muitos profissionais no nosso estado e que a vida sempre lhe brinde com tudo que ela tem de melhor.

AGRADECIMENTOS

Escrever um agradecimento nunca será e nem vai ser fácil porque dependendo da trajetória que é construída a vida pode lhe brindar com tantos momentos especiais.

Hoje, no termino desta minha caminhada simplesmente passa um filme na cabeça de quando criança, ajudando minha mãe, Maria do Carmo Rodrigues de Sousa a carregar aquele bando de livro para a escola... Lembro de uma vez que perguntei para minha velha o que era ciência e o que era ser cientista e ela com a maior delicadeza me disse que cientista é aquele profissional inquieto que vive se questionando e descobre coisas novas.

Diante de tantos desafios neste mundo, ao ingressar na faculdade de farmácia, em meio as minhas inquietações, foi que acabei conhecendo o grande amor de minha vida e é por quem começo os meus agradecimentos.

A minha noiva Andrea Marinho da Silva: obrigado por fazer parte de minha vida. Por toda sua meiguice, generosidade, pela bondade. Por me apresentar a sua historia de vida e de seus familiares que todas as vezes que lembro me emociono. Aos seus pais e seus irmãos, agradeço a cada um por todo o carinho e por terem me recebido tão bem em sua casa.

Em memória, fica aqui o meu agradecimento a Maria de Jesus Leite Lopes, minha tia, a qual sempre nos términos dos jantares em sua casa ficava por horas conversando comigo. O sofrimento que foi partir do interior em meio a tantas dificuldades enfrentadas junto com minha mãe. As histórias do governador Manoel Barata, a ditadura, os tempos difíceis. Tudo isso só me engrandeceu como ser humano e uma coisa que sempre lembrarei é de como ela me ensinava a ter educação financeira.

Aos meus irmãos: Romualdo Rodrigues de Sousa, Janilson Alves Nunes, Joelson Alves Nunes, agradeço imensamente por toda generosidade, por sempre torcerem pelo meu sucesso e acima de tudo por me mostrarem o quanto a construção da família é importante.

Aos meus amigos de infância: Allan Tafarrel, Luis Fernando Francez Sassim, José Veloso Neto e Benedito Leandro Francez Sassim, muito abrigado por fazerem parte de minha vida e nestes 20 anos de amizade, obrigado por compartilharem

comigo, o respeito, a união, o companheirismo, os momentos de alegria e de tristeza.

A Prof^a. Dr^a. Denise Pinto, a quem não tenho palavras para descrever. Simplesmente a senhora foi mentora de tudo. A senhora professora, meu muito obrigado e aqui fica o meu eterno agradecimento.

A turma do laboratório de imunopatologia que quando lá atrás, ao iniciarmos um novo ciclo é que agradeço aos meus companheiros de iniciação científica, Paulo Ygor Agrassar Silva e Luiz Fernando Barros. Lembro-me como se fosse hoje nós três morrendo de medo de pipetar os anticorpos por conta do valor, as diluições tão pequenas. Entre uma bateria e outra vinham as conversas, nos tornando cada vez mais próximos e foi aí que tive a oportunidade de desfrutar da amizade destes meninos de ouro que hoje estão na residência e que tenho certeza que serão excelentes profissionais.

No time da biologia molecular, meus agradecimentos a Prof^a. Dr^a. Marizeli Viana de Aragão Araújo que é uma daquelas pessoas que da vontade de ficar perto dela que o tempo passa por conta da generosidade, da simpatia e como a gente se sente bem perto dela. Ao Prof. Dr. George Alberto Dias que no início de minha caminhada me ajudou tanto com as suas conversas. Hoje vendo seu crescimento é tão motivador ver que a pessoa que um dia você se espelhou cresce profissionalmente e começa a construir sua história no mundo da fisioterapia. A Msc. Elcimara Chagas e a Dr^a. Rafaela Baraúna, fica aqui registrado todo o meu carinho e minha gratidão. Sem essas duas não tinha noivado. Obrigado meninas pelas boas conversas na pizzaria, na sorveteria. Se vocês soubessem o quanto gosto de vocês... Que deus sempre ilumine a trajetória de ambas.

Na nova leva de pessoas que hoje compõe o time da biologia molecular, meus agradecimentos ao Prof. Dr. Gilberto Toshimitsu Yoshikawa. Ter feito a disciplina de epidemiologia na pós-graduação com você me mostrou o quanto a disciplina de reumatologia tem um grande profissional. Obrigado por tornar as sextas tão confortáveis e pelas conversas tão agradáveis. Quando a Letícia Martins o chama de meu reumato favorito ela tem toda a razão.

Também não posso deixar de agradecer a minha companheira de pós-graduação, Jessica Gomes que é uma pessoa super do bem, bastante dedicada a qual tenho certeza que no futuro será uma grande profissional. A Elisa Soares fica

meu agradecimento pela boa companhia e os momentos de muita descontração em meio a tanta atividade.

Passando agora a agradecer ao time da imunoistoquímica, meus agradecimentos todo especial a Msc. Luciana Mota Silva e a Msc. Kelly Emi Hirai. A vocês meninas meu muito obrigado. Juntos tenho certeza que construímos uma bela história. Já passamos por cada contra tempo. Em meio a tantas dificuldades no mundo da ciência, conseguimos superá-las e brindar o *Pubmed* com excelentes trabalhos. Deus abençoe vocês e saibam que desfrutar da amizade de ambas é um verdadeiro banquete. Em meio a tantas incertezas tenho certeza que um dia vocês construíram uma bela história e eu estarei de pé para aplaudir a caminhada de vocês.

Ao Prof. Dr. Juarez de Souza, fica registrado aqui todo meu apressado por um cara super gente boa que por muita das vezes dividiu conosco momentos muito especiais que ficaram guardados na memória com muito carinho. A Dandara Almeida fica os meus agradecimentos a esta biomédica que hoje caminha pelo mundo da estética. Que Deus te abençoe e que você tenha muito sucesso. A Msc. Larissa Freitas e o Rafael Araújo, muito obrigado pelas inúmeras conversas que tivemos. Obrigado por me ensinarem a comer sushi na volta do rafael do Japão, por fazerem parte do meu ciclo de amizade e saibam que tenho uma tremenda admiração por cada um.

Aos novos alunos de iniciação científica: Diogo, Allef, Eduardo, Iana, Junior, Rafael, Caio, Denilson, que Deus abençoe vocês e que no futuro vocês tenham muito sucesso.

A todos do laboratório de análises clínicas, sem exceção: A Amanda, Marcella, Adriana, Andrei, Andrea, Patrícia, Nayana, Carla, Monique, Leandro, Maria Inês, Jaqueline, Roseane, Dona Fátima, Prof^a. Dr^a. Luisa Caricio. Fica aqui todo o meu apressado e carinho por todos os momentos de felicidade e alegria que dividi com vocês.

Nesta leva de tantas pessoas especiais, não poderia deixar de agradecer em especial a Prof^a. Dr^a. Hellen Thaís Fuzii e a Prof^a. Dr^a. Tinara Leila de Souza Aarão. As duas pessoas que em muitos momentos seguraram em minha mão, acalmaram a tempestade imunológica, trouxeram a abonaça e colocaram a caravela no caminho correto.

Por fim, aqui ficam os meus agradecimentos ao pai celestial que conhece todos os nossos medos, nossas virtudes, nossos desejos, nossas aspirações, nossos amores, nossos pecados, nossas angústias, nossos sofrimentos, nossas derrotas, nossas vitórias. Ao pai que constrói a ponte para trilharmos o caminho da paz, de luz, de compaixão, de humildade, termino minha gratidão com a frase que todos os cristãos com o coração cheio de ternura pronunciam: TE AMO JESUS DE NAZARÉ.

“Isto é para os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os desordeiros. Para os peixes fora da água. Para aqueles que veem as coisas de forma diferente. Eles não gostam de regras. E não nutrem o menor respeito pelo status quo. Você pode citá-los, discordar deles, glorificá-los ou difamá-los. A única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles transformam as coisas. Eles impulsionam a raça humana para frente. Enquanto alguns os veem como loucos, nós vemos gênios. Porque as pessoas que são loucas o suficiente para achar que podem mudar o mundo são as que, de fato, mudam”.

Steve Jobs

RESUMO

A hanseníase é uma doença espectral na qual o bacilo provoca alteração no ambiente tecidual e modificações no curso da resposta imunológica no espectro da doença. Os macrófagos são uma das principais células que participam da resposta contra o *M. leprae* sofrendo processo de diferenciação, modificando seu comportamento e polarizando a resposta entre a via clássica composta pelos macrófagos M1 que produzem mediadores pró-inflamatórios e a via alternativa conhecida como via reparadora tendo como representante os macrófagos M2 e seus subtipos que produzem citocinas anti-inflamatórias. Na doença de hansen, pouco são os estudos que abordaram os caminhos da polarização no espectro da doença. Neste contexto, no intuito de compreender melhor o comportamento da célula nas formas polares da doença, o presente estudo investigou os caminhos da polarização de resposta dos macrófagos e suas possíveis implicações na doença de hansen. Ao todo, foram utilizados 33 blocos com fragmentos de lesão de pele de pacientes com diagnóstico confirmado para a doença segundo os critérios de Ridley e Jopling. Na distribuição dos casos, 17 fizeram parte do grupo tuberculóide e 16 do grupo virchowiano. Para a investigação dos marcadores, CD68, CD163, Arginase 1, iNOS, STAT3, FGF b, TGF- β e das citocinas, IL-10, IL-13, IL-22 em lesões de pele, o método imunistoquímico foi utilizado. De acordo com os dados obtidos, os resultados mostraram diferença estatística significativa dentre os grupos estudados sendo que a expressão de CD68, CD163, enzimas, fatores de crescimento, STAT3 e de citocinas foram maiores na forma virchowiana quando comparadas a tuberculóide. Nas análises de correlação, foi observado a existência de sinergismo de resposta entre as citocinas anti-inflamatórias, fatores de crescimento, CD163 e arginase 1 na forma virchowiana da doença. No contexto da resposta da iNOS, no pólo suscetível da doença, o estudo sinaliza para uma nova abordagem envolvendo o comportamento da iNOS, STAT3 e IL-22 sendo que nesta nova relação, na doença de hansen, foi observada a correlação positiva estatisticamente significativa entre os marcadores na forma virchowiana. Dessa forma, o presente estudo conclui que os marcadores que compõe a resposta dos macrófagos M1 e M2, surgem como alternativa para o maior entendimento da resposta imunológica inata, nas formas polares da doença reforçando o papel das citocinas, enzimas e receptores na resposta microbida, de reparo e de supressão na forma virchowiana da doença.

Palavras-chave: Hanseníase. Polarização. Macrófagos M1 e M2. *M. leprae*.

ABSTRACT

Leprosy is a disease that causes changes in the tissue and in the course of the immune response. Macrophages are one of the main cells which participating in the response against *M. leprae*. These cells undergo a differentiation process, modifying their behavior and polarizing the response between the classical pathway, composed of M1 macrophages that produce pro-inflammatory mediators and the alternative pathway known as restorative pathway having as representative M2 macrophages and their subtypes that produce anti-inflammatory cytokines. In Hansen's disease, there are few studies that discuss the ways of polarization in the spectrum of the disease. In order to understand the behavior of the cell in the polar form soft he disease, this study investigated the ways of macrophage response polarization and its possible implications for Hansen's disease. We used 33 blocks with skin fragments of patients with confirmed diagnosis for the disease according to the Ridley and Jopling criteria. The distribution of cases: 17 were tuberculoid and 16 lepromatous. The immunohistochemical method was used for the investigation of the markers CD68, CD163, arginase 1, iNOS, STAT3, FGF b, TGF- β and cytokines, IL-10, IL-13, IL-22 in skin lesions. The results showed a statistically significant difference among the groups and the expression of CD68, CD163, enzymes, growth factors, cytokines and STAT3 were higher in lepromatous forms when compared tuberculoid form. In the correlation analysis, it was observed the synergism between the response of anti-inflammatory cytokines, growth factors, arginase 1 and CD163 in lepromatous form. In the context of iNOS response in susceptible pole of the disease, the study points to a new approach involving iNOS, STAT3 and IL-22 behavior and this new relationship in Hansen's disease, a statistically significant positive correlation was observed between the markers in the lepromatous form. This study concludes: the markers that compose the response of M1 and M2 macrophages are an alternative for a better understanding of innate immune response, in polar forms of the disease increasing the role of cytokines, enzymes, and receptors in the microbicidal response, repair and suppression in the lepromatous form of the disease.

keywords: Leprosy. Polarization. Macrophage M1 e M2. *M. leprae*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ap1: Proteína Ativadora 1

BAAR: Bacilo Álcool Ácido Resistente

BB: *Boderline Boderline*

BT: *Boderline* Tuberculóide

BV: *Boderline* Virchowiana

BSA: Soro Albumina Bovina

CD: Células Dendríticas

C1q: Complemento 1q

C3a: Complemento 3a

C3b: Complemento 3b

C5a: Complemento 5a

C5b: Complemento 5b

C9: Complemento 9

CBL b: Ubiquitina E3 Proteína Ligase

CCL17: Ligante 17 de Quimiocina CC

CCL18: Ligante 18 de Quimiocina CC

CCL 20: Ligante 20 de Quimiocina CC

CCR7: Receptor de Quimiocina 7

CD1a: *Cluster of Diferenciation 1a*

CD14: *Cluster of Diferenciation 14*

CD163: *Cluster of Diferenciation 163*

CD206: *Cluster of Diferenciation 206*

CD209: *Cluster of Diferenciation 209*

CD68: *Cluster of Diferenciation 68*

Chi3l3: Quitinase 3 do tipo 3

Ciita: Transativador de MHC Classe 2

CHOP: *Homologous Protein*

CSF: Fator Estimulador de Colônia

CSF2R α : Receptor alfa para o Fator Estimulador de Colônia 2

CTLA 4: Antígeno 4 Associado ao Linfócito T Citotóxico

CXCL: Ligante de Quimiocina CXC

CXCL10: Ligante 10 de Quimiocina CXC

CXCL11: Ligante 11 de Quimiocina CXC
CXCL4: Ligante 4 de Quimiocina CXC
ENH: Eritrema Nodoso Hansênico
EPI: Equipamento de Proteção Individual
FasL: Ligante de Fas
Fc: Fragmento cristalino
FGF: Fator de crescimento de Fibroblastos
FGF b: Fator de crescimento de Fibroblastos básico
FoxP3: *Forkhead Box P3*
FXIIIa: Fator de Coagulação Transglutaminase
GADD153: *DNA Damage Inducible Transcript 3*
GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano de classe II para o alelo DR
HO-1: Heme Oxigenase 1
ICAM3: Molécula de Adesão Intracelular 3
IDO: Indolamina 2,3-dioxigenase
IFN γ R: Receptor de Interferon Gama
IFN- β : Interferon beta
IFN- γ : Interferon Gama
IFN- α : Interferon alfa
IL-12b: Interleucina 12b
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-4: Interleucina 4
IL-4R α : Receptor alfa para Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-13: Interleucina 13
IL-17: Interleucina 17
IL-18: Interleucina 18
IL-22: Interleucina 22
iNOS: Óxido Nítrico Sintetase induzida
IRF5: Fator regulador de interferon 5

JAKs: *Janus Kinases*

JAK1: *Janus Kinase 1*

JAK2: *Janus Kinase 2*

LAM: Lipoarabinomanana

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LIR: Receptores de Leucócitos do tipo Imunoglobulina

LPS: Lipopolissacarídeo

M0: Macrófago *Naive*

M1: Macrófago 1

M2: Macrófago 2

M2a: Macrófago 2a

M2b: Macrófago 2b

M2c: Macrófago 2c

M2d: Macrófago 2d

M3: Macrófago 3

M4: Macrófago 4

M17: Macrófago M17

Mox: Macrófagos oxidativos

Mreg: Macrófagos Reguladores

Mha: Macrófagos associados a hemorragia

MAPKKK: Proteína Quinase Quinase Quinase ativada por Mitógeno

MHCII: Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe 2

MMP7: Metaloproteinase 7

MMP12: Metaloproteinase 12

NADP: Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

NALP1: Receptor semelhante ao NOD1

NALP3: Receptor semelhante ao NOD3

NF-κB: Fator Nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico

NMT: Núcleo de Medicina Tropical

NOS2: Óxido Nítrico Sintetase 2

OMS: Organização Mundial de Saúde

Ox-PL-PPC: *ox-PL 1-palmitoyl-2 arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine*

PAMPs: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PBS: Tampão Fosfato Salino
PGL-1: Glicolípido Fenólico 1
PDIM: Tiocérol Dimicoserosato
PIM: Fosfatidilinositol
PI3K: Fosfoinositideo quinase 3
PPAR γ : Receptor gama Ativado por Proliferador de Peroxissomos
PRR: Receptor de Reconhecimento Padrão
RABs: *GTP-binding proteins*
ROR γ t: *Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t*
Rtnla: Resistina do tipo α
S100A8: Proteína de ligação ao cálcio A8
SD-1: Sufiredoxina-1
sNARES: *soluble NSF Attachment Receptor*
SOCS 3: *Suppressor of Cytokine Signaling 3*
STAT1: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1
STAT2: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 2
STAT 3: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
STAT 5: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5
STAT6: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 6
UNICAMP, SP: Universidade de Campinas, São Paulo
TCLE: Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TGF- β : Fator de Crescimento transformador beta
Th0: Linfócito T auxiliar *naïve*
Th1: Linfócitos T auxiliar 1
Th2: Linfócitos T auxiliar 2
Th3: Linfócitos T auxiliar 3
Th17: Linfócito T auxiliar 17
Th22: Linfócitos T auxiliar 22
Treg: Linfócitos T regulador
TLR: Receptor *Toll Like*
TLR2: Receptor *Toll Like 2*
TLR4: Receptor *Toll Like 4*
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa
TT: Tuberculóide

UFPA: Universidade Federal do Pará

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VV: Virchowiana Virchowiana

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i>	25
Figura 2: Manifestações clínicas na forma tuberculóide.....	28
Figura 3: Histopatologia da forma tuberculóide	28
Figura 4: Manifestações clínicas na forma virchowiana	30
Figura 5: Histopatologia da forma virchowiana.....	30
Figura 6: Hanseníase dimorfa	32
Figura 7: Histopatologia da forma dimorfa	32
Figura 8: Reação tipo 1	34
Figura 9: Histopatologia para a reação tipo 1	34
Figura 10: Manifestações clínicas do eritema nodoso hansênico	36
Figura 11: Histopatologia do eritema nodoso hansênico.....	36
Figura 12: Representação da resposta imunológica da hanseníase.....	39
Figura 13: Esquema geral da disposição dos marcadores que representam a polarização dos macrófagos.....	43
Figura 14: Representação do método imunoistoquímico.	54
Figura 15: Análise Quantitativa do CD68 (A) e CD163 (B) nas polares da hanseníase.....	57
Figura 16: Imunoistoquímica positiva para o CD68 (A e B) e CD163 (C e D) nas formas polares da hanseníase.	57
Figura 17: Análise Quantitativa para iNOS (A) e Arginase 1 (B) nas polares da hanseníase.....	58
Figura 18: Imunoistoquímica positiva para Arginase 1 (A e B) e iNOS (C e D) nas formas polares da hanseníase.	58
Figura 19: Análise Quantitativa para TGF- β (A) e FGF b (B) nas polares da hanseníase.....	59
Figura 20: Imunoistoquímica positiva para o TGF- β (A e B) e FGF b (C e D) nas formas polares da hanseníase.	59
Figura 21: Análise Quantitativa para IL-22 (A) e STAT3 (B) nas polares da hanseníase.....	60
Figura 22: Imunoistoquímica positiva para IL-22 (A e B) e STAT3 (C e D) nas formas polares da hanseníase.	60
Figura 23: Análise Quantitativa para IL-10 (A) e IL-13 (B) nas polares da hanseníase.....	61

Figura 24: Imunoistoquímica positiva para o IL-10 (A e B) e IL-13 (C e D) nas formas polares da hanseníase.	61
Figura 25: Correlação linear entre o CD163, Arginase 1 e as citocinas anti-inflamatórias na forma VV da doença.	63
Figura 26: Correlação linear entre CD68, IL-22, STAT3 e iNOS na forma VV da doença.	64
Figura 27: Esquema de construção da resposta dos macrófagos M1 e M2 e possíveis implicações na resposta imunopatológica da doença de hansen.....	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 Epidemiologia	24
2.2 Micro-organismo	24
2.3 Classificação das formas clínicas da hanseníase	26
2.3.1 Classificação de Madri	26
2.3.2 Classificação de Ridley e Jopling.....	26
2.3.3 Classificação operacional da OMS.....	26
2.4 Descrição dos aspectos clínicos e histopatológicos das formas clínicas da hanseníase	27
2.4.1 Hanseníase Tuberculóide.....	27
2.4.2 Hanseníase Virchowiana.....	29
2.4.3 Hanseníase Dimorfa.....	31
2.5 Reações Hansênicas	33
• Reação Reversa	33
• Reação Tipo Eritema Nodoso	35
2.6 Aspectos imunológicos da hanseníase	37
2.7 Macrófagos	41
2.7.1 Subpopulações de Macrófagos	42
2.7.2 Polarização da Resposta dos Macrófagos	45
2.7.3 Resposta Imunológica dos Macrófagos.....	46
2.7.4 Sinal de Transdução e os Caminhos da Polarização dos Macrófagos M1 e M2.....	47
2.7.5 Mecanismos de Escape Imunológico de Patógenos Intracelulares.....	48
2.7.6 Resposta dos Macrófagos na Hanseníase.....	50
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 METODOLOGIA	52
4.1 Delineamento do estudo	52
4.2 Seleção da amostra	52
4.3 Critérios de inclusão	52
4.4 Critérios de exclusão	52

4.5 Biópsias de pele	53
4.6 Imunoistoquímica	53
4.7 Análise das lâminas	55
4.8 Análise estatística	55
4.9 Aspectos éticos	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Quantificação da expressão dos marcadores envolvidos na polarização de resposta dos macrófagos M1 e M2 na doença de hansen	56
5.1.1 Imunomarcção para o CD68 e o CD163 nas formas polares da hanseníase.	56
5.1.2 Imunomarcção para iNOS e Arginase 1 nas formas polares da hanseníase .	58
5.1.3 Imunomarcção para o TGF- β e FGF b nas formas polares da hanseníase ...	59
5.1.4 Imunomarcção para IL-22 e STAT3 nas formas polares da hanseníase.....	60
5.1.5 Imunomarcção para IL-10 e IL-13 nas formas polares da hanseníase	61
5.2 Correlação linear entre os receptores, enzimas, fator de transcrição e citocinas nas formas polares da doença de hansen	62
5.2.1 Correlação linear entre o CD163, Arginase 1 e as citocinas anti-inflamatórias na forma VV da doença.....	63
5.2.2 Correlação linear entre CD68, IL-22, STAT3 e iNOS na forma VV da doença.	64
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	92
APÊNDICE A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	93
APÊNDICE B PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS	94
ANEXOS	95
ANEXO I PARECER E APROVAÇÃO DO PROJETO	96
ANEXO II PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA	98
ANEXO III ARTIGO ACEITO E PUBLICADO	100

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica de origem infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular obrigatório que infecta macrófagos, células dendríticas (CD), de schwann e provoca lesões teciduais e desmielinizantes nos nervos periféricos (GONÇALVES, 2013; WHEAT et al., 2014). É considerada uma doença granulomatosa com amplo espectro clínico (ADAMS; KRAHENBUHL, 1996). Em países em desenvolvimento, a enfermidade apresenta-se como grave problema de saúde pública (GONÇALVES, 2013; LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Clinicamente, a doença apresenta características histopatológicas diversas, onde na forma tuberculóide (TT), a resposta mediada por células é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório com a formação de granuloma, bem como de células gigantes. Na forma virchowiana (VV), a resposta induzida pelo organismo perante a presença do bacilo, parte desde a formação de células espumosas com vacúolo até a dispersão difusa linfocitária (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI et al., 2015; MANSONNE et al., 2015).

No que tange a resposta imunológica, a doença provoca intensa instabilidade no sistema de defesa do hospedeiro que transita nos espectros da doença. Na forma TT, o indivíduo apresenta predominantemente uma resposta celular mediada por linfócitos T auxiliares 1 (Th1) com produção de citocinas que estimulam a resposta inflamatória. Na forma VV a resposta é caracterizada predominantemente pelos linfócitos T auxiliares 2 (Th2) que estimulam a resposta anti-inflamatória. Nas formas transitórias, a resposta celular oscila entre as formas *Boderline Boderline* (BB), *Boderline Tuberculóide* (BT) e *Boderline Virchowiana* (BV) (RIDLEY; JOPLING, 1966; OLIVEIRA et al., 2014; AARÃO et al., 2014).

Na literatura, estudos têm demonstrado que de acordo com a evolução ou cronicidade de doenças consideradas espectrais, determinados grupos celulares sofrem alterações no perfil de resposta, polarizando entre pro ou anti-inflamatória. Neste contexto, os macrófagos fazem parte de um grupo de células que quando sofrem modificação fenotípica, expressam receptores, moléculas coestimulatórias e citocinas que induzem o desenvolvimento da resposta supressora ou pró-inflamatória (OUEDRAOGO et al., 2012; KA et al., 2014; SICA et al., 2015).

Em estudos que relacionaram a resposta dos macrófagos M1, contra o *Mycobacterium tuberculosis*, observou-se que no momento do reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) pelos receptores *Toll*, a célula passa a produzir grandes quantidades de ligante 10 e 11 de quimiocina CXC (CXCL10 e CXCL11), receptor de quimiocina 7 (CCR7) e de citocinas inflamatórias que irão influenciar diretamente no papel microbicida do macrófago (MANTOVANI et al., 2004; MURRAY et al., 2014; HUANG et al., 2015).

Na hanseníase, nos estudos que levaram em consideração a resposta da via alternativa mediada pelos macrófagos M2, foi demonstrado que na forma virchowiana da doença, a célula expressa em maior quantidade CD163, CD209, antígeno leucocitário humano para o alelo DR (HLA-DR), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) e interleucina 10 (IL-10) (MOURA et al., 2012; BABOSHA et al., 2014).

