



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

KÉLVIA MIRANDA SÁ

IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE LINFÓCITOS *NATURAL KILLER*
(NK), CD16⁺ E CD56⁺, EM BIÓPSIAS CUTÂNEAS DE PACIENTES COM
HANSENÍASE

FORTALEZA

2015

KÉLVIA MIRANDA SÁ

**IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE LINFÓCITOS *NATURAL KILLER*
(NK), CD16⁺ E CD56⁺, EM BIÓPSIAS CUTÂNEAS DE PACIENTES COM
HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Orientador: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S112i Sá, Kélvia Miranda.
Imunoexpressão de marcadores de linfócitos *natural killer* (NK), CD16⁺ e CD56⁺, em biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase./ Kélvia Miranda Sá. – 2015.
87 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Medicina II.
Orientação: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas.
Co-Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.

1. Hanseníase. 2. Células Matadoras Naturais. 3. Imuno-Histoquímica. I. Título.

CDD 616.998

KÉLVIA MIRANDA SÁ

**IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES DE LINFÓCITOS *NATURAL KILLER*
(NK), CD16⁺ E CD56⁺, EM BIÓPSIAS CUTÂNEAS DE PACIENTES COM
HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Aprovada em: 22 / 09 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Maria Jânia Teixeira (membro)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu (membro)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Prof. Dr. Heitor de Sá Gonçalves (membro)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Primeiramente a Deus, que permitiu a realização desse sonho.

Aos meus pais, meus primeiros educadores.

Ao meu marido, pelo incentivo, pela sua confiança e companheirismo.

Aos meus filhos, que me permitem diariamente redescobrir a alegria de viver.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas e ao Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, pela orientação, dedicação e paciência.

Aos professores participantes da banca examinadora da qualificação e defesa pelo tempo e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz pela sua contribuição, principalmente nas avaliações estatísticas.

À Coordenação do Mestrado em Patologia, pela acolhida e apoio, em especial à Valéria Cordeiro e à Paula Palácio.

Aos professores do Mestrado, responsáveis pela construção do saber.

À Susana Moreira de Souza, do Laboratório de Técnicas Cito-histopatológicas Especiais (LABTECH) pela grande contribuição técnica, pela disponibilidade de tempo e pela sua amizade.

Aos profissionais do Centro de Dermatologia D. Libânia (CDerm) que contribuíram para a construção deste trabalho, em especial à técnica Margarida Silva.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas, em especial a Naya Rodrigues, Livia Coelho, Neli Feitosa e Brunheld Dutra.

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

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.” (Roger Von Oech)

RESUMO

A resposta imunológica ao *Mycobacterium leprae* é componente determinante na evolução da doença. As células Natural Killer (NK) são constituintes importantes da resposta imune inata, podendo participar da ativação da resposta adaptativa. Este estudo objetivou avaliar a imunoexpressão de marcadores de células NK, CD16⁺ e CD56⁺, em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase antes do tratamento, por imunistoquímica. Foram analisadas 54 biópsias cutâneas de lesões de paciente com hanseníase. Sendo 19 casos da forma clínica tuberculóide (TT), 14 da forma *borderline* (BT, BB e BL) e 20 da forma lepromatosa (LL) e 1 caso da forma clínica indeterminada (I). Destes pacientes 31 (57,4%) eram do gênero masculino, 30 (55,5%) eram baciloscopia positiva. As amostras foram provenientes do Centro de Dermatologia Dona Libânia e analisadas no Laboratório de Técnicas Cito-histopatológicas Especiais do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Para a imunistoquímica foram utilizados os anticorpos monoclonais primários: *rabbit anti-human CD16a (clone SP189)* da *Spring Bioscience*® e o *mouse anti-human CD56 (clone 123C3)* da *Dako*®, juntamente com o kit *Envision Flex* da *Dako*®. Os controles positivos para CD16 e CD56 foram obtidos a partir de secções de tecidos de pulmões e tumor carcinóide, respectivamente. Os testes de Fisher, Qui-quadrado, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para análise estatística, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$. A comparação entre a imunoexpressão de CD16⁺ em linfócitos teciduais da forma tuberculóide em relação às formas *borderlines* apresentou diferenças estatísticas significantes ($p=0,0329$), como também em relação ao gênero ($p=0,0129$). Através do teste Kruskal-Wallis, comparando os três grupos das formas clínicas da doença em relação ao número de células imunomarcadas com CD16⁺, foi observado que a mediana do grupo tuberculóide foi maior, conferindo $p=0,0085$. Pode-se concluir que o estudo sugere que uma resposta imunológica protetora na hanseníase requer um equilíbrio entre subgrupos de células NK CD16⁺ e CD56⁺, e que a forma tuberculóide cursa com predomínio dessas células NK citotóxicas quando comparadas às formas *borderline* e lepromatosas. Em adição, o estudo sugere que há possíveis influências hormonais ou genéticas na distribuição destes marcadores de função de células NK.