Em resposta tecidual envolvendo a presença dos macrófagos M2, há evidências de que as células estimulem a produção de enzimas como as arginases que levam a produção de fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) que participam da resposta de apoptose, do processo de cicatrização regulando a produção de matriz extracelular, proliferação de células endoteliais e formação do processo de angiogênese em lesões teciduais (OLIVEIRA et al., 2014; DZIK, 2014; WINJNANDS et al., 2015; BABAY et al., 2015).

Dessa forma, por entender que a resposta de fatores de crescimento e de citocinas associadas a enzimas e moléculas coestimulatórias possam trazer novas abordagens nos caminhos da polarização de resposta dos macrófagos no espectro da doença, nós investigamos a resposta destas células no intuito de compreender suas possíveis implicações na imunopatogênese na doença de hansen.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia

A hanseníase ainda é considerada um grave problema de saúde pública. No mundo, os estudos epidemiológicos têm demonstrado uma tendência de queda do número de casos por habitante. No entanto, no continente Africano, Asiático e Americano tem se observado que a doença ainda se mostra com altas taxas de detecção de novos casos (ASSEMBLY, 2014; TURNER, 2015; WOBUDEYA et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de casos novos de hanseníase no ano de 2014 foi de 213.899 em 121 países. Quando comparado com o ano anterior, houve uma ligeira redução no número de casos. A taxa de detecção de casos novos é de 3.78/100 mil habitantes (EXPERT, 2015).

No Brasil, mesmo com a implantação do plano integrado de ações estratégicas para a eliminação da hanseníase, o que tem se observado é que o número de novos casos por habitantes vem aumentando (BRASIL, 2013). Em 2014, foram diagnosticados 31.064 casos novos de hanseníase, sendo este o segundo país com maior número de casos, ficando atrás somente da Índia (EXPERT, 2015). Nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, a doença ainda apresenta um alto coeficiente de surgimento de novos casos (BRASIL, 2013; EXPERT, 2015).

2.2 Micro-organismo

O *M. leprae*, também conhecido como bacilo de Hansen, foi descoberto por Gerhard Armauer Hansen em 1873. Trata-se de um bacilo de crescimento lento que pode ser visto nos cortes histológicos isoladamente ou agrupados formando globias (HASTINGS; OPROMOLLA, 1994; OPROMOLLA, 2000; SCOLLARD et al., 2006).

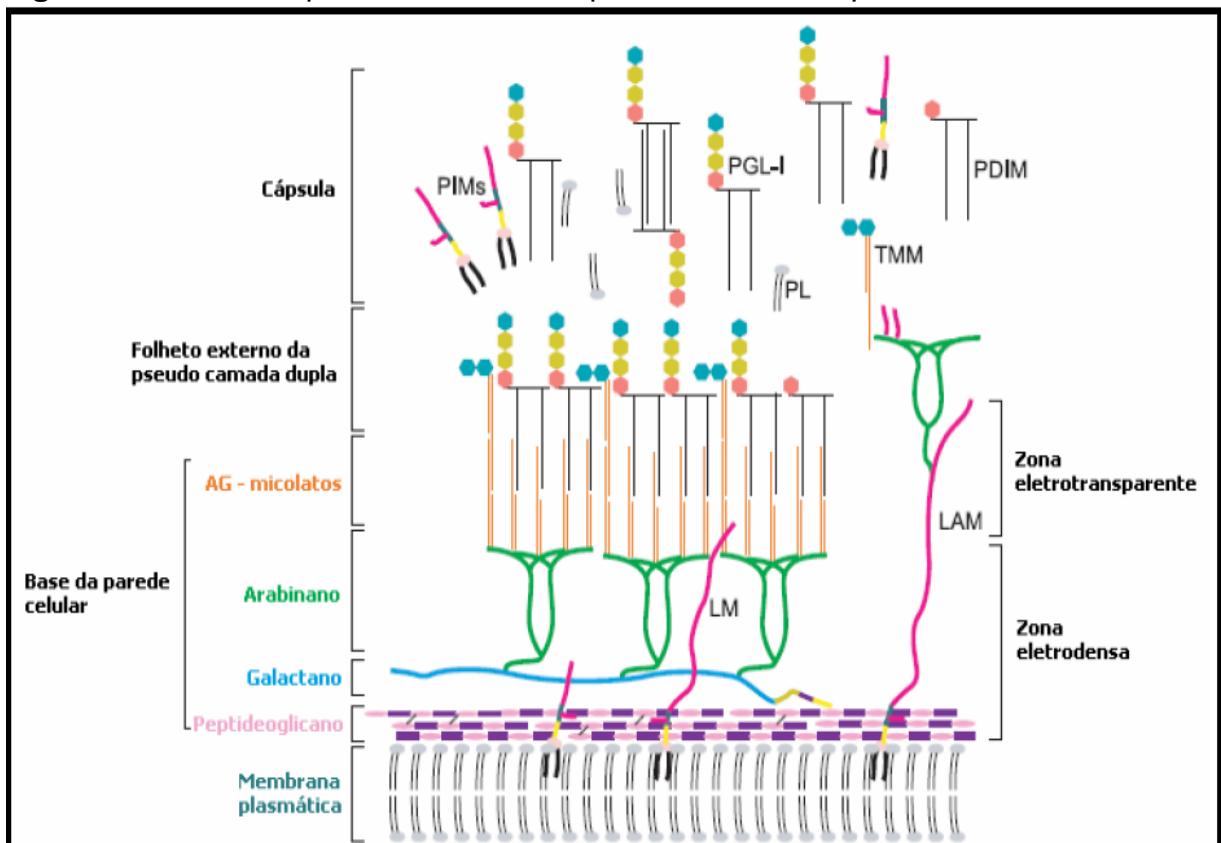
Morfologicamente, a estrutura do bacilo apresenta na base da parede celular uma grande quantidade de açúcares e ácidos micólicos, que servem de suporte para formar o folheto externo da pseudo cápsula (SCOLLARD et al., 2006).

Na superfície, a cápsula do bacilo é composta em grande parte por tiocerol dimicoserosato (PDIM), fosfatidilinositol (PIM) e pelo glicolípido fenólico 1 (PGL-1) que ganha destaque pela função que exerce quando a bactéria é fagocitada (SCOLLARD et al., 2006) (Figura 1).

No mecanismo de escape desenvolvido pelo *M. leprae*, o PGL-1 pode reagir com compostos de radicais livres sugerindo que este lipídeo capsular possa proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a infecção (MADEIRA, 2000; BUHRER, et al., 2001; BUHRER, et al., 2003).

Na literatura, já foi demonstrado que a presença de outros componentes lipídicos como o Lipoarabinomanana (LAM), pode modular a atividade bactericida dos macrófagos bem como a infiltração do bacilo no tronco nervoso (SCOLLARD et al., 2006; BAHIA et al., 2015).

Figura 1: Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae*.



Fonte: Adaptado de Scollard et al., 2006.

2.3 Classificação das formas clínicas da hanseníase

2.3.1 Classificação de Madri

A Classificação de Madri foi apresentada no Congresso Internacional de Hansenologia em Madri no ano de 1953 e categoriza as manifestações clínicas da doença em quatro formas clínicas: indeterminada (I), conhecida como forma clínica transitória e inicial; tuberculóide (T) e virchowiana (V), consideradas formas polares; e dimorfa (D) ou *boderline*, forma instável e intermediária da doença (BRASIL, 1960; SOUZA, 1997; BRASIL, 2010).

Essa classificação adota critérios clínicos, como os aspectos das lesões; bacteriológicos, com a presença ou ausência do bacilo; imunológicos, de acordo com a imunorreatividade a lepromina; e histopatológicos, conforme laudo histopatológico da lesão (BRASIL, 1960; SOUZA, 1997; BRASIL, 2010).

2.3.2 Classificação de Ridley e Jopling

A classificação de Ridley e Jopling proposta em 1966 baseia-se no critério histopatológico associado às alterações imunológicas e constitui-se de cinco formas clínicas. No pólo de resistência encontra-se a forma TT, caracterizada por uma intensa imunidade celular, poucos bacilos e um número limitado de lesões. No pólo de suscetibilidade têm-se a forma VV (também conhecida como lepromatosa), com intensa imunidade humoral, proliferação bacilar e lesões de pele mais difusas. As formas intermediárias denominadas BT, BB e BV são imunologicamente dinâmicas, apresentando características oscilantes entre os dois pólos da doença (RIDLEY; JOPLING, 1966).

2.3.3 Classificação operacional da OMS

A Organização Mundial da Saúde, em 1989, partindo do pressuposto que a imunidade protetora é inversa ao número de lesões ou áreas do corpo afetadas nos indivíduos com hanseníase, adotou o critério do número de lesões para facilitar o

manejo dos protocolos terapêuticos. Pacientes com até cinco lesões na pele são considerados paucibacilares, enquanto que os que apresentam um número maior que cinco lesões são tidos como multibacilares. Pacientes que apresentam resultados da baciloscopia positiva são classificados como multibacilares, independentemente do número de lesões (OMS, 1998).

2.4 Descrição dos aspectos clínicos e histopatológicos das formas clínicas da hanseníase

2.4.1 Hanseníase Tuberculóide

No pólo de resistência, a hanseníase tuberculóide caracteriza a forma clínica de contenção da multiplicação bacilar dentro do espectro da doença. As lesões cutâneas, com bordas pronunciadas, são únicas ou em pequeno número, e assimetricamente distribuídas pelo tegumento. Apresenta-se, quando mácula, como lesão hipocrômica ou eritematosa, delimitada por micropápulas e, quando placa, como lesão eritematosa ou acobreada, difusamente infiltrada, ou com tendência central e limites externos bem definidos (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2012; LASTÓRIA; ABREU, 2014) (Figura 2).

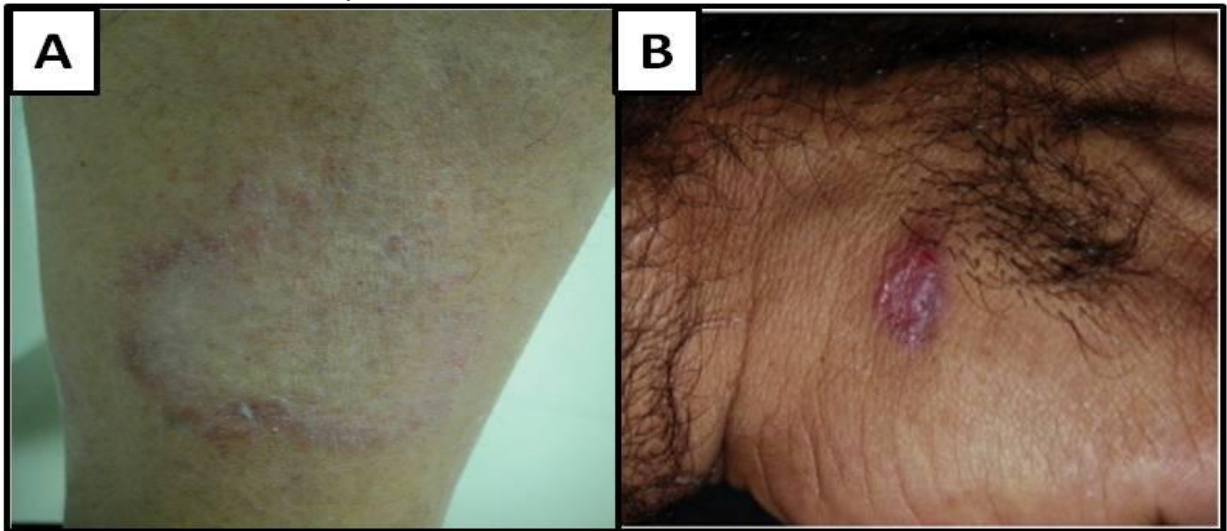
Em geral, as lesões não ultrapassam 10 cm de diâmetro, e os danos em ramos neurais se acentuam rapidamente, resultando em alterações tanto sensoriais quanto autonômicas, que evoluem para hipoestesia, em pele de superfície seca, hipodrótica. Além da pele, o envolvimento de troncos nervosos ocorre em pequeno número, usualmente próximo às lesões cutâneas (SOUZA, 1997).

Os nervos preferencialmente acometidos são o cubital, mediano, radial, fibular, tibial posterior, auricular e supraorbitário. Neste grupo clínico, podemos encontrar o comprometimento neural, sem lesões cutâneas, denominando-se hanseníase tuberculóide neural pura. Na reação de Mitsuda, observa-se uma reação fortemente positiva, maior que 5 mm, atingido até 8 a 15 mm de diâmetro, frequentemente com ulceração central (SOUZA, 1997; TALHARI et al., 2015).

A baciloscopia, via de regra, é negativa e na histopatologia, nas lesões, observa-se infiltração de células epitelióides, gigantócitos circundados por linfócitos na periferia, constituindo granuloma bem definido, que invade a derme e por vezes a

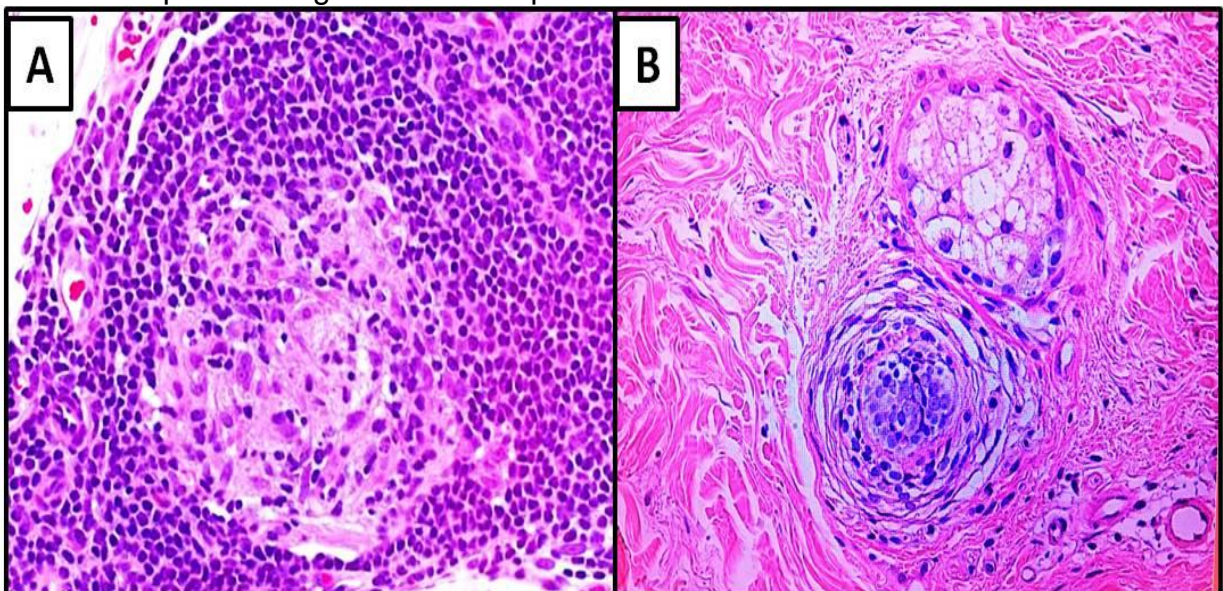
epiderme. Nas lesões, em alguns casos é observado o comprometimento de filetes nervosos e anexos cutâneos como glândulas sudoríparas e aparelho pilossebáceo (SOUZA, 1997; MASSONE et al., 2015; EICHELMANN et al., 2015) (Figura 3).

Figura 2: Manifestações clínicas na forma tuberculóide. A: lesão anular na perna. B: Lesão única que mostra bordas bem definidas e elevadas na mão.



Fonte: Lastória; Abreu, 2012; Talhari et al., 2015.

Figura 3: Histopatologia da forma tuberculóide. A: Granuloma composto por células epitelióides circundado por linfócitos. B: Granuloma linfocitário formado próximo a glândula sudorípara.



Fonte: Lastória; Abreu, 2014; Própria do autor.

2.4.2 Hanseníase Virchowiana

No pólo anérgico da doença, a hanseníase virchowiana expressa a forma clínica de susceptibilidade ao bacilo, resultando em multiplicação e disseminação da doença. De início insidioso e progressão lenta, esta forma clínica avança através dos anos, envolvendo difusamente extensas áreas do tegumento, múltiplos troncos nervosos e, inclusive outros órgãos, até que o paciente perceba seus sintomas. Inicia-se com máculas mal definidas, discretamente hipocrômicas ou eritematosas, pouco visíveis, ampla e simetricamente distribuídas sobre a superfície corpórea (SOUZA, 1997; VIRMOND et al., 2015) (Figura 4).

A progressão da doença resulta em acentuação do eritema e infiltração, com poros dilatados, tipo “casca de laranja”, e sobre estas áreas se sobrepõem pápulas, nódulos e tubérculos. Frequentemente comprometidos estão: a região frontal, centromedial da face e lóbulos da orelha, caracterizando a face leonina, além de extensas áreas do tegumento; usualmente, as regiões mais quentes, como axilas, linha média do dorso, períneo e virilhas são poupadas (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Nos membros há comprometimento das superfícies extensoras, particularmente antebraços, dorso das mãos e extremidades, tanto dos membros superiores, como dos inferiores, observando-se articulações e dígitos edemaciados. (SOUZA, 1997).

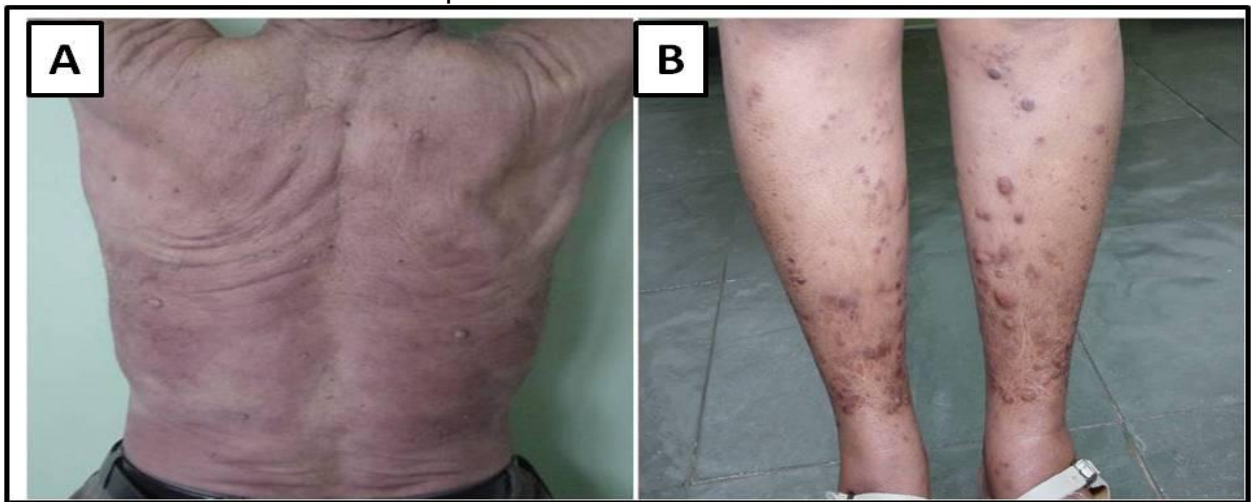
Com a evolução da doença, múltiplos troncos nervosos são comprometidos simetricamente, tornam-se de firmes a espessados, fibrosos e endurecidos e, progressivamente, sobrevêm a perda sensorial e a motora, conseqüentemente levando à perda da função, atrofia muscular, paralisias, deformidades e contraturas (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Nas alterações decorrentes da infiltração do bacilo, órgãos como olhos, rins, fígado, baço e testículos são atingidos. Em lesões tardias, o comprometimento ósseo é conseqüente de traumas por perda de sensibilidade, osteomielite recorrente, além da osteoporose (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2012).

Sobre a reação de Mitsuda, ela é negativa e, na histopatologia da pele, observa-se epiderme atrófica com aplainamento das suas cristas papilares, presença da faixa de Unna, separando a epiderme da zona do infiltrado dérmico. Este infiltrado inflamatório monótono e monomórfico se constitui, sobretudo de

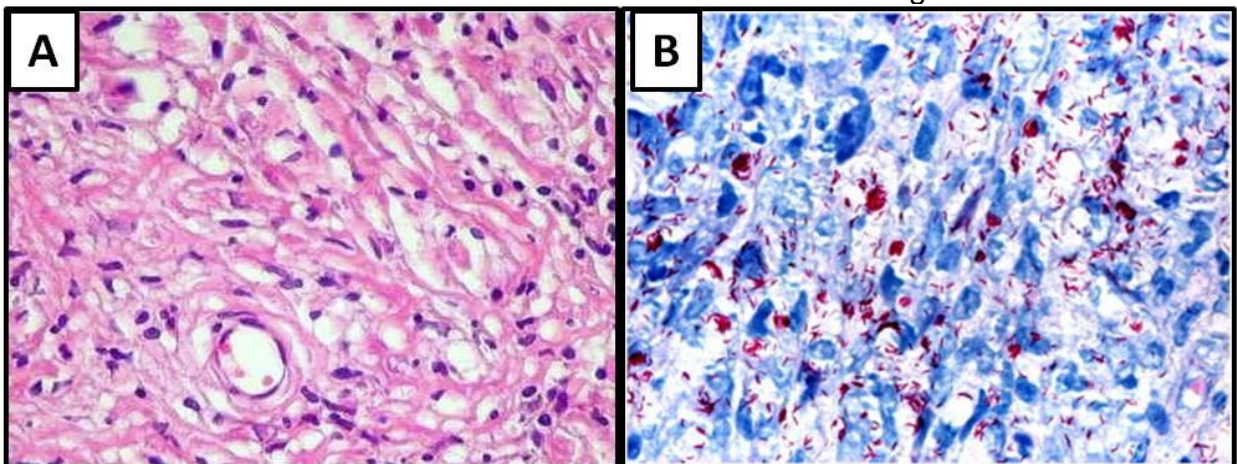
histiócitos em diversos graus de evolução, que resultam finalmente em células espumosas, volumosas e multivacuoladas, denominadas células de Virchow. Além da invasão da derme e tecido subcutâneo, o infiltrado envolve o plexo vasculonervoso, glândulas sudoríparas e aparelho pilossebáceo. Em muitos casos a pesquisa do bacilo mostra-o íntegro, aglomerando-se em globias, dentro do citoplasma de histiócitos, em filetes nervosos, paredes vasculares, etc. (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2014; MASSONE et al., 2015) (Figura 5).

Figura 4: Manifestações clínicas na forma virchowiana. A: Manchas eritemato-acastanhadas, mal delimitadas no dorso. B: Ressecamento da pele e hansenomas nas pernas.



Fonte: Lastória; Abreu, 2012.

Figura 5: Histopatologia da forma virchowiana. A: Presença de macrófagos espumosos com bacilos no seu interior. B: Numerosos bacilos, pesquisa para o bacilo álcool ácido resistente (BAAR) positiva e histopatologia mostrando o micobacterio na forma isolada ou em globias.



Fonte: A: Arquivo de patologia da UNICAMP, SP, 2015; Massone et al., 2015.

2.4.3 Hanseníase Dimorfa

Dentro do espectro da doença, a forma dimorfa é caracterizada pela instabilidade imunológica e caminha entre os pólos tuberculóide e virchowiano. Devido ao grande contingente de pacientes neste grupo, esta forma clínica representa destacada parte do espectro, sendo relevantes também a frequência e gravidade dos danos neurais, responsáveis por incapacidades e deformidades na hanseníase (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2012).

Na hanseníase *borderline* ou dimorfa, podemos observar aspectos clínicos dermatológicos que se aproximam do pólo virchowiano ou tuberculóide, até no mesmo paciente e esta aparência dimorfa reflete a instabilidade imunológica (SOUZA, 1997).

A evolução da doença e a ausência de tratamento podem conduzir alguns pacientes ao pólo virchowiano. Dentro da multiplicidade de aspectos das lesões cutâneas, observam-se a presença de máculas eritematosas, em pele clara, manchas hipocrômicas em pele escura que assumem por vezes tonalidade acobreada. Em muitos casos também é observada a presença de pápulas, tubérculos, nódulos e placas (SOUZA, 1997; LASTÓRIA et al., 2012; EICHELMANN et al., 2015).

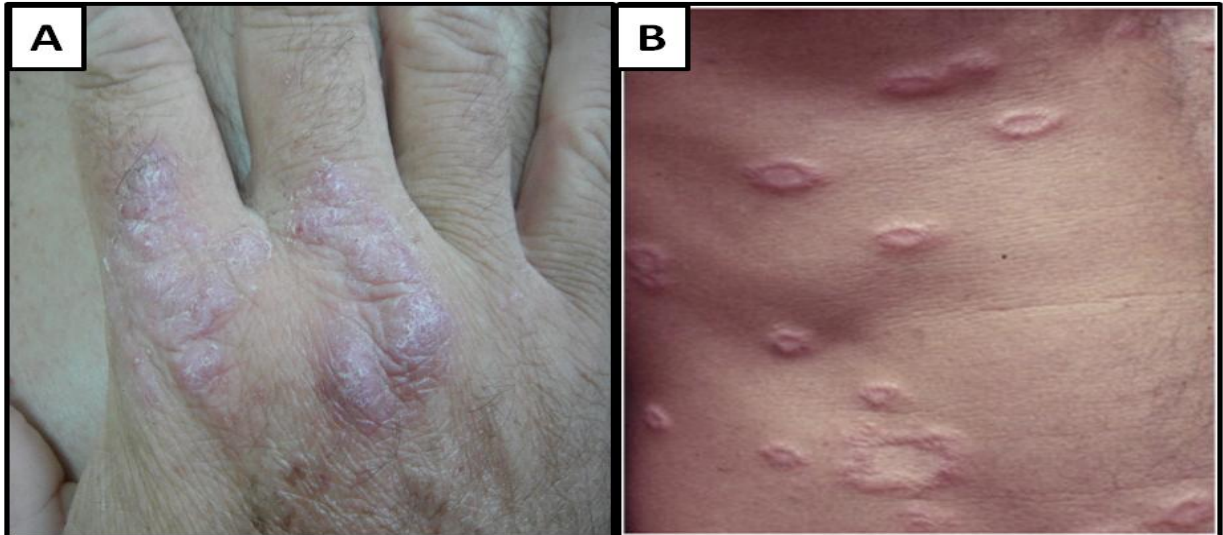
A proximidade ao pólo tuberculóide observam-se lesões mais delimitadas e de superfície seca. Por outro lado, à proximidade ao pólo virchowiano, observam-se lesões mais numerosas, brilhantes, com menor definição de limites, cuja perda de sensibilidade não é tão intensa (SOUZA, 1997; EICHELMANN et al., 2015).