Palavras-chave: Células *Natural Killer*. Imuno-Histoquímica. Hanseníase.

ABSTRACT

Immune response to *M leprae* is determinant to leprosy evolution and NK cells are important constituents of the innate immune response and can contribute to the adaptive response activation. The aim of this study was to evaluate the immunoexpression of NK cells markers CD16⁺ and CD56⁺ in skin lesions of patients with leprosy, before any treatment. A total of 54 skin biopsies of patients with leprosy were evaluated by immunohistochemistry using rabbit anti-human CD16a (clone SP189) from *Spring Bioscience*® and mouse anti-human CD56 (clone 123C3) from *Dako*®, together with Envision Flex kit from *Dako*®. Nineteen cases were from tuberculoid (TT) clinical form, 14 were borderline (BT, BB, BL) and 20 were lepromatous (LL), while one case was from indeterminate form (I). Among them 31 (57,4%) were from male gender and 30 (55,5%) presented positive bacilloscopy. The samples were collected at the “Centro de Dermatologia Dona Libânia” in Fortaleza, Ceará, Brazil, and were analysed at the “Laboratório de Técnicas Cito-histopatológicas Especiais do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará”. Positive controls for the CD16 and CD56 expression were lung tissue and carcinoid tumor, respectively. Fisher, Chi-square, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to statistical analysis and a p value of <0.05 was considered significant. Differences were observed when expression of CD16⁺ cells was compared between tuberculoid and borderlines forms (p=0.0329), as also among gender comparisons (p=0.0129). The CD16⁺ cells in the three different clinical forms groups were also statistically different achieving a p value of 0.0085, and showing a higher median of expression of CD16⁺ in the TT group. These data suggests that a protective immune response against *M. leprae* in leprosy requires a balance between NK cells subgroups (CD16⁺ and CD56⁺) and that the tuberculoid form presents higher levels of CD16⁺ cells expression when compared to borderlines and LL forms. In addition, the study suggests that there are possible hormonal or genetic influences on the distribution of NK cell function markers.

Keywords: Natural Killers Cells; Immunohistochemistry; Leprosy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espectro imunopatológico da hanseníase.....	19
Figura 2 – Características imunológicas do espectro da hanseníase.....	25
Figura 3 – Representação esquemática do desenvolvimento e diferenciação terminal de célula NK humana.....	32
Figura 4 – Classificação das células <i>natural killer</i> (NK).....	34
Figura 5 – Fotos do aparelho <i>Dako® PT Link</i>	45
Figura 6 – Gráfico de Recuperação Antigênica - <i>Dako® PT Link</i>	45
Figura 7– Fotos das lâminas de imunistoquímica dos controles positivos e negativos para imunoexpressão de CD16 ⁺ e CD56 ⁺ , em tecidos pulmonar e tumor carcinóide respectivamente.....	48
Figura 8 – Microscópio AXIO Scope A1 Zeiss®	49
Figura 9 – Representação da população quanto ao gênero.....	51
Figura 10– Representação da distribuição do gênero da população em estudo em relação à faixa etária.....	51
Figura 11– Representação da distribuição do gênero da população em estudo em relação às formas clínicas.....	52
Figura 12– Imunoistoquímica para CD16 em lesão do grupo TT.....	53
Figura 13– Imunoistoquímica para CD16 em lesão do grupo <i>borderline</i>	53
Figura 14– Imunoistoquímica para CD56 em lesão do grupo TT.....	54
Figura 15– Imunoistoquímica para CD56 em lesão do grupo LL.....	54
Figura 16– Gráfico representando a imunoexpressão de CD16 ⁺ entre os gêneros masculino e feminino.....	57
Figura 17– Gráfico representando a imunoexpressão de CD16 ⁺ entre os resultados baciloscópicos positivos e negativos.....	57
Figura 18– Gráfico representando a imunoexpressão de CD16 ⁺ entre as formas clínicas.....	58
Figura 19– Gráfico representando a mediana do número de células CD16 ⁺ nas três formas clínicas estudadas.....	59
Figura 20– Gráfico representando a mediana do número de células CD16 ⁺ nas formas clínicas operacionais.....	59