No geral, classicamente, como representantes do grupo dimorfo ou *borderline*, as lesões apresentam-se com aspecto anular, circulares e ovais, ou foveolar. Neste contexto, as lesões anulares possuem anel eritematoacobreado, mais delimitado interna e externamente quando comparadas às foveolares, estas últimas denominadas também de lesões tipo “queijo suíço”, são representadas por placas eritematosas esmaecentes, cujos limites externos são mal definidos, (SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2012; EICHELMANN et al., 2015; TALHARI et al., 2015) (Figura 6).

Na histopatologia, as lesões são caracterizadas pela presença de granulomas imaturo com células epitelióides com formato irregular. Na forma dimorfa, as células gigantes não estão presentes e os linfócitos são difusamente distribuídos. No

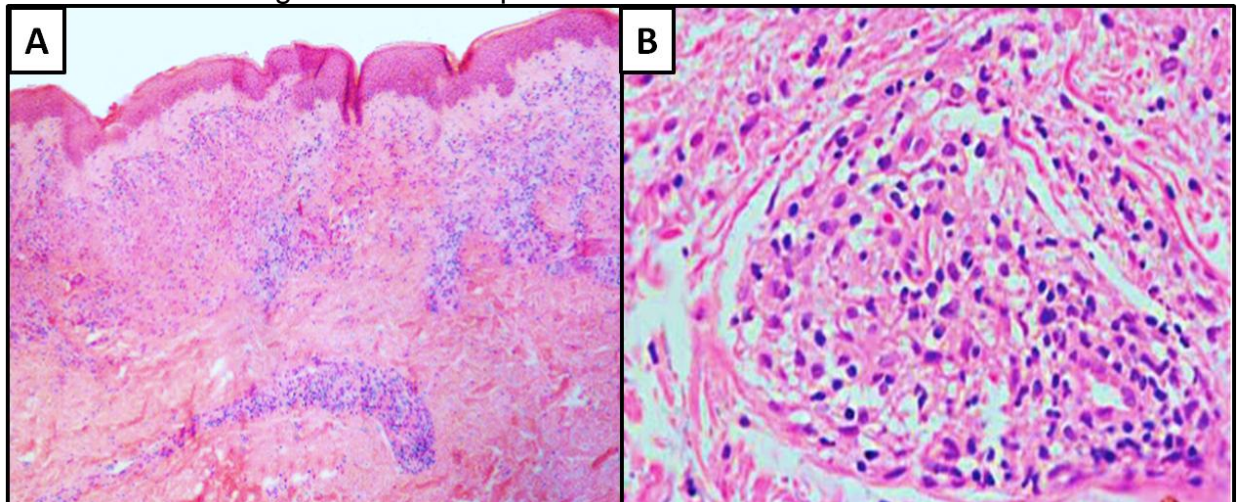
infiltrado, os macrófagos representam uma proporção relativamente significativa de células. Em muitos casos, a lesão apresenta edema e a epiderme é atrófica (OBADIA et al., 2011; LASTÓRIA; ABREU, 2014; MANSSONE et al., 2015) (Figura 7).

Figura 6: Hanseníase dimorfa A: Lesão com bordas externas esmaecentes e internas bem definidas no dorso da mão. B: Múltiplas lesões no tronco mostrando os contornos com aspecto de "queijo suíço".



Fonte: Lastória; Abreu, 2012; Talhari et al., 2015.

Figura 7: Histopatologia da forma dimorfa. A: Granulomas irregulares com alguns histiócitos espumosos. B: Granuloma com unidiferenciação de macrófagos circundado por linfócitos.



Fonte: Obadia et al., 2011; Lastória; Abreu, 2014.

2.5 Reações Hansênicas

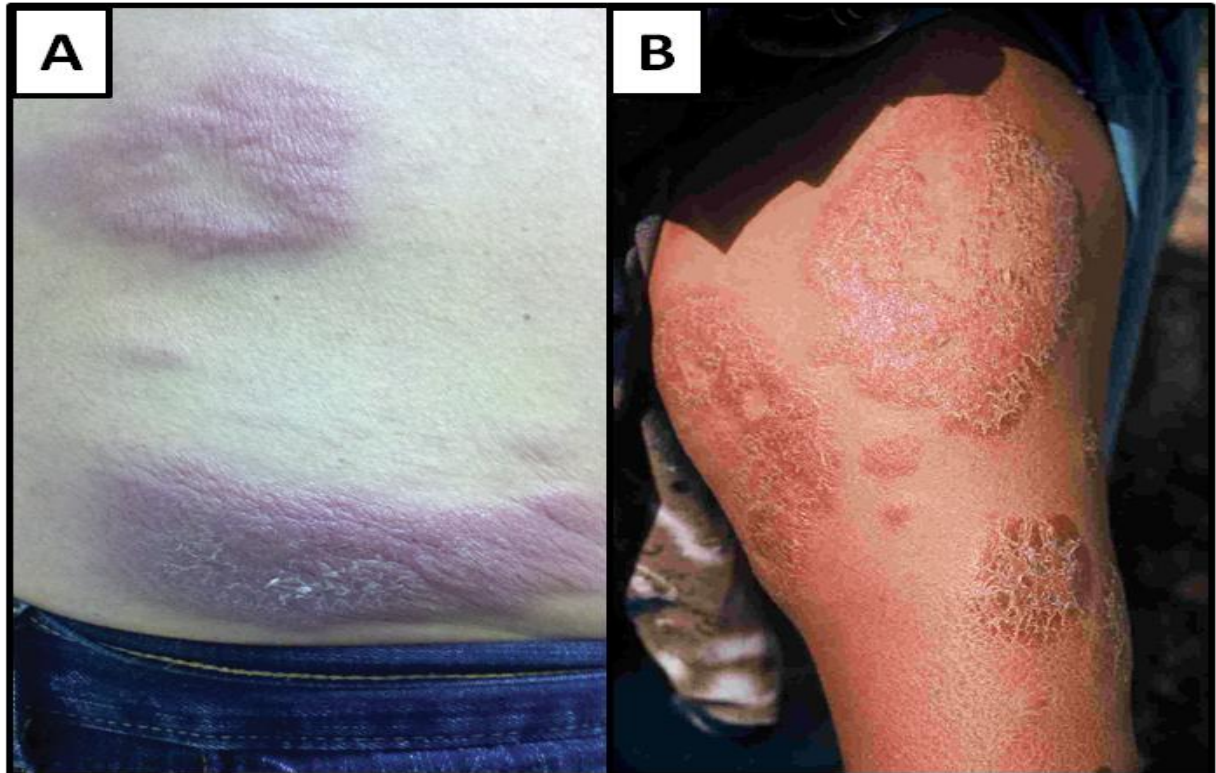
Concomitante ao curso natural da hanseníase, sobrepondo-se a uma evolução usualmente lenta e indolente e, relacionando-se ao espectro clínico, imunológico e histopatológico da doença, impõem-se os estados reacionais, produzidos por diferentes mecanismos imunológicos e responsáveis por uma série de danos teciduais. As reações hansênicas podem corresponder à exacerbação da imunidade celular, ou demonstrar efeitos de acentuada formação de imunocomplexos, que podem levar as reações hansênicas de tipo 1 ou tipo 2 (SOUZA, 1997; LASTORIA; ABREU, 2012).

- Reação Reversa

A reação hansênica tipo 1, ou reação reversa, está associada com o aumento da imunidade mediada por células, classicamente representada pela reação de hipersensibilidade do tipo IV. Comumente é observada em pacientes *borderline* após o início da terapêutica, é em geral mais precoce nos pacientes BT e BB do que nos BV. Na reação reversa as lesões preexistentes tornam-se eritematovioláceas, sensíveis, intumescidas, elevadas, e máculas tornam-se placas. Ocorre também elevação e melhor definição dos limites das lesões. Evoluem com descamação e, por vezes, sobrevêm com ulceração. Novas lesões tendem a surgir em áreas adjacentes, assemelhando-se às lesões preexistentes, e podem ser numerosas, pequenas e esparsas (Figura 8). Nos pacientes BV, edema acrofacial pode estar presente, assim como sintomas sistêmicos, como febre e mal-estar, que não são usuais (SOUSA, 1997; WALKER; LOCKWOOD, 2007; LASTÓRIA; ABREU, 2012; TALHARI et al., 2015).

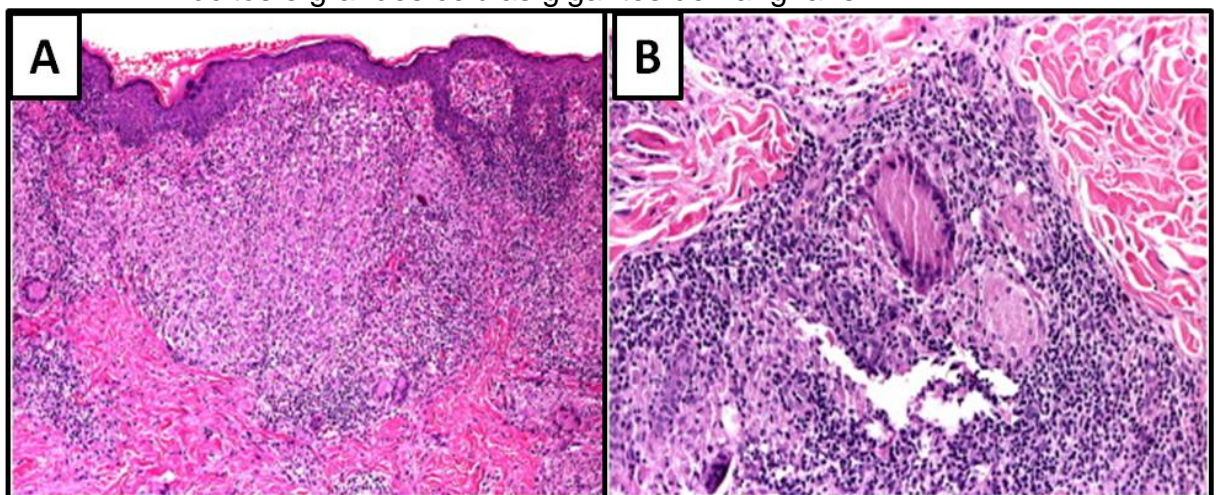
Os achados histopatológicos que caracterizam a reação tipo 1 são a presença de edema na derme superficial com granuloma desorganizado em meio ao aparecimento de células gigantes de corpo estranho (às vezes com vacúolos intracelulares devido ao edema). Em reações graves, a ruptura do granuloma e até mesmo necrose ou ulceração podem ocorrer (OBADIA et al., 2011; MASSONE et al., 2015) (Figura 9).

Figura 8: Reação tipo 1 mostrando em A e B placas eritemato-edematosas descamativas.



Fonte: Walker; Lockwood, 2007; Lastória; Abreu, 2012.

Figura 9: Histopatologia para a reação tipo 1 na forma *boderline* tuberculóide. Em A: presença de edema na derme papilar, com granuloma desorganizado em meio a células gigantes de Langhans. Em B: Presença de edema no granuloma com desorganização do infiltrado composto por muitos linfócitos e grandes células gigantes de Langhans.



Fonte: Manssone et al., 2015.

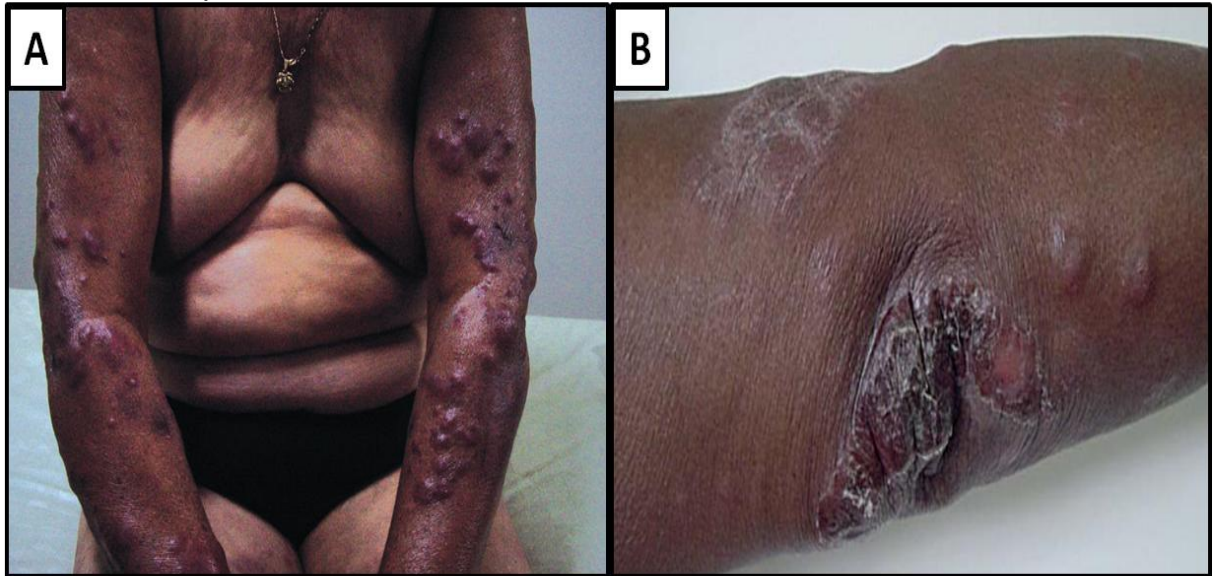
- Reação Tipo Eritema Nodoso

Por outro lado, a reação hansênica tipo 2, ou tipo eritema nodoso, relaciona-se à deposição de imunocomplexos semelhante à reação de hipersensibilidade do tipo III. O Eritema Nodoso Hansênico (ENH) presente neste tipo de reação, representa parte das manifestações de um comprometimento multisistêmico. A reação tipo 2 ocorre em pacientes multibacilares e reflete um processo inflamatório agudo, envolvendo qualquer órgão ou tecido em que o bacilo ou seus antígenos estejam presentes. Manifesta-se com várias complicações que podem levar a prostração, anorexia, febre, insônia e depressão. A face, mãos e pés tornam-se edemaciados, assim como o fígado, baço e gânglios podem ter seu volume aumentado (SOUZA, 1997; WALKER; LOCKWOOD, 2007; LASTÓRIA; ABREU, 2012).

No episódio de reação tipo eritema nodoso, quando há erupção cutânea, a pele aparentemente normal é acometida com surgimento súbito de pápulas, nódulos e placas, dolorosos e tensos ao toque, de coloração rósea a eritematoviolácea, com margens não definidas, que evoluem com descamação central, e podem tornar-se hemorrágicas e vesicobolhosas (Figura 10). O surgimento de lesões obedece a uma distribuição simétrica, bilateral, mais difusa, quando comparada ao eritema nodoso de outras etiologias, e frequentemente atinge face, tronco, áreas extensoras de membros, mas poupa couro cabeludo, virilhas e axilas (SOUZA, 1997; WALKER; LOCKWOOD, 2007; LASTÓRIA; ABREU, 2012; LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI et al., 2015).

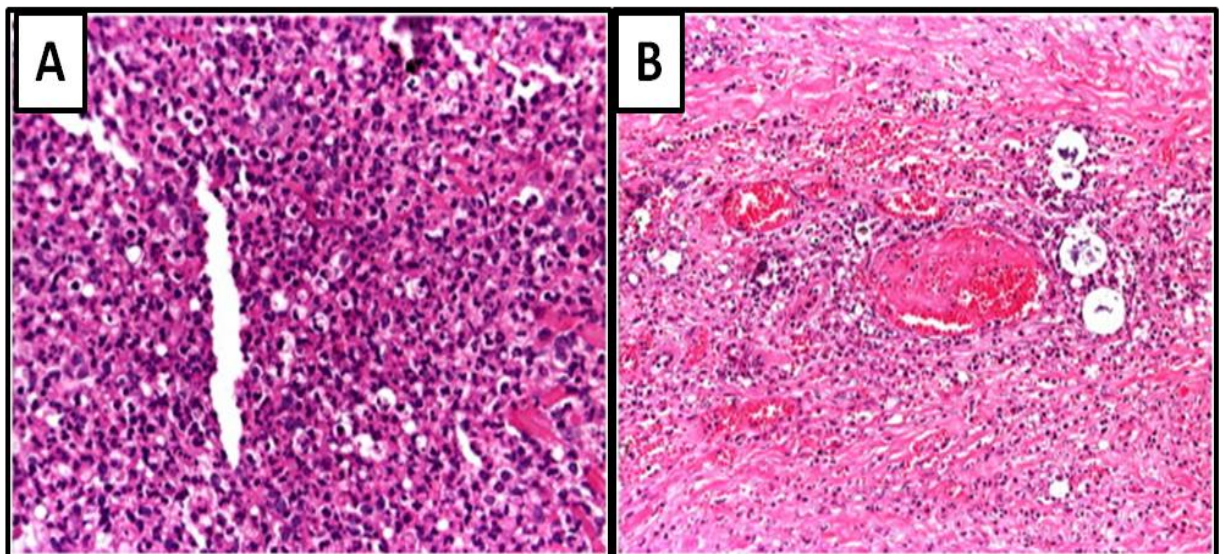
Na histopatologia, normalmente o infiltrado é centrado em pequenos granulomas no tecido subcutâneo com cachos de neutrófilos ao redor de macrófagos espumosos. Células como os eosinófilos, células plasmáticas, mastócitos também podem estar presentes (OBADIA et al., 2011; MASSONE et al., 2015) (Figura 11).

Figura 10: Manifestações clínicas do eritema nodoso hansênico mostrando em A e B nódulos inflamatórios com distribuição simétrica nos membros superiores.



Fonte: Lastória; Abreu, 2012; Lastória; Abreu, 2014.

Figura 11: Histopatologia do eritema nodoso hansênico mostrando em A um infiltrado neutrofílico juntamente com macrófagos espumosos. Já em B é mostrado um eritema nodoso hansênico necrosante com uma vasculite leucocitoclástica com neutrófilos em focos hemorrágicos com células Virchow.



Fonte: Manssone et al., 2015.

2.7 Aspectos imunológicos da hanseníase

A hanseníase tem suas manifestações clínicas dependentes da interação celular do sistema imunológico do hospedeiro com o *M. leprae*. Nessa doença de caráter espectral, a imunidade mediada por células assume um importante papel protetor contra a doença. Desse modo, a hanseníase tem contribuído com importantes modelos clínicos para a investigação de mecanismos da resposta imunológica em humanos (MODLIN, 2010; POLYCARPOU, 2013).

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão (PRR) que detectam os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Estes receptores de reconhecimento são expressos principalmente por células fagocíticas como os macrófagos e células dendríticas (MODLIN, 2010; SURYADEVARA et al., 2013).

Na literatura, os estudos demonstraram a versatilidade desses receptores e as cascatas de sinalização que podem desenvolver (BUELNA et al., 2013; HEDL; ABRAHAM, 2014). Na doença de hansen, muitas teorias tem se baseado no curso da resposta envolvendo a relação entre os receptores *Toll*, células dendríticas, macrófagos e linfócitos (MARQUES et al., 2013; PONTILLO et al., 2013; SURYADEVARA et al., 2013).

No estudo que envolveu o caminho de resposta das células dendríticas e dos macrófagos, foi demonstrado que os receptores *Toll like 2* (TLR2) ao reconhecerem os PAMPs, levariam a formação de mecanismos de sinalização intracelular para induzir a produção de interleucina 12 (IL-12). Em outro momento, a citocina produzida pelos macrófagos atuaria em resposta sinérgica com a interleucina 18 (IL-18) para estimular as células Th1 a aumentar a produção de interferon gama (IFN- γ) e de molécula de adesão intracelular 3 (ICAM3) na forma tuberculóide da doença (SANTOS et al., 2007).

Em outra abordagem que investigou a imunorreatividade das células dendríticas em lesões foveolares, foi demonstrado que as diferenças quantitativas encontradas para o CD1a e o FXIIIa na borda e no centro da lesão indicariam uma participação efetiva das células dendríticas na montagem da resposta celular contra o *M. leprae* (BOTELHO et al., 2013).

Na forma virchowiana, as alterações genéticas têm sido usadas para explicar o porquê da diminuição da atividade das células fagocíticas e a manutenção da resposta de supressão (ALCAÏS et al., 2005; DUPNIK et al. 2015).

Uma das teorias para justificar tal problema, demonstrou que há um gene presente na família dos receptores de leucócitos do tipo imunoglobulina (LIR) que poderia estar associado com a desregulação da resposta de células dendríticas, macrófagos e linfócitos. Neste contexto, as alterações comprometeriam a resposta da IL-12 e do óxido nítrico (NO) e aumentariam a da IL-10 (SANTOS et al., 2007; KUMAR et al., 2013).

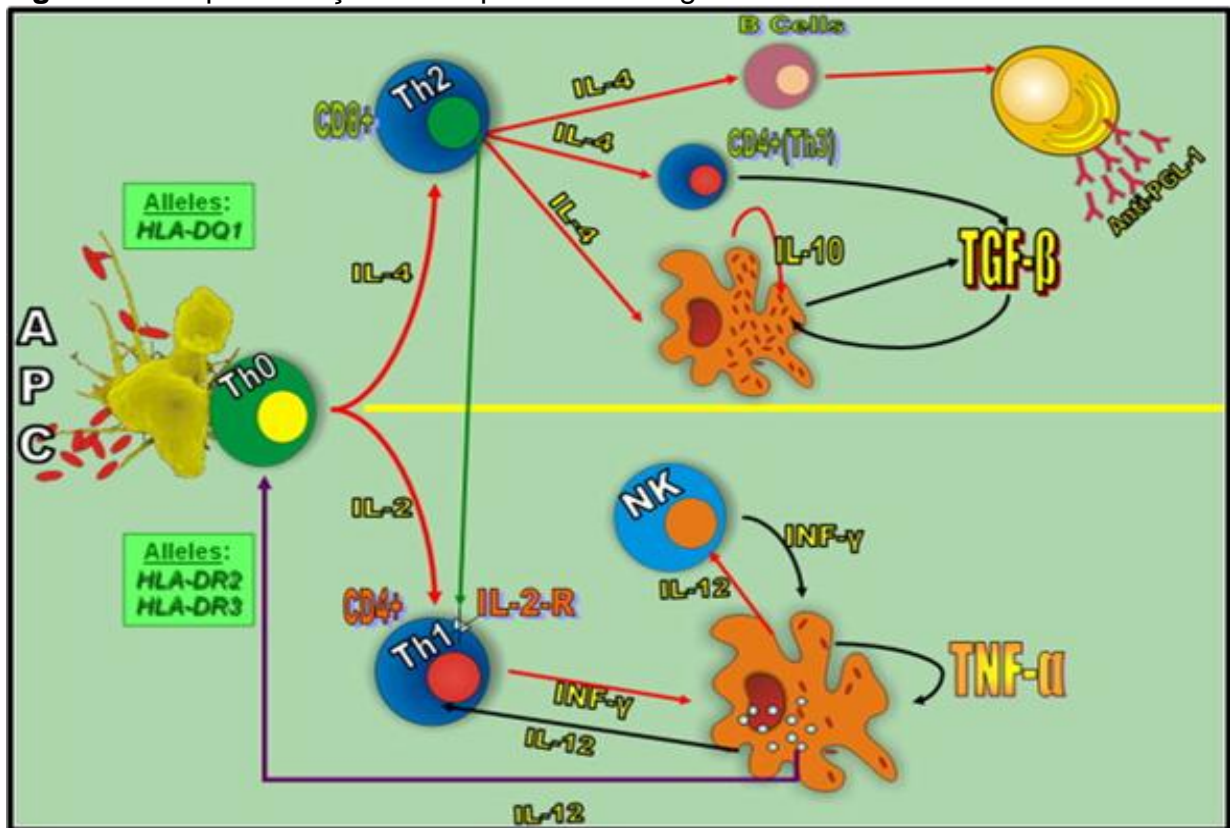
No que tange a resposta de migração das células pelo endotélio, na doença de hansen, um dos primeiros estudos que avaliou o papel das moléculas de adesão, foi demonstrado a diferença de expressão tanto de E-selectina quanto de P-selectina nas formas polares da doença sendo que a E-selectina foi encontrada mais na forma tuberculóide, enquanto que a P-selectina na virchowiana. Nesta relação, o estudo reforça que a diferença de expressão entre os marcadores pode ser crucial para o recrutamento de células para o foco infeccioso, bem como para a montagem da resposta celular efetiva nas formas polares da doença (SOUZA et al., 2015).

Sobre a resposta das quimiocinas, um estudo demonstrou que a diferença de expressão dos ligantes 17 e 18 de quimiocina CC (CCL17 e CCL18) nas formas polares da doença, seria determinante para induzir a diferenciação e modificação fenotípica dos macrófagos M2 no espectro da doença (BERRINGTON et al., 2014).

Referente à resposta dos linfócitos T, diversos estudos na literatura já demonstraram que a doença polariza a resposta celular. Na abordagem clássica, os linfócitos Th1 e Th2 são as células que definem o antagonismo existente entre as formas tuberculóide e virchowiana (QUARESMA et al., 2012; SOUSA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; AARÃO et al., 2014) (Figura 12).

Na forma tuberculóide é descrito que o hospedeiro manifesta um conjunto de respostas mediadas pelos linfócitos Th1 que produzem citocinas inflamatórias como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ , que são responsáveis pela ativação dos macrófagos e destruição do bacilo (QUARESMA et al., 2012; SOUSA et al., 2013).

Figura 12: Representação da resposta imunológica da hanseníase.



Fonte: Quaresma et al, 2012.

Na forma virchowiana é observado o aumento da resposta de células Th2 e de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 4 (IL-4), IL-10 e TGF- β que são responsáveis por inibir a ativação dos macrófagos e a resposta de mediadores inflamatórios como TNF- α , IFN- γ e a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) viabilizando a sobrevivência do bacilo (QUARESMA et al., 2012; SOUSA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; AARÃO et al., 2014).

No que diz respeito ao surgimento de novas abordagens na imunopatogênese da doença, com os avanços obtidos no conhecimento da imunologia, evidências crescentes na literatura tem mudado a forma de como tem se discutido os caminhos imunológicos no espectro da doença (RAZVI, 2011; POLYCARPOU, 2013; LIU et al., 2015).

Diante da complexidade e o surgimento dos novos perfis celulares, novas abordagens tem surgido e com elas novas interpretações têm ampliado a forma de entender o comportamento dos mecanismos fisiopatológicos e imunológicos (MAGOMBEDZE et al., 2013; KUMAR et al., 2014; SURYADEVARA et al., 2013).

Em um estudo que levou em consideração a presença do ligante de Fas (FasL), foi observado que em pacientes multibacilares, a expressão da proteína nos macrófagos poderia induzir a apoptose de linfócitos T durante o desencadeamento da resposta celular contra o bacilo (QUARESMA et al., 2014). Em outro estudo que avaliou o fenômeno da apoptose a partir da atividade dos macrófagos, foi demonstrado que a lisozima era capaz de estimular o aumento da caspase 3 na forma tuberculóide da doença (QUARESMA et al., 2010). Em outro trabalho que envolveu a relação dos linfócitos T reguladores (Tregs) com a apoptose, foi demonstrado o sinergismo de resposta existente entre o *forkhead box P3* (FoxP3) e a Caspase 3 e o aumento dos marcadores na forma virchowiana da doença (QUARESMA et al., 2014).

Sobre a resposta de outra linhagem de células Treg, no estudo que avaliou a resposta dos linfócitos T auxiliar 3 (Th3) foi observado que o aumento do TGF- β , do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA 4) e de ubiquitina E3 proteína ligase b (CBL b) poderia estar relacionado com o desenvolvimento de mecanismos inibitórios de sinalização intracelular e de inativação da resposta pro-inflamatória contra o *M. leprae* (KUMAR et al., 2013).

Ainda sobre a resposta dos linfócitos T, umas das células que tem chamado muito a atenção, principalmente pela diversidade dos marcadores, são os linfócitos T auxiliar 17 (Th17) que entram no grupo de células que apresenta caráter peculiar (POLYCARPOU, 2013).

Na doença de hansen, já foi demonstrado que a célula é formada a partir do processo de diferenciação dos linfócitos Th0 que na presença de IL-6 e TGF- β formam os linfócitos Th17. Estas células tem como fator de transcrição regulador o *retinoic cid receptor-related orphan receptor gamma t* (ROR γ) e assim como as células Th1, os linfócitos Th17 produzem citocinas inflamatórias que vão influenciar de forma direta no papel microbicida dos macrófagos (SAINI, 2013; POLYCARPOU, 2013; QUARESMA et al., 2015).

Em um estudo que verificou o padrão de resposta dos linfócitos Th17, na classificação de Madri, foi demonstrada a diversidade da resposta das citocinas entre as formas clínicas, e na forma tuberculóide foi observado o aumento da IL-17 e a potencialização da resposta celular contra o *M. leprae* (QUARESMA et al., 2015).

Recentemente, para ampliar ainda mais a complexidade e como o sistema de defesa responde aos mecanismos de evasão imunológica desenvolvidos pela

bactéria, um outro subtipo de linfócito T sinaliza para o surgimento de novas abordagens e novos caminhos imunológicos. Estes linfócitos são os linfócitos T auxiliar 22 (Th22) e na doença de hansen, o primeiro estudo descrito na literatura mostrou que a célula produz interleucina 22 (IL-22), interleucina 13 (IL-13), TNF- α , e fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF b). Neste trabalho, foi demonstrado que a IL-22 torna-se peça chave para se entender ainda mais a resposta dos macrófagos e a fusão do fagossomo com o lisossomo (SILVEIRA et al., 2015).

2.7 Macrófagos

Os macrófagos são células do sistema de defesa bastante dinâmicas e heterogêneas. Essa heterogeneidade reflete provavelmente a plasticidade e versatilidade destas células em responder a sinais do microambiente (MURRAY; WYNN, 2011; CHOW et al, 2011).

Inicialmente, o processo de formação dos macrófagos começa na medula óssea, onde a partir da diferenciação das células tronco hematopoiéticas, as células precursoras são formadas (GORDON, 2003; MURRAY; WYNN, 2011; CHOW et al, 2011).

No sangue, as linhagens de pré-monócitos dão origem aos monócitos, e estes monócitos na corrente sanguínea, adentram nos tecidos para formar os macrófagos residentes que possuem múltiplas funções (MURRAY; WYNN, 2011; CHOW et al, 2011).

Nos principais órgãos, em cada um, os macrófagos residentes conseguem desenvolver uma série de respostas que refletem a plasticidade e as múltiplas funções desta célula fascinante. No fígado, os macrófagos conhecidos como células de Kupffer, são responsáveis por remover substâncias, toxinas e patógenos agressores. Nos pulmões apresentam-se como macrófagos alveolares que eliminam micro-organismos, alérgenos e micropartículas. No cérebro, são conhecidos como microglia, a principal célula de defesa do sistema nervoso central que possui funções que modulam a resposta de proliferação, transformação morfológica, motilidade e migração, comunicação intracelular, e fagocitose (LAWRENCE; NATOLI, 2011; MURRAY; WYNN, 2011; SHI; PAMER, 2011; WYNN et al., 2013; LONDON et al., 2013; GALÃIN et al., 2015).

Nos linfonodos, são tidos como macrófagos medulares ou macrófagos subcapsular sinusoidal que capturam antígenos e apresentam para as células B. No intestino, são denominados de macrófagos intestinais que reconhecem e removem patógenos entéricos e mantém o balanço para o funcionamento da microbiota. No baço, a derivação para macrófago esplênico mostra mais uma das grandes variedades da célula, onde neste órgão os macrófagos são responsáveis por fagocitar eritrócitos senescentes ou alterados e também capturar antígenos para processar e apresentar aos linfócitos T (LAWRENCE; NATOLI, 2011; MURRAY; WYNN, 2011; SHI; PAMER, 2011; WYNN et al., 2013; LONDON et al., 2013; GALÃIN et al., 2015).

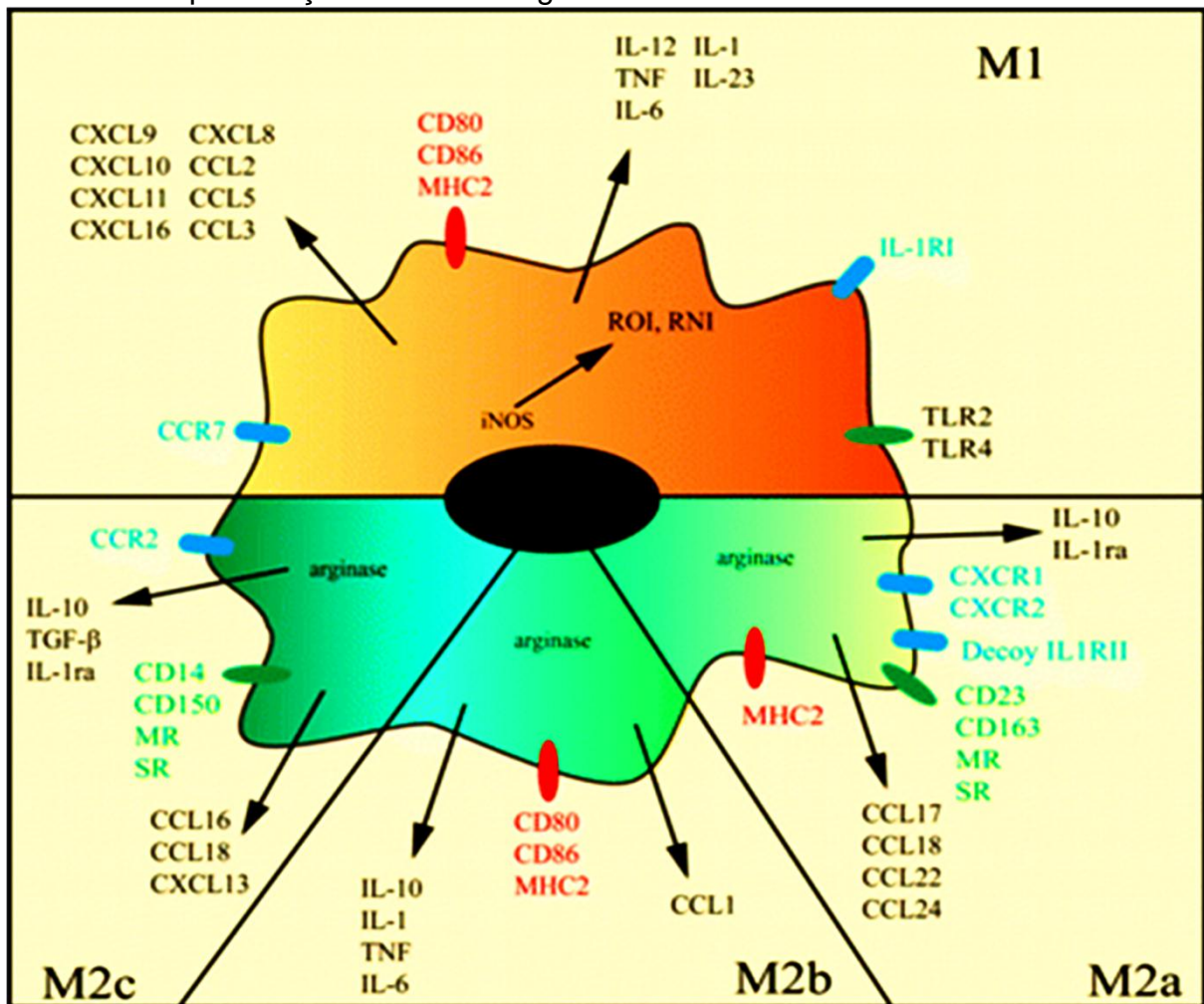
Na pele, os macrófagos podem se apresentar na forma de queratinócitos, células de langerhans ou histiócitos que tem como principal função a fagocitose, captura, processamento e apresentação de antígeno (LAWRENCE; NATOLI, 2011; MURRAY; WYNN, 2011; SHI; PAMER, 2011; WYNN et al., 2013; LONDON et al., 2013; GALÃIN et al., 2015).

2.7.1 Subpopulações de Macrófagos

Atualmente, novos conceitos têm sinalizado para o uma nova forma de entendimento da resposta dos macrófagos. Assim como os linfócitos T apresentam vários subtipos celulares, na literatura os estudos têm demonstrado que os macrófagos também se diferenciam em várias subpopulações (BROICHHAUSEN et al., 2012; HRISTODOROV et al., 2012; KONTTINEN et al., 2015; ERBEL et al., 2015).

Nessa variedade de subpopulações, a diferença entre elas está num conjunto de marcadores que define cada população. No fechamento de cada painel que caracteriza um perfil, os estudos têm demonstrado que as populações se distinguem pela diferença de expressão de quimiocinas, receptores de quimiocinas, enzimas, moléculas coestimulatórias, receptores *Toll*, receptores de citocinas e citocinas (BENOIT et al., 2008; HRISTODOROV et al., 2012; KONTTINEN et al., 2015; ERBEL et al., 2015; CAO et al., 2015) (Figura 13).

Figura 13: Esquema geral da disposição dos marcadores que representam a polarização dos macrófagos.



Fonte: Benoit et al., 2008.

No caso dos macrófagos M1, não se tem um marcador de superfície que defina a sua identificação, no entanto, como peculiaridade, é a célula que expressa iNOS, o principal marcador que confirma a presença da resposta da célula em determinada doença (BENOIT et al., 2008; LAWRENCE; NATOLI, 2011; CAO et al., 2015).

Nas subpopulações de macrófagos M2, tanto o macrófago M2a, M2b, M2c, tem como marcador, que caracteriza a resposta da célula, a arginase (BENOIT et al., 2008; ERBEL et al., 2015). Nessas subpopulações, um receptor que é expresso na superfície da célula, tem sido utilizado para identificar os macrófagos M2. Este receptor é conhecido como receptor de “*scavenger*” que reconhece os complexos de hepatoglobina-hemoglobina e tem como marcador o CD163 (CANTON et al., 2013).

Ainda sobre os macrófagos M2, uma nova subpopulação tem sido descrita na literatura. Estas células são tidas como os macrófagos M2d e ainda não se sabe ao certo quais são os marcadores que diferenciam o macrófago M0 para macrófago M2d. Na literatura, os estudos demonstraram que esta população pode participar da resposta de angiogênese, produzindo IL-10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (COLIN et al., 2014; PAOLI et al., 2014).

Mais recentemente foi demonstrado que os macrófagos conseguem se diferenciar e formar mais seis subpopulações. Estes macrófagos são conhecidos como macrófagos reguladores (Mreg), macrófagos associados à hemorragia (Mha), macrófagos oxidativos (Mox), macrófagos M3, macrófagos M4 e os macrófagos M17 (BROICHHAUSEN et al., 2012; HRISTODOROV et al., 2012; KONTTINEN et al., 2015; ERBEL et al., 2015).

Os macrófagos Mreg respondem ao estímulo das células Treg e são responsáveis por induzir a resposta de reparo e inibir a formação de mecanismos que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias em lesões teciduais (BROICHHAUSEN et al., 2012; KONTTINEN et al., 2015).

No caso dos macrófagos Mha, para serem formados, necessitam da liberação dos complexos de haptoglobina-hemoglobina e da oxidação das células vermelhas do sangue. Na sua superfície, expressam o CD163 e produzem IL-10 e heme oxigenase-1 (HO-1) (HRISTODOROV et al., 2012).

Já os macrófagos Mox se diferenciam na presença de *ox-PL 1-palmitoyl-2 arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine* (Ox-PL-PPC) e produzem HO-1 e sufiredoxina-1 (SD-1). Estas células estão associadas com o desencadeamento de respostas oxidativas (HRISTODOROV et al., 2012; ERBEL et al., 2015).

Os macrófagos M3, descobertos recentemente, são conhecidos como macrófagos de comutação, e na literatura o primeiro estudo a discutir o surgimento desta nova linhagem demonstrou que o aparecimento deste novo subtipo celular seria oriundo da resposta de comutação entre os marcadores que compõe a via dos macrófagos M1 e M2 (MALYSHEV; MALYSHEV, 2015).

Sobre os macrófagos M4, assim como os macrófagos M3, são um grupo de células novas que tem chamado a atenção por conta dos mecanismos de resposta que conseguem desenvolver. Estas células se diferenciam na presença do fator estimulador de colônia (CSF) e de CXCL4, e têm como marcadores o CD206, CD68, metaloproteinase 7 e 12 (MMP7 e MMP12), proteína de ligação ao cálcio A8

(S100A8) e produzem IL-6, TNF- α , ligante 18 e 20 de quimiocina CC (CCL18 e 20) (PAOLI et al., 2014; COLIN et al., 2014; ERBEL et al., 2015). Em lesões oxidativas, estas células expressam uma grande quantidade de receptor para lipoproteína de baixa densidade (LDL) e em lesões crônicas formam um grande contingente de células espumosas que levam a cronificação do processo inflamatório (PAOLI et al., 2014; COLIN et al., 2014; ERBEL et al., 2015).

A respeito dos macrófagos M17, o conceito de surgimento da célula é relativamente novo. Na literatura, um dos primeiros estudos a levantar essa hipótese demonstrou que a formação da célula possa ser induzida por corticosteróides, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) ou IL-10 e um aspecto importante é que a célula, ao responder a IL-17, torna-se resistente a apoptose (KONTTINEN et al., 2015).

2.7.2 Polarização da Resposta dos Macrófagos

Na linha do tempo, a investigação do papel espectral dos macrófagos começa no início do século 20, mais precisamente em 1905, onde nos primeiros postulados, foi observado que as células fagocíticas se tornavam mais aptas a destruir bactérias após o quadro de resistência a infecção. A partir desse momento, o conceito de ativação dos macrófagos começou a ser construído. Em 1964 a idéia foi mais aprofundada. No ano de 1973, os linfócitos foram identificados como as principais células responsáveis pela ativação microbicida dos macrófagos. Em 1983, a descoberta do IFN- γ foi determinante para o surgimento da via clássica. Em 1989 com a descoberta dos linfócitos Th1 e Th2, houveram ainda mais avanços para o surgimento do conceito de macrófago espectral. No ano de 1992, a ativação da via alternativa foi proposta com a descoberta do CD206 como marcador distinto. Em 2008, o espectro de ativação dos macrófagos foi proposto e em 2010, o conceito de macrófago M2 foi descrito e uma nova rota e ativação da célula foi definida (LIU et al., 2014).

A partir do surgimento desta nova subpopulação, os estudos começaram a demonstrar duas populações distintas de macrófagos, cada uma pertencente a uma via (ROGERS et al., 2014; WYNN et al., 2014; MARTINEZ; GORDON, 2014). Na via clássica, o principal personagem seria o macrófago M1 conhecido como macrófago inflamatório e microbicida, e na via alternativa, conhecida como via reparadora, as

células responsáveis pela resposta de reparo seriam as subpopulações de macrófagos M2 (ROGERS et al., 2014; WYNN et al., 2014; MARTINEZ; GORDON, 2014).

2.7.3 Resposta Imunológica dos Macrófagos

Diante da versatilidade destas células, o mecanismo de resposta envolvendo a destruição de micro-organismos perpassa por pontos da resposta imunológica que ainda não tinham sido elucidados, mas que hoje as evidências fortalecem ainda mais a relação existente entre os componentes do sistema imunológico inato e adaptativo (GORDON, 2003).

Na resposta inata, os macrófagos ao receberem determinados estímulos como, por exemplo, de complexos peptídicos de lipopolissacarídeos, ao serem reconhecidos pelo TLR e CD14, podem levar ao desenvolvimento de cascatas de sinalização, que culminam com a produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de citocinas inflamatórias como interferon alfa (IFN- α) e interferon beta (IFN- β) (GORDON, 2003).

Caminhando no curso da resposta dos macrófagos, no curso da resposta inata, foi demonstrado que a presença de determinados componentes do sistema complemento pode regular a polarização da resposta dos macrófagos (BOHLSON et al., 2014). Na via inflamatória, as porções do complemento (C) C3a, C5a, C5b e C9 podem induzir a produção de mediadores inflamatórios. Já na via reparadora, a presença de corpos apoptóticos opsonizados com os fragmentos do complemento (C) C1q ou C3b podem estimular os macrófagos M2 a produzir arginases e citocinas anti-inflamatórias (BOHLSON et al., 2014).

No curso da resposta humoral, a fagocitose de determinados micro-organismos pode ser mediada pelo reconhecimento da porção Fc (GORDON, 2003). Na literatura, já foi demonstrado que a participação de determinadas moléculas coestimulatórias servem como ferramenta chave para o melhoramento da fagocitose, apresentação de antígenos e a endocitose. Estas moléculas fazem parte da família de receptores conhecidos como receptores de “*scavenger*” e de manose (GORDON, 2003; CANTON et al., 2013).

2.7.4 Sinal de Transdução e os Caminhos da Polarização dos Macrófagos M1 e M2

O esquema clássico de resposta de transdução de sinal descreve que tanto os macrófagos M1 quanto os M2 seguem um caminho que parte desde a ligação de uma proteína, ou de outros componentes a um receptor que induz a formação de cascatas de sinalização, formada pela transdução de sinal, fosforilação de fatores de transcrição, migração do fator para o núcleo, ativação de genes e produção de citocinas, enzimas, moléculas coestimulatórias, etc (LAWRENCE; NATOLI, 2011; LIU et al., 2014).

No desenvolvimento da resposta na via clássica dos macrófagos M1, três rotas são conhecidas. A primeira perpassa pela ligação do IFN- γ ao receptor de interferon gama (IFN- γ R), na qual esta ligação induz a transdução de sinal mediada pelas *janus kinase 1 e 2* (JAK1 e JAK2) que repassam a informação para o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 ou 2 (STAT1 ou STAT2) que migram para o núcleo, ativam genes que levam a produção de MHCII, IL-12 e iNOS (LAWRENCE; NATOLI, 2011; LIU et al., 2014).

No caminho da estimulação mediada pelo GM-CSF, o fator estimulador ao se ligar ao receptor alfa para o fator estimulador de colônia 2 (CSF2R α) sinaliza a transdução para a JAK2 que encaminha a mensagem para à STAT5, que por sua vez fosforila e se liga ao fator regulador de interferon 5 (IRF5), que parte para o núcleo e ativa os genes responsáveis pela produção de óxido nítrico sintetase 2 (Nos2), transativador de MHC classe II (Ciita), e IL12b (LAWRENCE; NATOLI, 2011; LIU et al., 2014).

Na estimulação pelo LPS, o TLR4 pode induzir a ativação das vias do fator nuclear kappa B (NF- κ B) ou da proteína ativadora 1 (ap1) que levam a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ (LAWRENCE; NATOLI, 2011; LIU et al., 2014).

Na via alternativa, os macrófagos M2 respondem ao estímulo de duas citocinas, a IL-4 e a IL-13. Essas citocinas, dependendo do meio, ao se ligarem ao receptor alfa para a IL-4 (IL-4R α), podem estimular a formação de cascatas de sinalização reparadora. Uma delas perpassa pela informação que as JAK 1,2 e 3 levam para a STAT6 que transloca para o núcleo e ativa genes que são responsáveis pela produção de arginase1 e CD206 (LAWRENCE; NATOLI, 2011; LIU et al., 2014).

Em outro caminho, a ligação das citocinas pode levar o receptor gamma ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR γ) ou o fosfoinositideo kinase 3 (PI3K) a ativar os genes que são responsáveis pela produção de quitinase do tipo 3 (Chi3l3) e resistina do tipo α (Rtn1a), que por sua vez participam da resposta de reparo tecidual (LAWRENCE; NATOLI, 2011; LIU et al., 2014).

Além das cascatas de sinalização que a IL-4 e IL-13 conseguem desenvolver, outra citocina que tem ganhado destaque no contexto da resposta do macrófago M2 é a IL-10, onde estudos já demonstraram que a citocina ao se ligar no receptor para IL-10 (IL-10R) induz a formação do complexo JAK1 e STAT3 que após a fosforilação, o fator de transcrição migra para o núcleo e ativa uma série de genes que estão relacionados com a produção de TGF- β , arginase 1, NOS2, IL-4R α , IL-1R α (LANG et al., 2002; SICA; MANTOVANI, 2012).

Na literatura, outros caminhos já demonstraram que a STAT3 pode mudar seu comportamento no contexto da polarização de resposta dos macrófagos e induzir a produção de mediadores inflamatórios como a iNOS, IL-6, IL-17 e IL-22 (ZIESCHÉ et al., 2007.; WANG et al., 2009).

2.7.5 Mecanismos de Escape Imunológico de Patógenos Intracelulares

Não é de hoje que as indagações surgem a respeito de como os macrófagos não conseguem desenvolver uma resposta efetiva contra determinados patógenos intracelulares. Até hoje, muitos estudos procuram entender qual seria a rota para mudar o comportamento da célula infectada. Seja vírus, bactéria, protozoário, fungo, cada um desses patógenos utiliza do sistema imunológico para modular a resposta e sobreviver dentro da célula (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010; DIACOVICH; GORVEL, 2010; LIEHL et al., 2015).

No caso das bactérias, dentro dos fagócitos o caminho normal após o englobamento do micro-organismo seria a fusão do fagossomo com o lisossomo, liberação do conteúdo enzimático, produção de radical livre e destruição do patógeno (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010). No entanto, por mecanismos de escape imunológico, o patógeno consegue sobreviver modulando os principais pontos de desenvolvimento da resposta celular (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010).

Na superfície da célula, a inibição começa pelo bloqueio da resposta dos receptores TLR. No interior da célula, as bactérias impedem o desenvolvimento das cascatas de sinalização intracelular mediada pela família das proteino quinase ativada por mitógeno (MAPKKK) e do NF- κ B (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010).

Na resposta das citocinas, as bactérias conseguem desregular o balanço na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, inibir a resposta do IFN- γ e a sinalização das JAKs. Na apoptose, a regulação acontece por inibição ou liberação de caspase 3. Na resposta microbicida, a interrupção acontece por bloqueio da fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP) e consequentemente de NO e de radicais hidroxil (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010).

Na resposta de fusão do fagossomo, as bactérias intracelulares conseguem inibir a fusão, modulando o tráfego de vesículas e a expressão de proteínas da família das *GTP-binding proteins* (RABs) e das *soluble NSF attachment receptor* (sNARES). Na formação de macromoléculas, as bactérias em alguns casos inibem a formação do inflamossomo e a produção de IL-1 β e de receptores semelhantes ao NOD1 e 3 (NALP1 e NALP3) (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010; HARDING et al., 2010; DIACOVICH; GORVEL, 2010; HAM et al., 2011; HUANG; BRUMELL, 2014; LIEHL et al., 2015).

Outro ponto importante de regulação dos mecanismos de escape das bactérias perpassa pela inibição da formação dos complexos de histocompatibilidade (MHCI e MHCII), o que acaba comprometendo a montagem da resposta envolvendo os linfócitos Th1 e Th2 (MCKINNEY; GOMEZ, 2003; ROSENBERGER; FINLAY, 2003; BEHAR et al., 2010; HARDING et al., 2010; DIACOVICH; GORVEL, 2010; HAM et al., 2011; HUANG; BRUMELL, 2014; LIEHL et al., 2015).

Numa nova abordagem, na literatura já foi demonstrado que as bactérias intracelulares também conseguem modular a resposta de estresse do reticulo endoplasmático estimulando ou inibindo a produção de *protein homologous* (CHOP) ou *DNA damage inducible transcript 3* (GADD153) (LIEHL et al., 2015).

2.7.6 Resposta dos Macrófagos na Hanseníase

Na hanseníase, por conta de ser a principal célula que exerce atividade microbicida, muitos estudos já descreveram o papel da célula respondendo a citocinas que são representantes clássicas da resposta celular como TNF- α e IFN- γ (ANTÔNIO, et al., 2013; ABDALLAH, et al., 2014). Na doença, já foi demonstrado que as duas citocinas ao se ligarem no receptor mudam o comportamento do macrófago M0 que após sofrer modificação fenotípica, passa a ser um macrófago inflamatório que produz citocinas inflamatórias e enzimas como a iNOS, que induz a produção de NO e conseqüentemente de radical livre que destrói o bacilo (HERNANDEZ, et al., 2011; TELES et al., 2013; SOUSA et al., 2013; CORTELA et al., 2015). No entanto, os trabalhos mais recentes levantaram questionamentos sobre o papel da célula que ainda não foram esclarecidos (HUANG; BRUMELL, 2014; LIEHL et al., 2015).

No caminho da polarização, poucos foram os estudos que abordaram a relação entre os macrófagos M1 e M2 na doença de hansen (MÈGE et al., 2011; HUANG; BRUMELL, 2014; LIEHL et al., 2015).

Num modelo de explicação sobre a relação do CD163, como um receptor “scavenger”, presente em macrófagos M2, uma vez que o *M. leprae* é reconhecido por estas células, há o aumento da expressão deste receptor (MÈGE et al., 2011). Neste contexto, o reconhecimento do *M. leprae* pelo CD163 eleva os níveis de TNF- α , IL-10 e TGF- β , favorecendo a expressão deIDO (SALES et al., 2011).

Nos macrófagos, já foi demonstrado que a redução dos níveis de triptofano pela IDO contribui para a morte da bactéria por conta da produção de metabólitos reativos. Neste contexto, a destruição do bacilo favorece o espalhamento antigênico e ativação de TLR pelos componentes do *M. leprae* (SALES et al., 2011; MOURA, et al., 2012).

Outro ponto importante a respeito dessa dinâmica é a produção de metabólitos nos macrófagos reparadores, onde já foi demonstrado que o aumento dos níveis dos metabólitos de quinurenina, induzem a diferenciação das Treg e a produção de citocinas que sustentam o perfil anti-inflamatório dos macrófagos no pólo virchowiano (MOURA, et al., 2012; BOBOSHA, et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar as possíveis implicações da polarização de resposta dos macrófagos M1 e M2 nas formas polares da hanseníase em lesões cutâneas e empregando a técnica de imunomarcção em tecidos.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão das moléculas coestimulatórias CD68, CD163 nas formas polares da doença;
- Quantificar a expressão das enzimas arginase 1 e iNOS e do fator de transcrição STAT3 nas formas polares doença;
- Quantificar a expressão das citocinas IL-10, IL-13, IL-22, TGF- β e FGF b nas formas polares da doença;
- Correlacionar os níveis quantitativos das moléculas coestimulatórias, citocinas, enzimas e fatores de transcrição expressos tanto na forma TT quanto na VV da doença.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo transversal analítico com amostras retrospectivas, no laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) em Belém.

4.2 Seleção da amostra

Trata-se de uma amostra por conveniência onde foram utilizados 33 blocos de parafinas com fragmentos de pele de pacientes atendidos em laboratórios parceiros do NMT no período de 2010 a 2014, sendo 17 TT e 16 VV com diagnóstico confirmado para a doença, segundo os critérios preconizados pela classificação de Ridley e Jopling.

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídas:

- Amostras de pacientes acima de 18 anos independente do sexo;
- Amostras coletadas confirmadas pelo laudo como positiva para o mal de hansen e que tenha características histológicas das formas polares da doença;

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos:

- Casos de pacientes com quadro de coinfeccção provocada por fungo, vírus, protozoário e bactéria;
- Pacientes em tratamento;
- Casos de estágios reacionais.

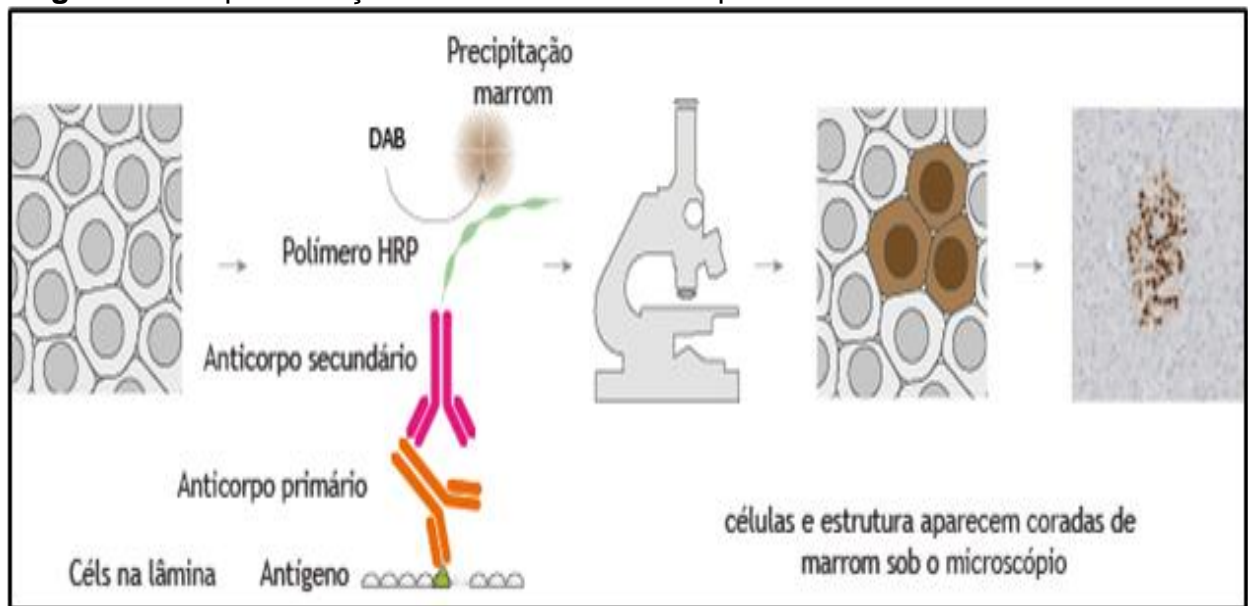
4.5 Biópsias de pele

As biópsias de pele foram colhidas após anestesia no local das lesões selecionadas com punch nº 3 e emblocadas em parafina. As porções retiradas passaram pela microtomia onde foram obtidos cortes histológicos a uma espessura de 5 µm. Em seguida as amostras teciduais foram coradas com hematoxilina-eosina para as avaliações morfológicas e posteriormente foram submetidas à técnica de imunistoquímica para a detecção dos marcadores (Anexo II).

4.6 Imunoistoquímica

A imunistoquímica para a imunomarcção do tecido com os anticorpos monoclonais específicos para cada marcador foi baseada no método imunistoquímico envolvendo a formação do complexo biotina-estreptavidina peroxidase (Figura 14). Inicialmente as amostras teciduais foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em álcool etílico em concentração de 90, 80 e 70%. Em seguida a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 45 minutos. Após, a recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos a 90°C. Em seguida o bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com leite desnatado concentrado a 10% por 30 minutos. Finalizada esta etapa, os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários diluídos em Soro albumina bovina (BSA) a 1% por 14 horas (Tabela 1). Após este intervalo, as lâminas foram imersas em solução tampão de PBS 1X e em seguida incubadas com o anticorpo secundário biotinilado LSAB (DakoCytomation) em estufa por 30 minutos a 37°C. Após a primeira incubação, as lâminas foram novamente imersas em PBS1X e incubadas com estreptavidina peroxidase (LSAB DakoCytomation) por 30 minutos a 37°C. Após este intervalo, os cortes foram revelados com a aplicação da solução cromógena composta por diaminobenzidina a 0,03% e peróxido de hidrogênio a 3%. Terminando a etapa de revelação, os preparados foram lavados em água destilada e em seguida contra corados com a hematoxilina de Harris por 1 minuto. Em outro momento, finalizando a técnica os cortes histológicos foram desidratados em álcool etílico em maior concentração e diafinizados em xilol.

Figura 14: Representação do método imunistoquímico.



Fonte: Adaptado de *The Human Protein Atlas*.

Tabela 1: Lista dos anticorpos utilizados para o estudo dos macrófagos M1 e M2.

Anticorpos	Referência	Diluição
Anti-CD68	Biocare Medical, CM033C	1:200
Anti-CD163	Novocastra, NCL-L-CD163	1:50
Anti-Arginase 1	Sigma, HPA 003595	1:50
Anti-iNOS	Abcam, ab3523-200	1:200
Anti-STAT3	Abcam ab119352	1:100
Anti-TGF- β	Abcam, ab66043	1:100
Anti-FGF b	Abcam, ab16828	1:100
Anti-IL-10	Abcam, ab18499	1:200
Anti-IL-13	Abcam, ab9576	1:100
Anti-IL-22	Abcam, ab18499	1:100

4.7 Análise das lâminas

As porções retiradas das amostras foram analisadas no microscópio Zeiss, modelo 456006. Os imunomarcadores foram analisados de forma quantitativa através da seleção de cinco campos aleatórios onde foram contadas células por campo na área da lesão utilizando lente de aproximação de 400x. Cada campo foi subdividido em áreas 10x10 delimitadas pela lente do microscópio, compreendendo uma região de 0.0625 mm².

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos durante os experimentos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL 2007 e analisadas por meio do programa *GraphPadPrism* 5.0. As variáveis numéricas foram analisadas pela obtenção de medidas de tendência central como média e mediana, bem como por medidas de variabilidade como desvio-padrão e variância. As hipóteses foram testadas pelos testes de *Mann-Whitney* e a correlação de *Spearman*. Todos os testes foram realizados considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.9 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao comitê de ética e aprovado (parecer 907.948) (ANEXO I) seguindo as recomendações preconizadas pela resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12 (APÊNDICE A) e todos os procedimentos de biossegurança foram tomados para minimizar os riscos do estudo.

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPI) e todo material potencialmente contaminado manipulado em laboratório foi descartado 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 realizará os testes. O sigilo e respeito à confidencialidade foi mantido através da codificação das amostras.

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação da expressão dos marcadores envolvidos na polarização de resposta dos macrófagos M1 e M2 na doença de hansen

Referente à análise quantitativa para imunomarcção dos marcadores que norteiam os caminhos da polarização dos macrófagos nas formas polares da hanseníase, foi evidenciando diferença estatística significativa dentre os grupos estudados, sendo observado o aumento na expressão do CD68, CD163, das enzimas iNOS e arginase 1 e das citocinas, na forma virchowiana da doença, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Análise Quantitativa dos marcadores relacionados aos caminhos da polarização de resposta dos macrófagos M1 e M2 nas TT e VV da doença.

Marcadores	TT			VV			p (valor)*
	Média	Mediana	Desvio	Média	Mediana	Desvio	
CD68	25,18	25,00	6,21	62,81	63,00	8,13	<0,0001***
CD163	15,82	15,00	4,06	21,85	21,50	4,76	0,0010**
iNOS	30,24	31,00	2,88	35,44	35,00	4,69	0,0010**
Arginase 1	11,88	12,00	4,15	22,98	23,20	4,25	<0,0001***
TGF- β	8,94	9,00	2,85	23,13	23,84	4,18	<0,0001***
FGF b	9,41	9,00	3,13	25,13	25,00	3,34	<0,0001***
IL-22	12,12	12,00	1,90	31,31	31,50	2,95	<0,0001***
STAT 3	5,29	5,00	1,96	11,13	11,50	3,48	<0,0001***
IL-10	10,00	10,00	2,42	21,36	21,70	3,10	<0,0001***
IL-13	7,88	8,00	3,21	19,81	20,00	3,97	<0,0001***

* Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

5.1.1 Imunomarcção para o CD68 e o CD163 nas formas polares da hanseníase

No grupo TT, a média de células marcadas para o CD68 foi de $25,18 \pm DP 6,21$ células/campo enquanto que no grupo VV, a média foi $62,81 \pm DP 8,13$ células/campo, sendo observada diferença altamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 15A e 16B).

Quanto à imunomarcção para o CD163, na forma TT, a média encontrada para a expressão do receptor foi de $15,82 \pm DP 4,06$. Já na forma VV, a média

encontra para o marcador foi $21,85 \pm DP 4,76$ com “*p*” estatisticamente significativa ($p=0,0010^{**}$) (Figura 15B e 16D).

Figura 15: Análise quantitativa do CD68 (A) e CD163 (B) nas polares da hanseníase.

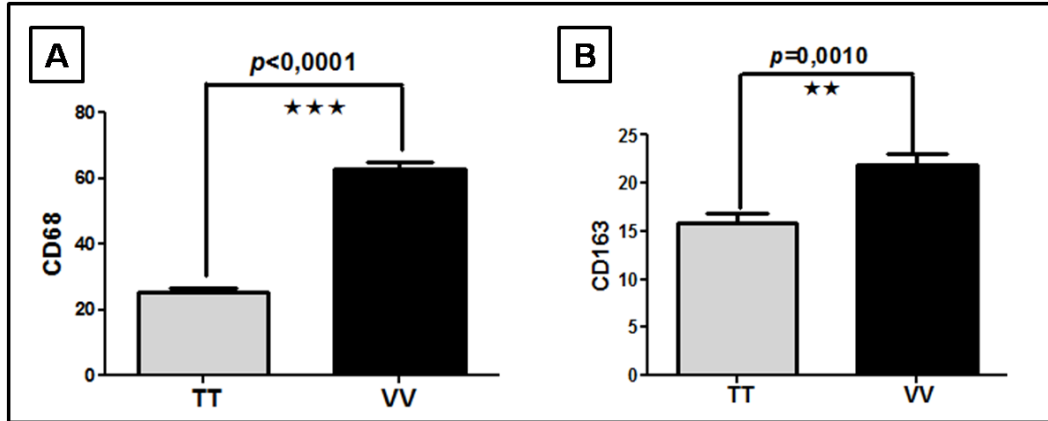
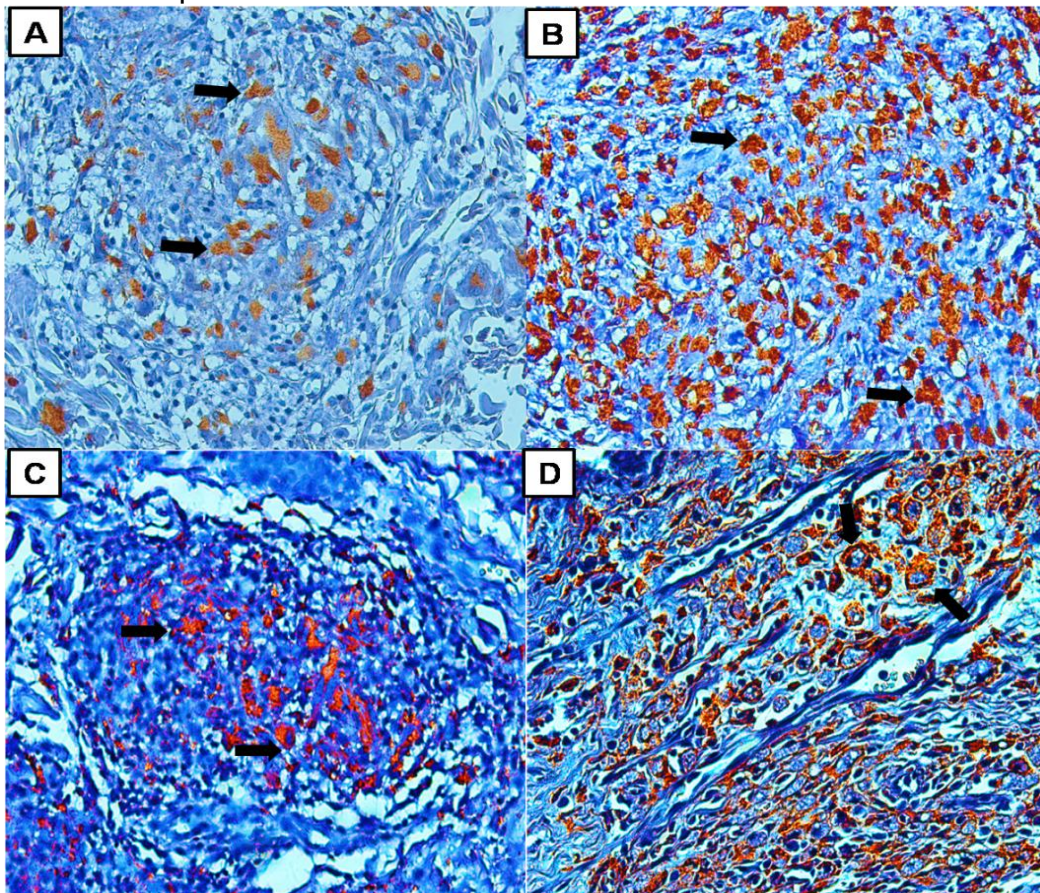


Figura 16: Imunoistoquímica positiva para o CD68 (A:TT e B:VV) e CD163 (C:TT e D:VV) em aumento de 400x nas formas polares da hanseníase.



5.1.2 Imunomarcção para iNOS e arginase 1 nas formas polares da hanseníase

Na imunomarcção para a iNOS, na forma TT, a média encontrada para a expressão do receptor foi de $30,24 \pm DP 2,88$. Já forma na VV, a média encontrada para o marcador foi $35,44 \pm DP 4,69$ com “*p*” estatisticamente significativa ($p=0,0010^{**}$) (Figura 17A e 18B).

No grupo TT, a média de células marcadas para Arginase 1 foi de $11,88 \pm DP 4,15$ células/campo enquanto que no grupo VV, a média foi $22,98 \pm DP 4,25$ células/campo, sendo observada diferença altamente significativa entre os grupos ($p<0,0001^{***}$) (Figura 17B e 18D).

Figura 17: Análise quantitativa para iNOS (A) e arginase 1 (B) nas polares da hanseníase.

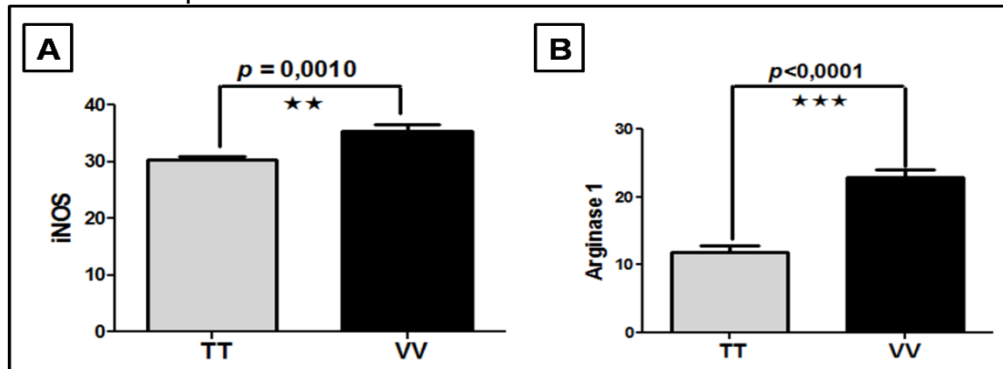
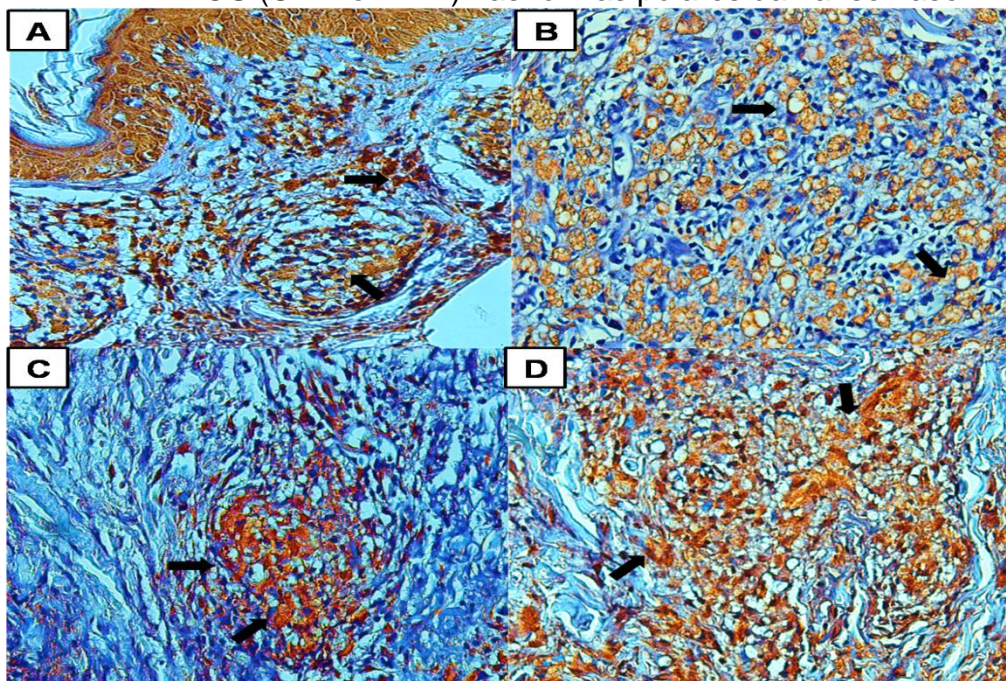


Figura 18: Imunoistoquímica positiva para arginase 1 (A:TT e B:VV) e iNOS (C:TT e D:VV) nas formas polares da hanseníase.



5.1.3 Imunomarcaco para o TGF- β e FGF b nas formas polares da hanseníase

No grupo TT, a média de células marcadas para o TGF- β foi de $8,94 \pm DP 2,85$ células/campo enquanto que no grupo VV, a média foi $23,13 \pm DP 4,18$ células/campo, sendo observada diferença altamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 19A e 20B).

Quanto  imunomarcaco para o FGF b, nas formas TT, a média encontrada para a expressão do receptor foi de $9,41 \pm DP 3,13$. J na forma VV, a média encontra para o marcador foi $23,13 \pm DP 3,34$ com "p" estatisticamente significativa ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 19B e 20D).

Figura 19: Análise quantitativa para TGF- β (A) e FGF b (B) nas polares da hanseníase.

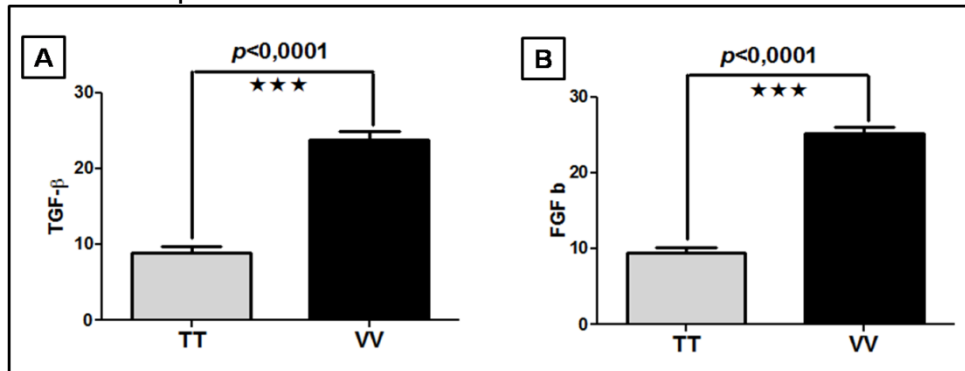
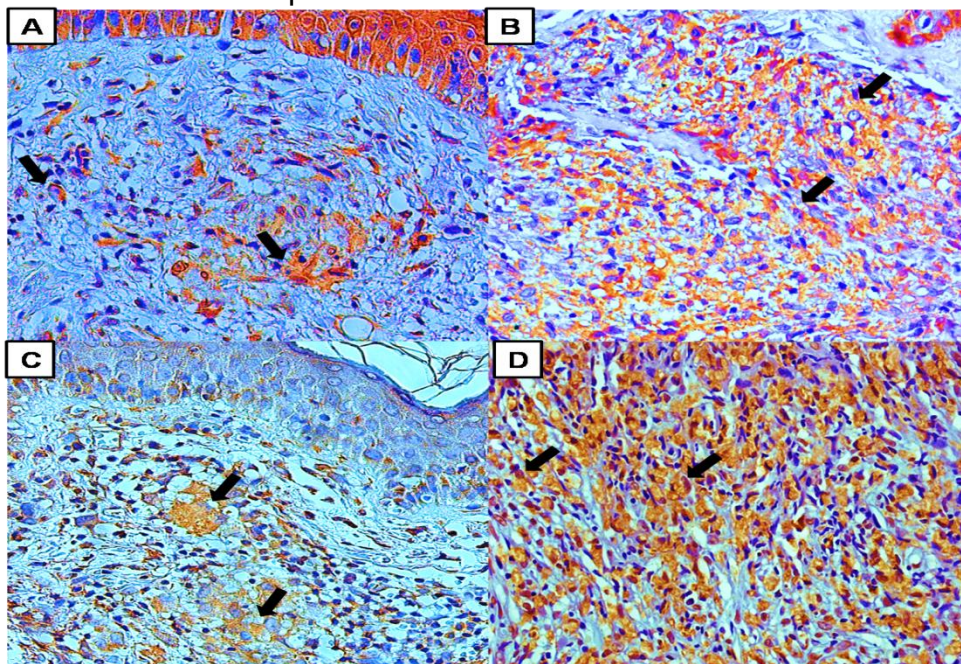


Figura 20: Imunoistoquímica positiva para o TGF- β (A:TT e B:VV) e FGF b (C:TT e D:VV) em aumento de 400x nas formas polares da hanseníase.



5.1.4 Imunomarcção para IL-22 e STAT3 nas formas polares da hanseníase

Quanto à imunomarcção para IL-22, nas formas TT, a média encontrada para a expressão do receptor foi de $12,12 \pm DP 1,90$. Já na forma VV, a média encontra para o marcador foi $31,31 \pm DP 2,95$ com “*p*” estatisticamente significativa ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 21A e 22B).

No grupo TT, a média de células marcadas para o STAT3 foi de $5,29 \pm DP 1,96$ células/campo enquanto que no grupo VV, a média foi $11,13 \pm DP 3,48$ células/campo, sendo observada diferença altamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 21B e 22D).

Figura 21: Análise quantitativa para IL-22 (A) e STAT3 (B) nas polares da hanseníase.

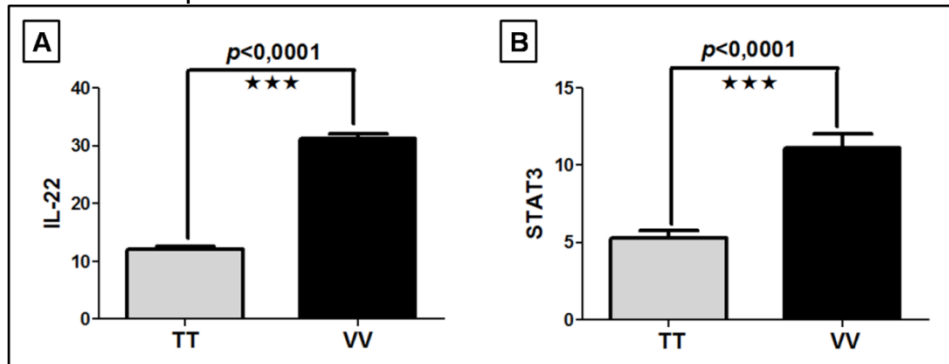
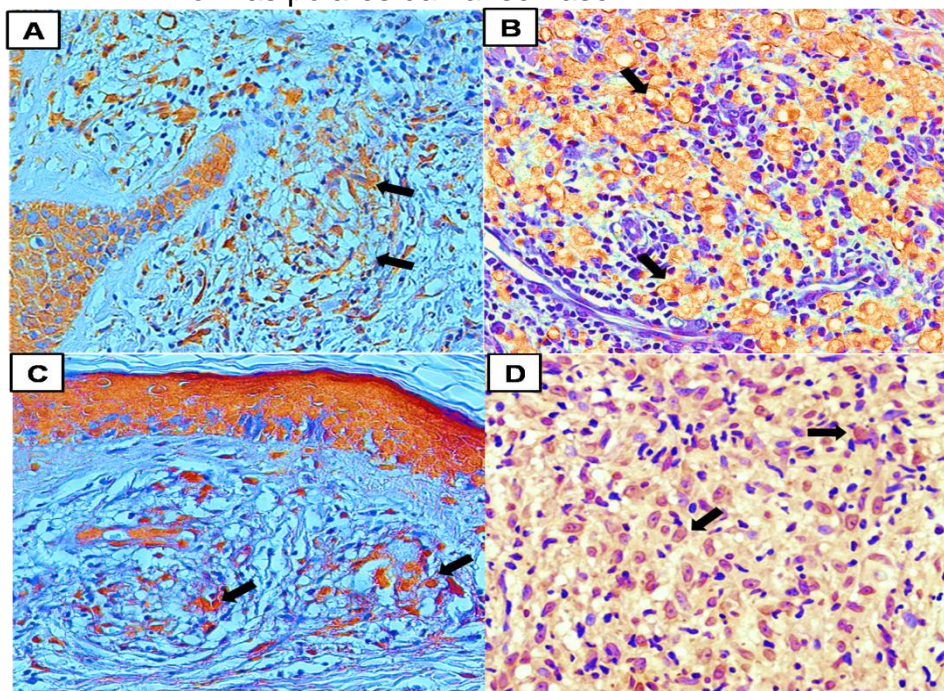


Figura 22: Imunoistoquímica positiva para IL-22 (A:TT e B:VV) e STAT3 (C:TT e D:VV) em aumento de 400x nas formas polares da hanseníase.



5.1.5 Imunomarcção para IL-10 e IL-13 nas formas polares da hanseníase

No grupo TT, a média de células marcadas para IL-10 foi de $10,00 \pm DP 2,42$ células/campo enquanto que no grupo VV, a média foi $21,36 \pm DP 3,10$ células/campo, sendo observada diferença altamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 23A e 24B).

Quanto à imunomarcção para IL-13, nas formas TT, a média encontrada para a expressão do receptor foi de $7,88 \pm DP 3,21$. Já na forma VV, a média encontra para o marcador foi $19,81 \pm DP 3,97$ com “ p ” estatisticamente significativa ($p < 0,0001^{***}$) (Figura 23B e 24D).

Figura 23: Análise quantitativa para IL-10 (A) e IL-13 (B) nas polares da hanseníase.

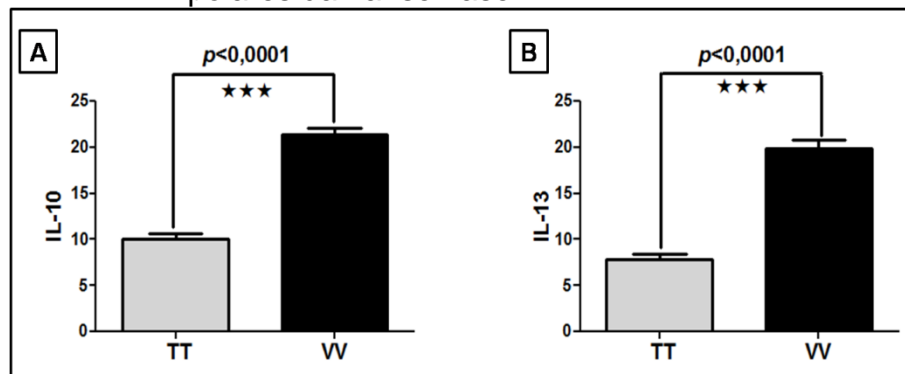
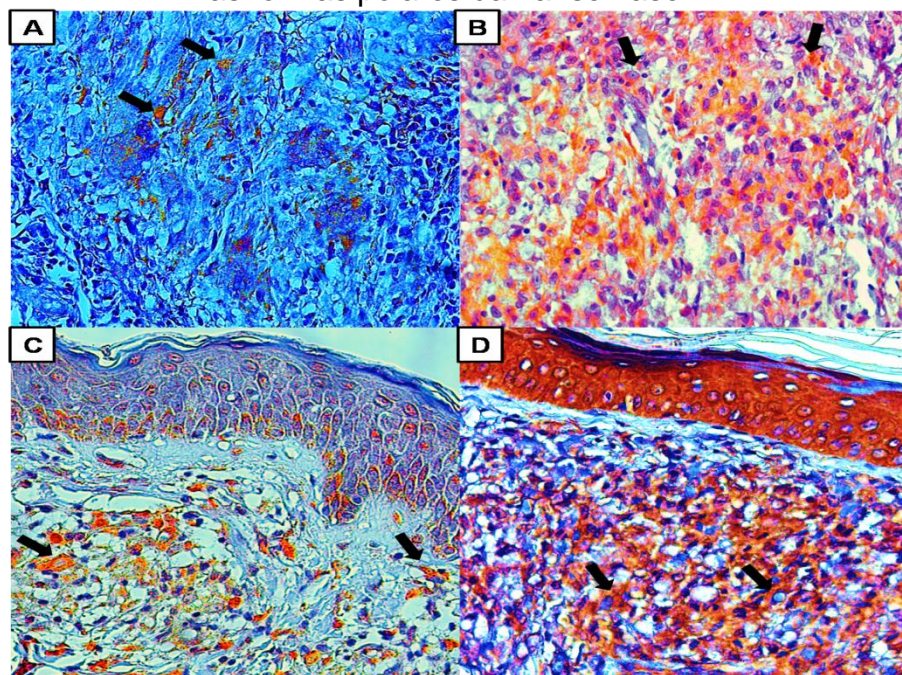


Figura 24: Imunoistoquímica positiva para o IL-10 (A:TT e B:VV) e IL-13 (C:TT e D:VV) em aumento de 400x nas formas polares da hanseníase.



5.2 Correlação linear entre os receptores, enzimas, fator de transcrição e citocinas nas formas polares da doença de hansen

Na investigação para as associações entre os marcadores, a tabela 3 e 4 mostram às diversas correlações lineares que foram estabelecidas entre CD68, CD163, as enzimas iNOS e arginase 1, o fator de transcrição e as citocinas tanto na forma TT quanto na forma VV doença.

Tabela 3: Correlação linear negativa e positiva entre os marcadores na forma TT da doença.

Correlação	<i>r</i> (Spearman)	<i>p</i> (valor)*
CD163 x IL-22	-0,3984	0,1132
iNOS x IL-13	-0,3472	0,1721
CD68 x iNOS	0,3386	0,1837
TGF- β x STAT 3	0,4124	0,1000
CD68 x STAT 3	0,4101	0,1021
IL-22 x STAT 3	0,4751	0,0540
IL-10 x IL-13	0,3419	0,1792
FGF b x IL-10	0,3173	0,2146
Arginase 1 x IL-22	0,3746	0,1384
FGF b x TGF- β	0,1673	0,5210
iNOS x IL-22	0,3230	0,2060
CD163 x Arginase 1	-0,2492	0,3347

*Correlação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 4: Correlação linear negativa e positiva entre os marcadores na forma VV da doença.

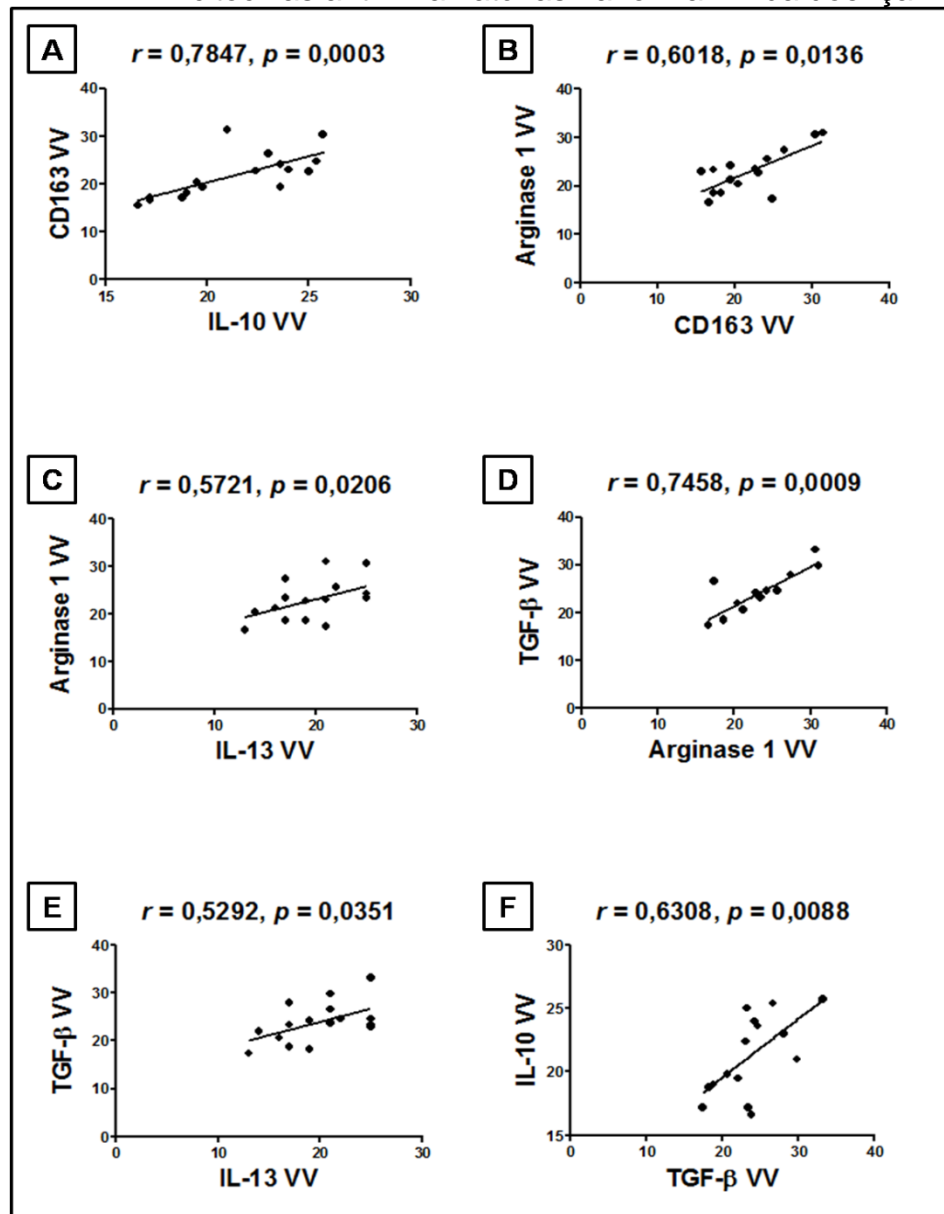
Correlação	<i>r</i> (Spearman)	<i>p</i> (valor)*
CD163 x IL-10	0,7847	0,0003***
TGF- β x CD163	0,7716	0,0005***
Arginase 1 x CD163	0,6018	0,0136*
Arginase 1 x IL-13	0,5721	0,0206*
Arginase 1 x TGF- β	0,7458	0,0009***
IL-13 x TGF- β	0,5292	0,0361*
IL-10 x TGF- β	0,6308	0,0088**
CD68 x IL-10	-0,4217	0,1037
iNOS x IL-10	-0,3929	0,1322
IL-10 x IL-22	-0,3170	0,2316
CD163 x iNOS	-0,4084	0,1163
CD68 x iNOS	0,5688	0,0215*
STAT3 x iNOS	0,5311	0,0343*
IL-22 x STAT3	0,5063	0,0454*
IL-22 x iNOS	0,6944	0,0028**

*Correlação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

5.2.1 Correlação linear entre o CD163, arginase 1 e as citocinas anti-inflamatórias na forma VV da doença

Referente às associações encontradas para os marcadores no pólo de suscetibilidade da doença, em lesões de pacientes VV pode-se observar a correlação positiva forte entre CD163 x IL-10 ($r = 0,7847$, $p = 0,0003$) (Figura 25A), moderada entre Arginase 1 x CD163 ($r = 0,6018$, $p = 0,0136$) (Figura 25B), Arginase 1 x IL-13, ($r = 0,5721$, $p = 0,0206$) (Figura 25C), forte entre Arginase 1 x TGF- β ($r = 0,7458$, $p = 0,0009$) (Figura 25D) e moderada entre IL-13 x TGF- β ($r = 0,5292$, $p = 0,0361$) (Figura 25E), IL-10 x TGF- β ($r = 0,6308$, $p = 0,0088$) (Figura 25F).

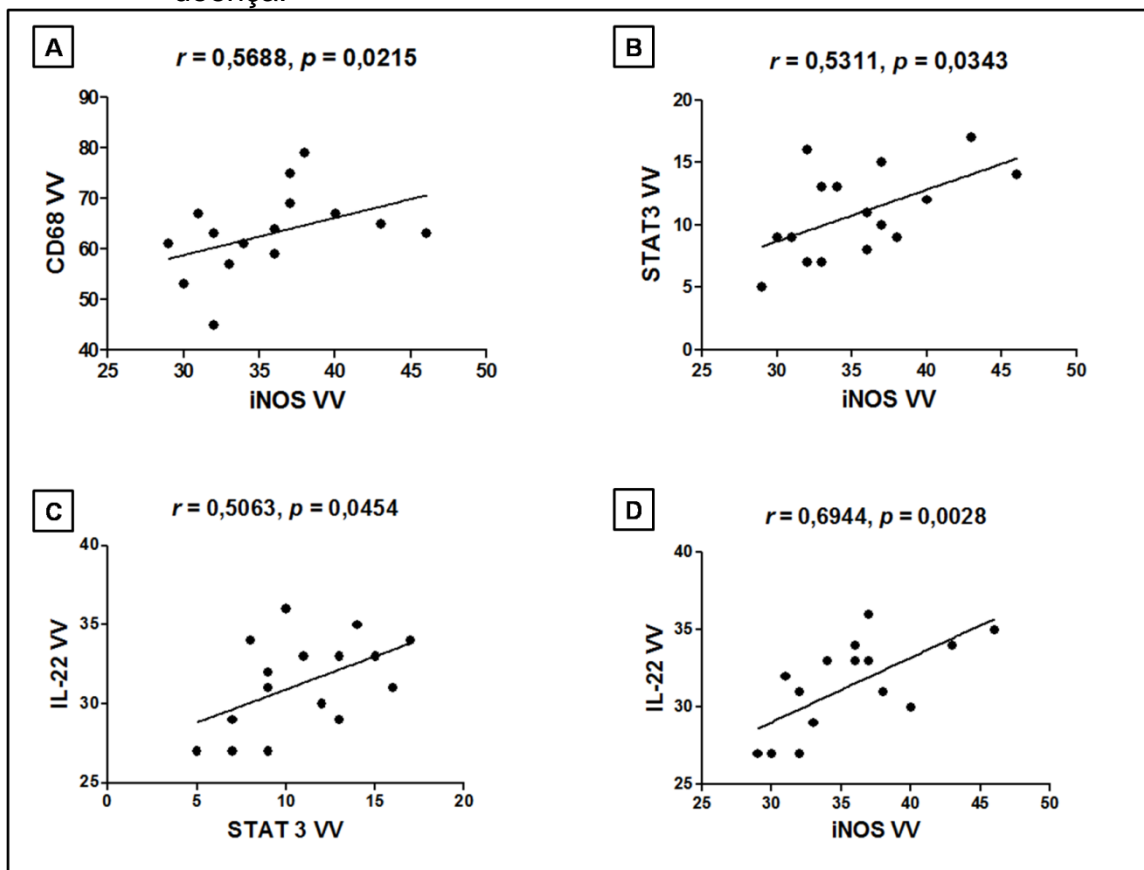
Figura 25: Correlação linear entre o CD163, Arginase 1 e as citocinas anti-inflamatórias na forma VV da doença.



5.2.2 Correlação linear entre CD68, IL-22, STAT3 e iNOS na forma VV da doença

Em relação ao comportamento da iNOS associada a outros marcadores no pólo VV, pode-se observar a correlação positiva moderada entre CD68 x iNOS ($r = 0,5688$, $p = 0,0215$) (Figura 26A), STAT3 x iNOS ($r = 0,5311$, $p = 0,0343$) (Figura 26B), IL-22 x STAT3 ($r = 0,5063$, $p = 0,0454$) (Figura 26C), IL-22 x iNOS ($r = 0,6944$, $p = 0,0028$) (Figura 26D).

Figura 26: Correlação linear entre CD68, IL-22, STAT3 e iNOS na forma VV da doença.



6 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença espectral na qual o bacilo provoca alteração no ambiente tecidual e modificações no curso da resposta imunológica no espectro da doença (FULCO et al., 2007; CARDOSO et al., 2011).

Os macrófagos são uma das principais células que participam da resposta contra o *M. leprae*, sofrendo processo de diferenciação, modificando seu comportamento e polarizando a resposta entre a via clássica composta pelos macrófagos M1 e mediadores pró-inflamatórios e a via alternativa conhecida como via reparadora tendo como personagem os macrófagos M2, seus subtipos e citocinas anti-inflamatórias (SICA; MANTOVANI, 2012; WANG et al., 2014).

Na doença de hansen, até o presente momento, poucos são os estudos descritos na literatura que abordaram os caminhos da polarização de resposta dos macrófagos no espectro da doença. Dessa forma, no intuito de compreender melhor o comportamento da célula nas formas polares da doença, investigou-se a resposta dos macrófagos M1 e M2 e suas possíveis implicações na doença de hansen.

No presente estudo, foi observado o aumento na expressão de CD68 em conjunto com CD163 em lesões de pacientes virchowianos. Em nossos achados, o aumento dos marcadores encontrava-se presente em lesões teciduais composta por infiltrado inflamatório formado por macrófagos com amplo citoplasma claro, por vezes dilatados, repletos de bacilos formando globias.

Na perspectiva de se entender o porquê da elevação dos marcadores na forma suscetível da doença, o CD68 tem sido utilizado como marcador clássico de superfície para identificar os macrófagos (VON BUBNOFF et al., 2007). Em um estudo que avaliou a atividade dos macrófagos no fenômeno da apoptose, além de ter sido observado o aumento do CD68 na forma virchowiana da doença, também foi verificado que a proteína consegue regular negativamente a expressão de caspase 3 tanto na forma VV quanto na TT (QUARESMA et al., 2010). Em outra abordagem, envolvendo o comportamento daIDO no pólo virchowiano, foi demonstrado que a presença do CD68 no pólo de suscetibilidade da doença poderia estar associada com a migração de macrófagos ativados para o foco infeccioso (SALES et al., 2011).

No que diz respeito ao aumento do CD163 no pólo virchowiano, a expressão do receptor, confirma a presença dos macrófagos M2, ao passo que diversos grupos de pesquisas têm relatado que o CD163 é um dos principais marcadores de

superfície utilizado para identificar subpopulações de macrófagos pertencentes à via alternativa (BUECHLER et al., 2013; THOMSEN et al., 2013; CARLI et al., 2015).

O CD163 é uma glicoproteína de membrana de 130 kDa que apresenta um único segmento transmembranar, uma calda citoplasmática curta, com 49 resíduos de aminoácidos. É considerada uma das moléculas que pertencem ao grupo da família dos receptores de “*scavenger*” que reconhece complexos de hemoglobina-hepatoglobina (THOMSEN et al., 2013; ETZERODT; MOESTRUP, 2013).

Na doença de hansen, uma das teorias que tem sido levantada é a de que a expressão do CD163 por parte dos macrófagos possa ser um ponto chave para o reconhecimento e porta de entrada do *M. leprae* na célula, no entanto, vale ressaltar que os mecanismos a respeito de como este processo pode acontecer precisam ser melhor esclarecidos (FABRIEK et al., 2009; MOURA et al., 2012). Outro ponto interessante a respeito da participação do receptor de “*scavenger*” na forma virchowiana da doença, remete ao fato de que estudos demonstraram que o aumento da expressão do receptor se correlaciona positivamente com a expressão da IDO, do CD209 e com a formação de mecanismos que levam ao desencadeamento da resposta anti-inflamatória e também com o aumento do estoque de ferro em vacúolos fagossomais, que contribuem para a viabilidade e a sobrevivência da micobactéria dentro dos macrófagos (ALCARAZ et al., 2003; MOURA et al., 2012).

Em nossa pesquisa, após investigarmos a atuação do CD68 e do CD163, o próximo passo do estudo foi procurar compreender o comportamento das enzimas iNOS e arginase 1 que norteiam a resposta dos macrófagos M1 e M2 respectivamente.

No caso da iNOS, foi observada a elevação da enzima na forma virchowiana da doença. Na doença de hansen, a iNOS, é um dos marcadores que tem gerado controversas acerca de sua resposta e a produção de mediadores que possam induzir a resposta microbicida (CHAN et al., 2001).

A iNOS é a enzima que compete com a arginase pela L-arginina que serve de substrato para induzir a produção de citrulina e conseqüentemente de NO, um dos principais produtos associados com a formação dos intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (GRAYFER et al., 2014; LOCKWOOD et al., 2015).

Na hanseníase, já foi mostrado o papel dicotômico da enzima no espectro da doença (GARAD et al., 2014). Em quadros de reação reversa, já foi demonstrado o

aumento da enzima em casos de pacientes *boderline boderline, boderline* virchowiano e virchowiano (SCHON et al., 2001). Outros estudos relataram que a iNOS, quando produz NO, pode induzir a formação de mecanismos que levam a produção de ferritina e o acúmulo de ferro na forma Fe^{3+} , favorecendo a sobrevivência do bacilo e a polarização para a resposta dos linfócitos de perfil Th2 (BARTON et al., 1999; GOULART; GOULART, 2009). No entanto, num estudo que avaliou a expressão de CD68, Slc11a1 e da iNOS em lesões de pacientes virchowianos, foi observado o aumento do CD68, Slc11a1 e da iNOS sendo que em grânulos citoplasmáticos e em macrófagos com vacúolos, foi observado a presença do Slc11a1 e o transporte do Fe^{2+} do citosol para o fagolisossomo para gerar radicais hidroxil com atividade microbicida (NAVARRO et al., 2015).

Ao estudarmos a participação da arginase 1 nas formas polares da doença, em nossos resultados, foi constatado o aumento quantitativo da enzima em lesões de pacientes na forma virchowiana. Em nossos achados, o aumento da arginase 1 sugere que a presença da enzima no meio pode influenciar de forma crucial a resposta dos macrófagos M2 no pólo de suscetibilidade pelo fato de que a arginase 1 é uma das principais enzimas que participam dos mecanismos de regeneração e reparação envolvendo dano tecidual (WYNN; BARRON, 2010; CALDWELL et al., 2015). No caminho da resposta tecidual, estudos têm demonstrado que a enzima compete de forma direta com a iNOS pela L-arginina que serve de substrato para formar poliaminas e a prolina, um aminoácido essencial que está envolvido na síntese de colágeno e na produção de fatores de crescimento (HESSE et al., 2001; DAS et al., 2010).

Em outra abordagem envolvendo a resposta microbicida da arginase 1 associada a ativação dos receptores TLR1 e 2, foi demonstrado que a enzima reduz a produção de iNOS e de radical livre favorecendo a sobrevivência do bacilo dentro dos fagócitos (HART; TAPPING, 2012).

Diante das modificações que as enzimas provocam no ambiente tecidual seja por conta da produção de metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio ou de aminoácidos que vão influenciar na produção de fatores de crescimento, a próxima etapa do estudo foi investigar a participação de resposta tanto do TGF- β quanto do FGF b.

Nas alterações que são provocadas no ambiente tecidual, o fato que pode explicar aumento dos marcadores em lesões de pacientes virchowianos, perpassa

pela resposta que os fatores de crescimento desencadeiam em lesões teciduais. Neste contexto, ambos podem regular a participação dos macrófagos M2a, M2b, M2c e de diferentes funções celulares que podem interferir no processo de cicatrização, migração, divisão celular, proliferação, diferenciação e formação do processo de angiogênese. Nesta forma clínica, por conta do bacilo provocar várias lesões teciduais, na tentativa diminuir o dano tecidual, os macrófagos mudam seu comportamento e induzem a resposta de reparo (MARTINEZ et al., 2008; PRESTA et al., 2009; BAKHSHAYESH et al., 2012; JETTEN et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015).

Ainda discutindo a resposta dos fatores de crescimento, em um estudo publicado recentemente foi mostrado que o FGF b, em uma nova abordagem pode funcionar como um imunomodulador na resposta contra patógenos intracelulares, melhorando a fagocitose, produção de citocinas e o metabolismo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos infectados (WANG et al., 2015).

No contexto da fagocitose dos macrófagos, o próximo passo do estudo foi procurar entender como a presença de fatores de transcrição e de citocinas que modulam a resposta do fagossomo com o lisossomo, influenciam a resposta microbicida dos macrófagos bem como a resposta tecidual.

Em nossos resultados, foi observado o aumento significativo da IL-22 em lesões de pacientes pertencentes ao grupo VV quando comparado ao TT. O fato que pode explicar essa elevação resulta da resposta que a citocina promove, sendo que um dos primeiros estudos envolvendo a relação da IL-22 na doença de hansen, foi demonstrado que nos macrófagos, a citocina pode mediar a resposta de fusão entre o fagossomo e o lisossomo em macrófagos infectados pelo bacilo, por conta da citocina regular o aumento da expressão de Rab7, Calgranulina A e diminuir os níveis de Rab14 (DHIMAN et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015).

Na resposta tecidual, a presença da IL-22 no pólo virchowiano, pode induzir a formação de mecanismos que levam a hiperplasia do tecido por conta da citocina regular a resposta de fatores de crescimento como dos FGF b, importante para a produção de queratinócitos, matriz extracelular e formação do processo de angiogênese (SILVEIRA et al., 2015).

Em uma nova abordagem em torno da resposta antimicrobiana da citocina contra patógenos intracelulares, um estudo demonstrou que a IL-22 inibiu o crescimento do *M. tuberculosis* em macrófagos infectados associada à resposta das

células NK e de citocinas como a IL-15 e a IL-23. Neste contexto, estes achados sinalizam para possibilidade de resposta que a IL-22 possa construir associada a outros tipos celulares e outras citocinas contra o *M. leprae* (DHIMAN et al., 2009).

Referente à presença do fator de transcrição, a STAT3 é um dos fatores de transcrição que possui múltiplas ações que podem regular diferentes funções celulares que partem desde a formação de mecanismos que levam a diferenciação, ativação de células T até a formação de memória (BHASIN et al., 2008; DEVARAJAN et al., 2009; ROTTENBERG; CAROW, 2014).

Por se tratar de um fator de transcrição que regula a produção de várias citocinas que participam da resposta pró ou anti-inflamatória, estudos relataram que STAT3 pode mudar o comportamento de diferenciação dos macrófagos M1 e M2 (SICA; MANTOVANI, 2012; BACKERT et al., 2014). Na literatura, já foi descrito que a STAT3 induz a produção de citocinas que tem ganhado destaque na resposta dos macrófagos como a IL-22 e de enzimas como a iNOS (WANG et al., 2009; JIANG et al., 2013).

No caminho da resposta antimicrobiana, já foi demonstrado que a IL-22 estimula a STAT3 a aumentar a produção de iNOS nos macrófagos e conseqüentemente de metabólitos reativos (MÜHL et al., 2011). No entanto, em quadros infecciosos provocados por patógenos intracelulares, como o *M. tuberculosis*, o fator de transcrição consegue induzir a formação de mecanismos que culminam com a expressão de IL-10, do *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) e com a sobrevivência do bacilo dentro dos macrófagos (ROTTENBERG; CAROW, 2014).

Em nossos achados, foi observado o aumento da expressão da STAT3 em lesões de pacientes VV. Na hanseníase, poucos são os estudos que relacionaram a presença do fator de transcrição nas formas polares da doença. Contudo, numa das abordagens que investigou a presença do fator de transcrição, foi observado o aumento da STAT3 em casos de hiperproliferação do epitélio bem como de hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme em lesões de pacientes virchowianos por conta da atuação dos macrófagos reparadores (FISCHER et al., 2012).

Sobre a elevação da IL-10 no pólo suscetível da doença, a resposta da citocina denota o caminho que a proteína segue na via anti-inflamatória sendo que a IL-10 é a principal citocina que inibe a ativação de macrófagos inflamatórios, expressão de MHC de classe II e a resposta de citocinas importantes para o

desencadeamento da resposta microbicida como TNF- α , IFN- γ e IL-12 (SIELING et al., 1993; RICHARDSON et al., 2015). Outra possibilidade de resposta da IL-10 na via alternativa no pólo virchowiano pode estar associada com a formação do processo de angiogênese por conta da resposta dos macrófagos M2a (MOSSER; EDWARDS, 2008; JETTEN et al., 2014).

Em relação a IL-13, no curso imunopatológico da doença, o aumento da expressão da citocina pode estar associada com a regulação da arginase 1, diferenciação, modificação fenotípica e ativação dos macrófagos M2 (LAWRENCE; NATOLI, 2011; MCWHORTER et al., 2013). Outras abordagens têm reforçado que a resposta da IL-13, também pode estar associada com a formação de imunocomplexos e no desenvolvimento da resposta dos linfócitos Th22 (SILVEIRA et al., 2015).

No intuito de compreender melhor o efeito do CD163, da arginase 1, ambos associados ao comportamento das citocinas anti-inflamatórias e dos fatores de crescimento, foram realizadas análises de correlação e em nossos resultados foi observada a correlação positiva forte e estatisticamente significativa entre o CD163 x IL-10 ($r = 0,7847$, $p = 0,0003$) o que demonstra que a IL-10 pode influenciar de forma direta o comportamento do receptor de “*scavenger*” na forma suscetível da doença. Neste contexto, estudos demonstraram que a IL-10 seria capaz de regular a expressão gênica do CD163 o que indica que a citocina pode ajudar a manter os níveis elevados do CD163 em macrófagos M2 no pólo virchowiano (BUECHLER et al., 2000; MOURA et al., 2012).

No efeito sinérgico observado entre a arginase 1 x CD163 ($r = 0,6018$, $p = 0,0136$), CD163 x TGF- β ($r = 0,7716$, $p = 0,0005$), arginase 1 x TGF- β ($r = 0,5721$, $p = 0,0206$) nas lesões de pacientes virchowianos, demonstra que nestas associações estabelecidas entre receptor, enzima e fator de crescimento podem influenciar a atividade dos macrófagos M2 interferindo no curso da resposta de supressão e de proliferação celular (GORDON, 2003; SHABO et al., 2008; VILAS-BOAS et al., 2010; BARROS et al., 2013).

Referente à associação encontrada para TGF- β x IL-13 ($r = 0,7458$, $p = 0,0009$) e arginase 1 x IL-13 ($r = 0,5292$, $p = 0,0361$), reforça o fato de que a atuação das citocinas em sinergismo pode interferir na resposta de reparo, ao passo que estudos tem demonstrado que tanto a IL-13 quanto o TGF- β e a arginase 1 quando associados, conseguem estimular a produção de fatores que influenciam no

remodelamento tecidual, na produção de colagenases e diferenciação de fibroblastos em lesões teciduais (PEARCE; MACDONALD, 2002; GORDON, 2003; WYNN; BARRON, 2010).

Na correlação moderada encontrada para IL-10 x TGF- β ($r = 0,6308$, $p = 0,0088$), na forma VV, demonstra que a relação existente entre as proteínas corroboram para o aumento da resposta supressora ao passo que os estudos reforçam que ambas as citocinas conseguem regular de forma negativa nos macrófagos a produção de mediadores inflamatórios como a iNOS, TNF- α e IFN- γ (VENTURINI et al., 2011; ATTIA et al., 2014) .

Ainda no caminho dos estudos de correlação linear, passando agora a retratar o comportamento da iNOS, em nossos resultados, a presença da enzima na forma virchowiana da doença caminha para a possibilidade de novas abordagens sendo que nesta nova interpretação, os nossos achados apontam para a resposta de associação existente entre CD68, IL-22, STAT3 e a iNOS sendo que a partir dos estudos de correlação, demonstrou-se a existência de sinergismo de resposta entre CD68 x iNOS ($r = 0,5688$, $p = 0,0215$), STAT3 x iNOS ($r = 0,5311$, $p = 0,0343$), IL-22 x STAT3 ($r = 0,5063$, $p = 0,0454$), IL-22 x iNOS ($r = 0,6944$, $p = 0,0028$) o que pode resultar num conjunto de respostas que interferem na formação de mecanismos de sinalização intracelular que culminam com a produção de mediadores pró-inflamatórios.

Diante desta nova relação, estes resultados corroboram com achados descritos na literatura em torno da resposta antimicrobiana da IL-22, sendo que no curso da resposta das células Th22, a citocina pode influenciar de forma direta o desencadeamento da resposta microbicida dos macrófagos M1, pelo fato de que a proteína pode induzir a formação de mecanismos que levam a ativação de fatores de transcrição como a STAT3, que induzem a produção de iNOS e consequentemente das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que provocam a destruição do micro-organismo (MÜHL et al., 2011). No entanto, mesmo com esta nova abordagem na doença de hansen, vale ressaltar que investigações mais aprofundadas precisam ser realizadas para ampliar o entendimento e trazer maiores esclarecimentos acerca dos mecanismos que podem ser desenvolvidos e quais outras relações podem ser estabelecidas com outras citocinas e outros fatores de transcrição na imunopatogênese da doença.

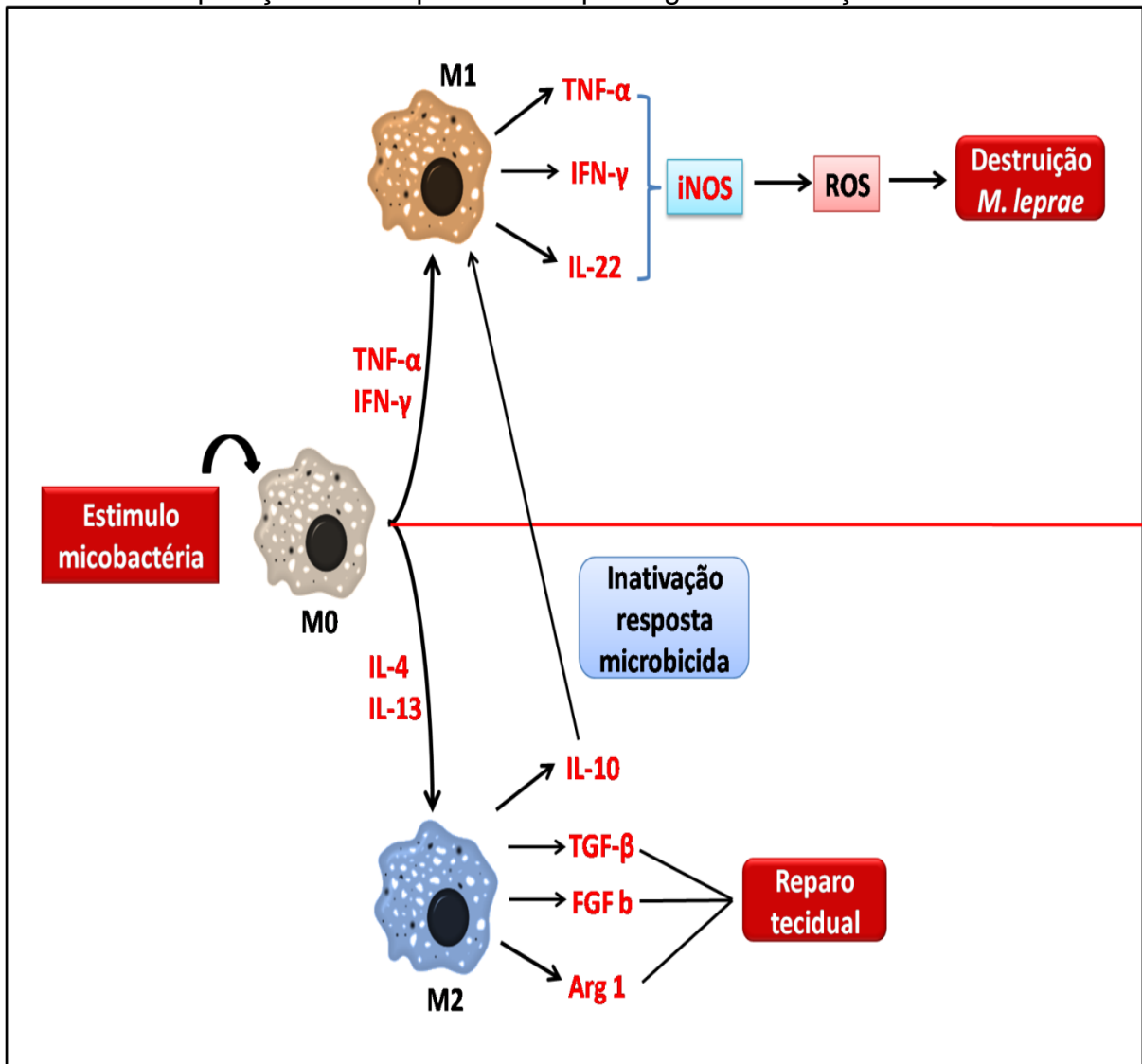
Por fim, com as novas abordagens obtidas com a realização deste estudo em torno dos caminhos da polarização de resposta dos macrófagos, novos questionamentos surgiram a respeito de como a célula pode mudar seu comportamento no espectro da doença. Em meio as indagações, uma pergunta surge no desfecho deste trabalho: *qual seria o possível papel dos macrófagos M1 e M2 na construção da resposta imunopatológica da doença de Hansen?*

Até então muitos estudos descritos na literatura reforçam isoladamente o papel dos Macrófagos M1 na resposta microbicida contra *M. leprae*. A partir dos nossos resultados e casando com as informações relatadas em vários artigos, nós propomos um modelo de entendimento com a montagem de um esquema que norteia os caminhos de polarização de resposta dos macrófagos M1 e M2 com a inserção de novos marcadores que tornam-se componentes chaves para se ampliar ainda mais a investigação de mudança de comportamento da célula no espectro da doença (Figura 27).

Na via clássica, os macrófagos M0 ao receberem determinado estímulo, seja por conta de determinados componentes presentes na parede do *M. leprae* ou pela presença de outros fatores imunológicos, mudam o seu comportamento e após sofrerem processo de diferenciação na presença de TNF- α e IFN- γ , formam os macrófagos M1, que por sua vez começam a produzir citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-22, estimulando a produção de iNOS e conseqüentemente de ROS levando a destruição do *M. leprae*.

No que diz respeito à montagem de resposta correspondente a via alternativa, os macrófagos M2 ao serem formados a partir do processo de diferenciação dos macrófagos M0, mudam o seu comportamento e passam a construir a resposta de inativação da resposta microbicida dos macrófagos M1, induzindo a produção de IL-10 e de reparo tecidual induzindo a produção de arginase 1, TGF- β e FGF b que trabalham em conjunto para diminuir o dano tecidual que é provocado no meio.

Figura 27: Esquema de construção da resposta dos macrófagos M1 e M2 e suas implicações na resposta imunopatológica da doença de hansen.



Fonte: Própria do autor.

8 CONCLUSÕES

- Em relação a expressão do CD68, o marcador mostrou-se aumentado na forma virchowiana da doença.
- Já o CD163, a elevação do receptor na forma virchowiana confirma a presença dos macrófagos M2.
- Sobre o comportamento das enzimas arginase 1 e iNOS, a expressão de ambas mostrou-se aumentada na forma virchowiana, mostrando que nesta forma clínica a arginase 1 pode participar da resposta de reparo e a iNOS de destruição do micro-organismo.
- Referente à resposta dos fatores de crescimento, tanto o TGF- β quanto o FGF b apresentaram-se com média elevadas na forma virchowiana, o que indica que ambos, assim como a arginase 1, participam do processo de regeneração e do reparo tecidual.
- No caso da STAT3, quantitativamente o fator de transcrição mostrou-se elevado na forma virchowiana sinalizando para uma nova abordagem em torno do papel microbicida dos macrófagos.
- Em torno da resposta das citocinas, a IL-22, o aumento da proteína na forma virchowiana amplia ainda mais o entendimento do comportamento da citocina na resposta dos macrófagos.
- No que diz respeito à participação da IL-10, o aumento das citocinas na forma virchowiana corrobora com o mecanismo de inativação de resposta dos macrófagos inflamatórios.
- A IL-13 mostrou-se estatisticamente significativa na forma virchowiana, onde o aumento da citocina na forma pode estar associada com a regulação da produção de arginase 1 bem como de modificação fenotípica do macrófago M2.
- Nos estudos de correlação, encontraram-se várias associações positivas estatisticamente significantes entre o CD68, CD163, as enzimas, a STAT3 e as citocinas na forma virchowiana da doença.

REFERÊNCIAS

AARÃO, T.L.S.; ESTEVES, N.R.; ESTEVES, N.; SOARES, L.P.; PINTO, D.D.A.S.; FUZII, H.T.; QUARESMA, J.A.S. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 66–72, 2014.

ABDALLAH, M.; ATTIA, E.A.; SAAD, A.A.; EL-KHATEEB, E. A.; LOTFI, R. A.; EL-SHENNAWY, D. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ T-regs cells. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 10, p. 742–747, 2014.

ACERVO DE PATOLOGIA CLÍNICA, UNICAMP, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/>> Acesso em: 24 de Novembro de 2015.

ADAMS, L.B.; KRAHENBUHL, J.L. Granulomas Induced by Mycobacterium leprae. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 9, n. 2, p. 220–32, 1996.

ALCAÏS, A.; MIRA, M.; CASANOVA, J.L.; SCHURR, E.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 1, p. 44–48, 2005.

ALCARAZ, M.J.; FERNÁNDEZ, P.; GUILLÉN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9 n. 30, p. 2541–2551, 2003.

ANTÔNIO, J.R.; SOUBHIA, R.M.; PASCHOAL VDEL, A.; AMARANTE, C.F.; TRAVOLO, A.R. Biological agents: investigation into leprosy and other infectious diseases before indication. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 6 Suppl 1, p. 23–5, 2013.

ASSEMBLY, W.H. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. v. 3, n. 36, p. 389–400, 2014.

ATTIA, E.A.; ABDALLAH, M.; EL-KHATEEB, E.; SAAD, A.A.; LOTFI, R.A.; ABDALLAH, M.; EL-SHENNAWY, D. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. **Archives Dermatology Research**, v. 306, n.9, p. 793–801, 2014.

BACKERT, I.; KORALOV, S.B.; WIRTZ, S.; KITOWSKI, V.; BILLMEIER, U.; MARTINI, E.; HOFMANN, K.; HILDNER, K.; WITTKOPF, N.; BRECHT, K.; WALDNER, M.; RAJEWSKY, K.; NEURATH, M.F.; BECKER, C.; NEUFERT C.

STAT3 activation in Th17 and Th22 cells controls IL-22-mediated epithelial host defense during infectious colitis. **Journal of Immunology**, v. 193, n.7, p. 3779-91, 2014.

BAHIA, N.I.; DAS, P.K.; FLUITER, K.; ROSA, P.S.; VREIJLING, J.; TROOST, D.; MORGAN, B.P.; BAAS, F.; RAMAGLIA, V. *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 5, p. 653–667, 2015.

BAKHSHAYESH, M.; SOLEIMANI, M.; MEHDIZADEH, M.; KATEBI, M. Effects of TGF- β and FGF b on the peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 138-42, 2012.

BARBAY, V.; HOUSSARI, M.; MEKKI, M.; BANQUET, S.; EDWARDS-LÉVY, F.; HENRY, J.P.; DUMESNIL, A.; ADRIOUCH, S.; THUILLEZ, C.; RICHARD, V.; BRAKENHIELM, E. Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. **Angiogenesis**, v. 18, n. 2, p. 191–200, 2015.

BARROS, M.H.; HAUCK, F.; DREYER, J.H.; KEMPKE, B.; NIEDOBITEK, G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS One**, v. 8, n.11, p. e80908, 2013.

BARTON, C.H.; BIGGS, T.E.; BAKER, S.T.; BOWEN, H.; ATKINSON, P.G.P. Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**, n. 66, p. 757–762, 1999.

BEHAR, S.M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H.G. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 668–674, 2010.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 2008.

BERRINGTON, W.R.; KUNWAR, C.B.; NEUPANE, K.; VAN DEN EEDEN, S.J.; VARY, J.R.; PETERSON, G.J.; WELLS, R.D.; GELUK, A.; HAGGE, D.A.; HAWN, T.R. Differential Dermal Expression of CCL17 and CCL18 in Tuberculoid and Lepromatous Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3263, 2014.

BHASIN, D.; CISEK, K.; PANDHARKAR, T.; REGAN, N.; LI, C.; PANDIT, B.; LIN, J.; LI, P.K. Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 391-5, 2008.

BOBOSHA, K.; WILSON, L.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; BEKELE, Y.; ZEWDIE, M.; VAN DER PLOEG-VAN SCHIP, J.J.; ABEBE, M.; HUSSEIN, J.; KHADGE, S.; NEUPANE, K.D.; HAGGE, D.A.; JORDANOVA, E.S.; ASEFFA, A.; OTTENHOFF, T.H.; GELUK, A. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2773, 2014.

BOHLSON, S.S.; O'CONNOR, S.D.; HULSEBUS, H.J.; HO M.M.; FRASER, D.A. Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–7, 2014.

BOTELHO, G.I.S.; AARÃO, T.L.S.; SOARES, L.P.M.A.; FUZII, H.T.; QUARESMA, J.A.S ; CARNEIRO, F.R.O. Imunorreatividade das células dendríticas nas lesões foveolares da hanseníase dimorfa. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 2, p. 19–25, 2013.

BRASIL, Ministério da saúde. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Leprologia. Rio de Janeiro, 1960.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Brasília, 2010.

BROICHHAUSEN, C.; RIQUELME, P.; GEISLER, E.K.; HUTCHINSON, J.A. Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 1, 2012.

BUECHLER, C.; RITTER, M.; ORSÓ, E.; LANGMANN, T.; KLUCKEN, J.; SCHMITZ, G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 1p. 97-103, 2000.

BUECHLER, C.; EISINGER, K.; KRAUTBAUER, S. Diagnostic and prognostic potential of the macrophage specific receptor CD163 in inflammatory diseases. **Inflammation Allergy Drug Targets**, v. 12, n. 6, P. 391-402, 2013.

BUELNA, M.M.; FAFUTIS-MORRIS, M.; TOVAR-CUEVAS, A.J.; ALVARADO-NAVARRO, A.; VALLE, Y.; PADILLA-GUTIERREZ, J.R.; MUÑOZ-VALLE, J.F.; FIGUERA-VILLANUEVA, L.E. Role of toll-interacting protein gene polymorphisms in

leprosy Mexican patients. **BioMed research international**, v. 2013, p. 459169, 2013.

BUHRER, S.; CUNHA, M.G.; FOSS, N.T.; OSKAM, L.; FABER, W.R.; KLATSER, P.R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, p. 317-326, 2001.

BUHRER. Use of MI Dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, n. 68, p. 456-63, 2000.

CALDWELL, R.B.; TOQUE, H.A.; NARAYANAN, S.P.; CALDWELL, R.W. Arginase: an old enzyme with new tricks. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 395-405, 2015.

CANTON, J.; NECULAI, D.; GRINSTEIN, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 9, p. 621–634, 2013.

CAO, Q.; HARRIS, D.C.H.; WANG, Y. Macrophages in Kidney Injury, Inflammation, and Fibrosis. **Physiology**, v. 30, n. 3, p. 183–194, 2015.

CARDOSO, C.C.; PEREIRA, A.C.; SALES, M.C.; MORAES, M.O. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 5, 533-49, 2011.

CARLI, M.L.; MIYAZAWA, M.; NONOGAKI, S.; SHIRATA, N.K.; OLIVEIRA, D.T.; PEREIRA, A.A.; HANEMANN, J.A. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. **Journal Oral Pathology Medical**, 2015 Jun 3. doi: 10.1111/jop.12333. [Epub ahead of print].

CHAN, E.D.; CHAN, J.; SCHLUGER, N.W. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 5, p. 606-12, 2012.

CHOW, A.; BROWN, B.D.; MERAD, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. **Nature reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 788–98, 2011.

COLIN, S.; CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. **Immunology Reviews**, v. 262, n. 1600-065X (Electronic), p. 153–166, 2014.

CORTELA, D.C.; JUNIOR, A.L.S.; VIRMOND, M.C.; IGNOTTI, E. Inflammatory Mediators of Leprosy Reactional Episodes and Dental Infections: A Systematic Review. **Hindawi**, v. 2015, 2015.

DAS, P.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000899, 2010.

DEVARAJAN, E.; HUANG, S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n.5, p. :626-33, 2009.

DHIMAN, R.; INDRAMOHAN, M.; BARNES, P.F.; NAYAK, R.C.; PAIDIPALLY, P.; RAO, L.V.; VANKAYALAPATI, R. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6639-45, 2009.

DHIMAN, R.; VENKATASUBRAMANIAN, S.; PAIDIPALLY, P.; BARNES, P.F.; TVINNEREIM, A.; VANKAYALAPATI, R. Interleukin 22 inhibits intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing calgranulin A expression. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 4, p. 578-87, 2014.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J.P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 117–128, 2010.

DUPNIK, K.M.; BAIR, T.B.; MAIA, A.O.; AMORIM, F.M.; COSTA, M.R.; KEESSEN, T.S.; VALVERDE, J.G.; QUEIROZ MDO, C.; MEDEIROS, L.L.; LUCENA N.L.; WILSON, M.E.; NOBRE, M.L.; JOHNSON, W.D.; JERONIMO, S.M. Transcriptional Changes That Characterize the Immune Reactions of Leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 10, p. 1658–1676, 2015.

DZIK, J.M. Evolutionary Roots of Arginase Expression and Regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. November, p. 1–11, 2014.

EICHELMANN, K.; GONZÁLEZ, S.E.G.; CAMPO-CANDIANI, J.C.S.J. Lepra : puesta al día . Definición , patogénesis , clasificación , diagnóstico y tratamiento. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 104, n. 7, p. 554–563, 2015.

ERBEL, C.; WOLF, A.; LASITSCHKA, F.; LINDEN, F.; DOMSCHKE, G.; AKHAVANPOOR, M.; DOESCH, A.O.; KATUS, H.A.; GLEISSNER, C.A. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. **International Journal of Cardiology**, v. 186, p. 219–225, 2015.

ETZERODT, A.; MOESTRUP, S.K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 17, p. 2352-63, 2013.

EXPERT, WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. n. 36, p. 461–476, 2015.

FABRIEK, B.O.; VAN BRUGGEN, R.; DENG, D.M.; LIGTENBERG, A.J.; NAZMI, K.; SCHORNAGEL, K.; VLOET, R.P.; DIJKSTRA, C.D.; VAN DEN BERG, T.K. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 887-92, 2009.

FISCHER, M.K.; MYER, K.A.; QUE, S.K.; HARRIS, J.A.; MARTINIUK, F.T.; MEEHAN, S.A.; LEVIS, W.R. Pseudoepitheliomatous hyperplasia and transepidermal elimination in lepromatous leprosy: does T-cell plasticity play a role? **Journal Drugs Dermatology**, v. 11, p. 1232-5, 2012.

FULCO, T.O.; ANDRADE, P.R.; BARBOSA, M.G.M.; PINTO, T.G.; FERREIRA, P.F.; FERREIRA, H.; NERY, J.A.C.; REAL, S.C.; BORGES, V.M.; MORAES, M.O.; SARNO, E.N.; SAMPAIO, E.P.; PINHEIRO, R.O. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3968–78, 2014.

FULCO, T.O.; LOPES, U.G.; SARNO, E.N.; SAMPAIO, E.P.; SALIBA, A.M. The proteasome function is required for Mycobacterium leprae-induced apoptosis and cytokine secretion. **Immunology Letters**, v. 110, n. 1, p. 82-5, 2013.

GALÃIN, C.L.; OLLEROS, M.L.; VESIN, D.; GARCIA, I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 5, p. 1–15, 2015.

GARAD, A.S.; SURYAKAR, A.N.; SHINDE, C.B. Study of nitric oxide synthesis and its oxidative effects on serum proteins in leprosy. **International Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 18-24, 2014.

GONÇALVES, A. Realities of leprosy control: updating scenarios. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, V.16, n.3, p. 611-21, 2013.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n.1, p. 23-35, 2003.

GOULART, L.R.; GOULART, I.M. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Archives of Dermatological Research**, v. 301, n.2, p. 123-37, 2009.

GRAYFER, L.; HODGKINSON, J.W.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. **Developmental Comparative Immunology**, v. 43, n.2, p. 223-42, 2014.

HAM, H.; SREELATHA, A.; ORTH, K. Manipulation of host membranes by bacterial effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 635–646, 2011.

HARDING, C.V.; BOOM, W.H. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 296–307, 2010.

HART, B.E.; TAPPING, R.I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 415-427, 2012.

HASTINGS, R.C.; OPROMOLLA, D.V.A. *Leprosy*. 2, New Orleans: Churchill Livingstone. p. 49-76, 1994.

HEDL, M.; ABRAHAM, C. A *TNFSF15* disease-risk polymorphism increases pattern-recognition receptor-induced signaling through caspase-8–induced IL-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 37, p. 13451–13456, 2014.

HERNANDEZ, M.O.; FULCO, T.O.; PINHEIRO, R.O.; PEREIRA, R.M.; REDNER, P.; SARNO, E.N.; LOPES, U.G.; SAMPAIO, E.P. Thalidomide modulates *Mycobacterium leprae*-induced NF- κ B pathway and lower cytokine response. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 272–279, 2011.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A.C.; SCHITO, M.; FUENTES, J.M.; CHEEVER, A.W.; PEARCE, E.J.; WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 6533–6544, 2001.

HRISTODOROV, D.; MLADENOV, R.; HUHN, M.; BARTH, S.; THEPEN, T. Macrophage-Targeted Therapy: CD64-Based Immunotoxins for Treatment of Chronic Inflammatory Diseases. **Toxins**, v. 4, n. 12, p. 676–694, 2012.

HUANG, J.; BRUMELL, J.H. Bacteria–autophagy interplay: a battle for survival. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 101–114, 2014.

HUANG, Z.; LUO, Q.; GUO, Y.; CHEN, J.; XIONG, G.; PENG, Y.; YE, J.; LI, J. Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0129744, 2015.

JETTEN, N.; VERBRUGGEN, S.; GIJBELS, M.J.; POST, M.J.; WINTHER, M.P.; DONNERS, M.M. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v.17, n. 1, p. 109-18, 2014.

JIANG, R.; WANG, H.; DENG, L.; HOU, J.; SHI, R.; YAO, M.; GAO, Y.; YAO, A.; WANG, X.; YU, L.; Sun, B. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. **BMC Cancer**, v. 13, p. 41-59, 2013.

KA, M.B.; DAUMAS, A.; TEXTORIS. J.; MEGE, J.L. Phenotypic Diversity and Emerging New Tools to Study Macrophage Activation in Bacterial Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 8, p. 1–7, 2014.

KONTTINEN, Y.T.; PAJARINEN, J.; TAKAKUBO, Y.; GALLO, J.; NICH, C.; TAKAGI, M.; GOODMAN, S.B. **Journal of long-term effects of medical implants**, v. 24, n. 4, p. 267–281, 2015.

KUMAR, S.; NAQVI, R.A.; ALI, R.; RANI, R.; KHANNA, N.; RAO, D.N. FoxP3 provides competitive fitness to CD4⁺ CD25⁺ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 2, p. 431–439, 2014.

KUMAR, S.; NAQVI, R.A.; BHAT, A.A.; RANI, R.; ALI, R.; AGNIHOTRI, A.; KHANNA, N.; RAO, D.N. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. **Immunobiology**, v. 218, n. 12, p. 1488–1496, 2013.

KUMAR, S.; NAQVI, R.A.; KHANNA, N.; PATHAK, P.; RAO, D.N. Th3 Immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- β , CTLA-4 and Cbl-b. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 133–142, 2011.

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J.J.; RUTSCHMAN, R.L.; MURRAY, P.J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 5, p. 2253–2263, 2002.

LASTÓRIA, J.C.; ABREU, M.A.M.M. etiopathogenic aspects – Part 1 *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.

LASTÓRIA, J.C.; ABREU, M.A.M.M. Hanseníase : diagnóstico e tratamento. **Revista diagnóstico tratamento**, v. 17, n. 4, p. 5–8, 2012.

LASTÓRIA, J.C.; ABREU, M.A.M.M. Leprosy: A review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 3, p. 389–401, 2014.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750–61, 2011.

LIEHL, P.; ZUZARTE-LUIS, V.; MOTA, M. M. Unveiling the pathogen behind the vacuole. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 589–598, 2015.

LIU, H.; IRWANTO, A.; FU, X.; YU, G.; YU, Y.; SUN, Y.; WANG, C.; WANG, Z.; OKADA, Y.; LOW, H.; LI, Y.; LIANY, H.; CHEN, M.; BAO, F.; LI, J.; YOU, J.; ZHANG, Q.; LIU, J.; CHU, T.; ANDIAPPAN, A.K.; WANG, N.; NIU, G.; LIU, D.; YU, X.; ZHANG, L.; TIAN, H.; ZHOU, G.; ROTZSCHKE, O.; CHEN, S.; ZHANG, X.; LIU, J.; ZHANG, F. Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. **Nature Genetics**, v. 47, n. 3, p. 267–271, 2015.

LIU, Y.C.; ZOU, X.B.; CHAI, Y.F.; YAO, Y.M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 520–529, 2014.

LOCKWOOD, D.N.; SUNEETHA, L.; SAGILI, K.D.; CHADUVULA, M.V.; MOHAMMED, I.; VAN BRAKEL, W.; SMITH, W.C.; NICHOLLS, P.; SUNEETHA, S. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e1327, 2015.

LONDON, A.; COHEN, M.; SCHWARTZ, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 1–10, 2013.

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

MAGOMBEDZE, G.; REDDY, P.B.; EDA, S.; GANUSOV, V.V. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. **Frontiers in physiology**, v. 4, n.8 p. 206, 2013.

MALYSHEV, I.; MALYSHEV, Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept : Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage (Switch) Phenotype. **Hindawi Publishing** v. 2015, 2015.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MARQUES, C.S.; BRITO, V.N.S.; GUERREIRO, L.T.; MARTINS, T.H.; AMARAL, E.P.; CARDOSO, C.C.; DIAS, I.M.B.; SILVA, W.L.; NERY, J.A.; MEDEIROS, P.; GIGLIOTTI, P.; CAMPANELLY, A.P.; VIRMOND, M.; SARNO, E.N.; MIRA, M.T.; LANA, F.C.; CAFFARENA, E.R.; PACHECO, A.G.; MORAES, M.O. Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 120–129, 2013.

MARTINEZ, F.O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, n. 3, p. 1–13, 2014.

MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers Bioscience**, v. 13, p. 453-61, 2008.

MASSONE, C.; BELACHEW, W.A.; SCHETTINI, A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 38–45, 2015.

MCKINNEY, J.D.; GOMEZ, J.E. Life on the inside for Mycobacterium tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 11, n.9, 2003.

MCWHORTER, F.Y.; WANG, T.; NGUYEN, P.; CHUNG, T.; LIU, W.F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17253-8, 2013.

MÈGE, J.L.; MEHRAJ, V.; CAPO, C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 3, p. 230–234, 2011.

MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 48–54, 2010.

MORAES, M.O.; CARDOSO, C.C.; VANDERBORGHT, P.R.; PACHECO, A.G. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, n.77, p.189-202, 2010.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOURA, D.F.; MATTOS, K.A.; AMADEU, T.P.; ANDRADE, P.R.; SALES, J.S.; SCHMITZ, V.; NERY, J.A.; PINHEIRO, R.O.; SARNO, E.N. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 11, p. 2925–2936, 2012.

MÜHL, H.; BACHMANN, M.; PFEILSCHIFTER, J. Inducible NO synthase and antibacterial host defence in times of Th17/Th22/T22 immunity. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 340-8, 2011.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–37, 2011.

MURRAY, P.J.; ALLEN, J.E.; BISWAS, S.K.; FISHER, E.A.; GILROY, D.W.; GOERDT, S.; GORDON, S.; HAMILTON, J.A.; IVASHKIV, L.B.; LAWRENCE, T.; MOSSER, D.M.; NATOLI, G.; SAEIJ, J.P.; SCHULTZE, J.L.; SHIREY, K.A.; SICA, A.; SUTTLES, J.; UDALOVA, I.; VAN GINDERACHTER, J.A.; VOGEL, S.N.; WYNN, T.A. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

NAVARRO, A.A.; FAFUTIS, M.; VARGAS, G.C.; TORRES, M.H.; SUÁREZ, A.P. Differential expression of solute carrier family 11a member 1 and inducible nitric oxide synthase 2 in skin biopsies from leprosy patients. **Indian Journal of Dermatology Venereology Leprology**, V. 81, n. 6, p. 594-9, 2015.

OBADIA, D.L.; VRADINO, G.; ALVES, M.F.G.S. Hanseníase: Correlação Clínico Histopatológica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, n. 65, 2011.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Expert Committe on Leprosy: Seventh Report. Geneva, 1998.

OUEDRAOGO, R.; DAUMAS, A.; GHICO E.; CAPO, C.; MEGE, J.L.; TEXTORIS, J. Whole-cell MALDI-TOF MS: A new tool to assess the multifaceted activation of macrophages. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 18, p. 5523–5532, 2012.

PAOLI, F.; STAELS, B.; CHINETTI-GBAGUIDI, G. Macrophage Phenotypes and Their Modulation in Atherosclerosis. **Circulation Journal**, v. 78, n. 8, p. 1775–1781, 2014.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 27, p. 499-511, 2002.

POLYCARPOU, A.; WALKER, S.L.; LOCKWOOD, D.N. New findings in the pathogenesis of leprosy and implications for the management of leprosy. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 413-9, 2013.

PONTILLO, A.; LAURENTINO, W.; CROVELLA, S.; PERREIRA, A.C. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 274–279, 2013.

PRESTA, M.; ANDRÉS, G.; LEALI, D.; DELL'ERA, P.; RONCA, R. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. **European Cytokine Network**. v. 20, n. 2, p. 39-50, 2009.

The Human Protein Atlas. Disponível em: <<http://www.Proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>> Acesso em: 24 de Novembro de 2015.

QUARESMA, J.A.S.; AARÃO, T.L.S.; SOUSA, J.R.; BOTELHO, B.S.; BARROS, L.F.; ARAUJO, R.S.; RODRIGUES, J.L.P.; PRUDENTE, D.L.; PINTO, D.S.; CARNEIRO, F.R.O.; FUZII, H. T-helper 17 cytokines expression in leprosy skin lesions. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 565–567, 2015.

QUARESMA, J.A.S.; ESTEVES, P.S.C.; AARÃO, T.L.S.; SOUSA, J.R.; PINTO, D.S.; FUZII, H.T. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 76, p. 84–88, 2014.

QUARESMA, J.A.S.; LIMA, L.W.; FUZII, H.T.; LIBONATI, R.M.F.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M.I.S. Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 4, p. 135–140, 2010.

QUARESMA, J.A.S.; ALMEIDA, F.A.; AARÃO, T.L.S.; MIRANDA SOARES, L.P.M.A.; NUNES, I.M.M.; FUZII, H.T.; LIBONATI R.M.F.; XAVIER, M.B.; PAGLIARI C.; DUARTE M.I.S. Transforming growth factor β and apoptosis in leprosy skin

lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the *Mycobacterium leprae* infection. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 9, p. 696–701, 2012.

RAZVI, E.S. Conference scene. **Regenerative medicine**, v. 6, n. 3, p. 295–297, 2011.

RICHARDSON, E.T.; SHUKLA, S.; SWEET, D.R.; WEARSCH, P.A.; TSICHLIS, P.N.; BOOM, W.H.; HARDING, C.V. Toll-like receptor 2-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells. **Infection and Immunity**, v. 83, n.6 p. 2242-54, 2015.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterium Disease**, v. 34 n. 3, p. 255-73, 1966.

ROGERS, N.M.; FERENBACH, D.A.; ISENBERG, J.S.; THOMSON, A.W.; HUGHES J. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 11, p. 625–643, 2014.

ROSENBERGER, C.M.; FINLAY, B.B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens, **Nature reviews**, v. 4, n. 5, 2003.

ROTTENBERG, M.E.; CAROW, B. SOCS3 and STAT3, major controllers of the outcome of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 518-32, 2014.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SALES, J.S.; LARA, F.A.; AMADEU, T.P.; FULCO, T.O.; NERY, J.A.C.; SAMPAIO, E.P.; PINHEIRO, R.O.; SARNO, E.N. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 165, n. 2, p. 251–263, 2011.

SANTOS, D.O.; MIRANDA A.; SUFFYS P.; RODRIGUES, C.R.; BOURGUIGNON, S.C.; CASTRO, H.C. Current Understanding of the Role of Dendritic Cells and Their Co-Stimulatory Molecules in Generating Efficient T Cell Responses in Lepromatous Leprosy. **Current Immunology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 77–85, 2007.

SCHON, T.; HERNANDEZ, R.; NEGESSE, Y.; LEEKASSA, R.; SUND VIST, T.; BRITTON, S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 5, p. 809-817, 2001.

SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL, J.L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L. The Continuing challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19 p.338-381, 2006.

SHABO, I.; STÅL, O.; OLSSON, H.; DORÉ, S.; SVANVIK, J. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. **International Journal Cancer**, v. 123, n. 4, p. 780-6, 2008.

SHI, C.; PAMER, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762–74, 2011.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-95, 2012.

SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111-4126, 2015.

SIELING, P.A.; ABRAMS, J.S.; YAMAMURA, M.; SALGAME, P.; BLOOM, B.R.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 12, p. 5501-10, 1993.

SILVEIRA, E.L.; SOUSA, J.R.; AARÃO T.L.S.; FUZII, H.T.; JUNIOR L.B.D.; CARNEIRO F.R.O.; QUARESMA, J.A.S. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: Role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 729–730, 2015.

SOUSA, J.R.; SILVA, P.Y.A.; SOARES, L.P.M.A. ; AARÃO, T.L.S.; PINTO, D.S.; FUZII, H.T.; QUARESMA, J.A.S. Imunoexpressão de TNF- α e TGF- β em lesões de pacientes nas diversas formas clínicas da hanseníase por meio da técnica de imunoistoquímica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 55, n. 91, p. 45–53, 2013.

SOUZA, C.S. Hanseníase : Formas Clínicas E Diagnóstico. **Revista de Medicina, Ribeirão Preto**, p. 325–334, 1997.

SOUZA, J.; SOUSA, J.R.; HIRAI, K.E.; SILVA, L.M.; FUZII, H.T.; JUNIOR, L.B.D.; CARNEIRO, F.R.O.; AARÃO, T.L.S.; QUARESMA, J.A.S. E-selectin and P-selectin expression in endothelium of leprosy skin lesions. **Acta Tropica**, v. 149, p. 227–231, 2015.

SURYADEVARA, N.C.; NEELA, V.S.; DEVALRAJU, K.P.; JAIN, S.; SIVASAI, K.S.; VALLURI, V.L.; JONNALAGADA, S.; ANANDARAJ, M.P. Influence of Intron II microsatellite polymorphism in human toll-like receptor 2 gene in leprosy. **Human Immunology**, v. 74, n. 8, p. 1034–1040, 2013

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G.O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26–37, 2015.

TELES, R.M.; GRAEBER, T.G.; KRUITZIK, S.R.; MONTOYA, D.; SCHENK, M.; LEE, D.J.; KOMISOPOULOU, E.; KELLY-SCUMBIA, K.; CHUN, R.; IYER, S.S.; SARNO, E.N.; REA, T.H.; HEWISON, M.; ADAMS, J.S.; POPPER, S.J.; RELMAN, D.A.; STENGER, S.; BLOOM, B.R.; CHENG, G.; MODLIN, R.L. Anti-Mycobacterial Responses. **Science**, n. 3, v. 339, p. 1448–1454, 2013.

THOMSEN, J.H.; ETZERODT, A.; SVENDSEN, P.; MOESTRUP, S.K. The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 523652, 2013.

TURNER, D.; MCGUINNESS, S.; LEDER, K. Leprosy: diagnosis and management in a developed setting. **Internal Medicine Journal**, v. 45, n. 1, p. 109–112, 2015.

VENTURINI, J.; SOARES, C.T.; BELONE, A. F.; BARRETO, J.A.; URA, S.; LAURIS, J.R.; VILANI-MORENO, F.R. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **Leprosy Reviews**, v. 82, n.1, p. 25-35, 2011.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B.A.; ZANETTE, A.M.; REIS, M.G.; BARRAL-NETTO, M. GONCALVES, M.S. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and

hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Annals of Hematology**, v. 89, n. 9, p. 877-82, 2010.

VIRMOND, M.; GRZYBOWSKI, A.; VIRMOND, L. Leprosy: A glossary. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 8–18, 2015.

VON BUBNOFF, D.; SCHELER, M.; WILMS, H.; WENZEL, J.; VON BUBNOFF, N.; HÄCKER, G.; SCHULTZE, J.; POPOV, A.; RACZ, P.; BIEBER, T.; WICKENHAUSER, C. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 4, p. 819-32, 2011.

WALKER, S.L.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 165–172, 2007.

WANG, J.; WANG, Z.; YAO, Y.; WU, J.; TANG, X.; GU, T.; LI, G. The fibroblast growth factor 2 arrests *Mycobacterium avium* sp. Paratuberculosis growth and immunomodulates host response in macrophages. **Tuberculosis**, v. 95, n. 4, p. 505-14, 2015.

WANG, L.; YI, T.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D.M.; ZENG, D.; YU, H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6–Stat3 signaling pathway. **Journal Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1457-64, 2009.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Frontiers Immunology**, v. 5, p. 614, 2014.

WHEAT, W.H.; CASALI, A.L.; THOMAS, V.; SPENCER, J.S.; LAHIRI, R.; WILLIAMS, P.J.; MCDONNELL, G.E.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; BRENNAN, P.J.; JACKSON, M. Long-term Survival and Virulence of *Mycobacterium leprae* in Amoebal Cysts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3405, 2014.

WINANDS, K.A.; CASTERMANS, T.M.; HOMMEN, M.P.; MEESTERS, D.M.; POEZE, M. Arginine and Citrulline and the Immune Response in Sepsis. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1426–1463, 2015.

WOBUDEYA, E.; LUKOYE, D.; LUBEGA, I.R.; MUGABE, F.; SEKADDE, M.; MUSOKE, P. Epidemiology of tuberculosis in children in Kampala district, Uganda, 2009 – 2010; a retrospective cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 15, p. 967, 2015.

WYNN, T.A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 245-57, 2010.

WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–55, 2013.

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

ZIESCHÉ, E.; BACHMANN, M.; KLEINERT, H.; PFEILSCHIFTER, J.; MÜHL, H. The interleukin 22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 16006-15, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: **POLARIZAÇÃO DE RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS E SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA DE HANSEN**

Estamos realizando uma pesquisa que objetiva estudar a POLARIZAÇÃO DE RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS E SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA DE HANSEN. Este projeto está inserido em outro maior onde serão utilizados blocos de parafina com amostras de biópsia de pele com diagnóstico confirmado através do laudo histopatológico de hanseníase. É garantida às pessoas e ao tutor responsável técnico do laboratório onde as amostras ficam armazenadas a liberdade de impedir que a amostra participe do estudo, sem qualquer prejuízo, além de ter o direito de se manter informado a respeito dos resultados parciais da pesquisa, para isto, a qualquer momento terão acesso aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento das dúvidas.

Responsável pela pesquisa: Jorge Rodrigues de Sousa
 End.: Av. Portugal, 337
 Celular: (91) 98300-2159 E-mail: krekrodrigues@gmail.com

Responsável pela pesquisa: Juarez Antônio Simões Quaresma
 End.: Tv. Perebeui, 2623, Bairro: Marco, Belém – PA.
 Celular: (91) 98125-8200 E-mail: juarez.quaresma@gmail.com

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Concordando voluntariamente em participar desse estudo podendo retirar meu consentimento a qualquer momento, sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ser adquirido.

Belém,.....dede 2014.

Nome:

Endereço:

Telefone:

Celular:

E-mail:

APÊNDICE B PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

AMOSTRA: _____
NOME DO PACIENTE: _____
DATA DE NASCIMENTO: ____/____/_____
REGISTRO DE PRONTUÁRIO: _____
BLOCO: _____
PROCEDÊNCIA DO PACIENTE: _____
FORMA CLÍNICA: _____
NÚMERO DE LESÕES: _____
LOCAL DAS LESÕES: _____

BACILOSCOPIA: _____
CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL: () PAUCIBACILAR
() MULTIBACILAR
OBSERVAÇÕES CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICAS:

ANEXOS

ANEXO I PARECER E APROVAÇÃO DO PROJETO

CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Imunoexpressão de macrófagos M1 e M2 nas formas clínicas de hanseníase através da técnica imunohistoquímica.

Pesquisador: Juarez Antônio Simões Quaresma

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39696614.1.0000.5168

Instituição Proponente: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Campus XII/UEPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 907.948

Data da Relatoria: 09/12/2014

CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA



Continuação do Parecer: 907.948

para a dispensa de TCLE.

Recomendações:

Retirar alguns dos critérios de exclusão do estudo: aqueles que são meramente uma oposição dos critérios de inclusão.

Rever todos tempos verbais da metodologia do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto viável para sua aplicação imediata.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Pesquisador deverá anexar os relatórios parcial e final do estudo na plataforma Brasil.

SANTAREM, 10 de Dezembro de 2014

Assinado por:

Maria Goreth Silva Ferreira

(Coordenador)

Prof.ª Dra. Maria Goreth Silva Ferreira

Coord. CEP/UEPA Campus XII/STM

Portaria n.º 073/12

ANEXO II PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA

DESPARAFINIZAÇÃO

As lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60°C, por 12 horas. Posteriormente, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol I e II (20 e 10 minutos respectivamente).

HIDRATAÇÃO DOS CORTES

Para a hidratação, as lâminas foram imersas em álcool etílico absoluto I e II (5 e 2 minutos respectivamente); álcool etílico 90%,80% e 70%, permanecendo 2 minutos em cada passagem. No final as lâminas foram lavadas com a água destilada e PBS 1x (Tampão fosfato salino) por 5 minutos em cada.

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA

Referente ao bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas em uma solução contendo peróxido de hidrogênio a 3% e passaram por três incubações de 15 minutos cada. Após cada incubação a solução foi descartada e as lâminas foram lavadas com água destilada e PBS 1x por 5 minutos em cada.

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

O resgate antigênico foi realizado com tampão citrato pH 6 a 95 °C em Câmara de Pascal, por 20 minutos. Após esse período as lâminas foram imersas em água destilada e PBS 1x por 5 minutos em cada.

BLOQUEIO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS

Para diminuir as ligações inespecíficas (“background”), os cortes foram tratados com leite desnatado concentrado a 10% diluído em água destilada por 30 minutos.

INCUBAÇÃO COM ANTICORPO PRIMÁRIO

Para a investigação dos marcadores, os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários diluídos em BSA 1% e foram mantidos em câmara úmida por 12-14 horas (“overnigth”).

INCUBAÇÃO COM ANTICORPO SECUNDÁRIO BIOTINILADO ESPECÍFICO

Terminado o intervalo da incubação dos anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS e tratados com anticorpo secundário biotinilado (sistema LSAB DakoCytomation®) por 30 minutos e mantidos em câmara úmida a 35 °C. Logo após foram lavados em PBS e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase (LSAB DakoCytomation®) por mais 30 minutos em câmara úmida a 35 °C.

REVELAÇÃO COM SUBSTRATO CROMOGÊNICO

As lâminas foram reveladas DAB+ (*3,3'-diaminobenzidine*) (DakoCytomation®), seguindo recomendações do fabricante;

CONTRA COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA

As lâminas foram mergulhadas em Hematoxilina de Harris por 2 minutos e posteriormente lavados em água destilada por 5 minutos.

DESIDRATAÇÃO

Finalizando a bateria, os cortes histológicos foram desidratados em álcool etílico em concentrações de 70%, 80%, 90% e absoluta todas seguindo o tempo de 2 minutos em cada imersão e de 5 minutos em xilol.

MONTAGEM DAS LÂMINAS

A montagem das lâminas foi feita com lamínulas e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co. Saint Louis, USA).

ANEXO III ARTIGO ACEITO E PUBLICADO