Figura 21– Gráfico representando a imunexpressão de CD56 ⁺ entre os gêneros masculino e feminino.....	62
Figura 22– Gráfico representando a imunexpressão de CD56 ⁺ entre os resultados baciloscópicos positivos e negativos.....	62
Figura 23– Gráfico representando a imunexpressão de CD56 ⁺ entre as formas clínicas.....	63
Figura 24– Gráfico representando a mediana do número de células CD56 ⁺ nas três formas clínicas estudadas.....	64
Figura 25– Gráfico representando a mediana do número de células CD56 ⁺ nas formas clínicas operacionais.....	64
Quadro 1– Informações sobre os anticorpos e sua metodologia de incubação.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correlação da expressão qualitativa de CD16 ⁺ em biópsias teciduais de pacientes hansênicos com dados demográficos e parâmetros clínico-patológicos.....	56
Tabela 2 – Correlação da expressão qualitativa de CD56 ⁺ em biópsias teciduais de pacientes hansênicos com dados demográficos e parâmetros clínico-patológicos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
B	<i>Borderline</i>
BAAR	Bacilos álcool ácido resistente
BB	Entre as duas formas, dimorfa, do inglês: “ <i>borderline-borderline</i> ”
BL	Forma Dimorfa-lepromatosa ou dimorfa-virchowiana, do inglês: “ <i>borderline-lepromatosa</i> ”.
BM	Medula óssea, do inglês: “bone marrow”
BT	Forma Dimorfa-tuberculoide, do inglês: “ <i>borderline-tuberculóide</i> ”
CDerm	Centro de Dermatologia D. Libânia
CD3⁺	Linfócito T totais, do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 3
CD4⁺	Linfócito T auxiliar, do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 4
CD8⁺	Linfócito T citotóxico, do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 8
CD 16⁺	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 16
CD 16^{bright}	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 16 de forte expressão
CD 16^{dim}	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 16 de fraca expressão
CD 19⁺	Linfócito B, do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 19
CD 45⁺	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 45
CD 56⁺	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 56
CD 56^{bright}	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 56 de forte expressão
CD 56^{dim}	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 56 de fraca expressão
CD 57	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 57
CD62 L	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 62 (L-selectina)
CD 94	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 94
CD95	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 95, denominado receptor FAS
CD117	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 117
CD244	Do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 244
CLP	Progenitor linfóide comum
CMI	Imunidade mediada por células
CR1	Fragmentos do complemento 1
CR3	Fragmentos do complemento 3
CR4	Fragmentos do complemento 4

D	Dimorfa
DAF12	Gen, do inglês:"abnormal Dauer Formation"
DCs	Células dendríticas do inglês: " <i>dendritic cells</i> "
DL	Domínio grande ou cauda grande, do inglês: " <i>domain large</i> "
DNAM-1	Glicoproteína transmembrana de linfócito T, do inglês:" DNAX accessory molecule-1"
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
DRR	Dimorfa com reação reversa
DS	Domínios curtos, do inglês:" <i>domain short</i> "
EL	Extra-lesão
ENL	Eritema nodoso hansênico, do inglês: " <i>Erythema nodosum leprosum</i> "
FAMED	Faculdade de Medicina
Fc	Fragmento Fc da imunoglobulina
FCγRIII	Receptor para a porção Fc de imunoglobulina
Foxp3	Do inglês: " <i>Forkhead box P3</i> "
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida humana
HLA-E	Do inglês: "class I histocompatibility antigen, alpha chain E"
I	Forma indeterminada
IB	Índice baciloscópio
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IL	Intra-lesão
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18

ILC	Células linfóides inatas, do inglês: “innate lymphoid cells”
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetase induzível, do inglês: “ <i>inducible nitric oxide synthase</i> ”
ITAM	Do inglês: “ <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> ”
ITIM	Do inglês: “ <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> ”
KIR	Receptores de células natural killer, do inglês: “ <i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i> ”
KLRG1	Células NK de memória
LABTECH	Laboratório de Técnicas Cito-histopatológicas Especiais
LAC	Citotoxicidade induzida
LAM	Lipoarabinomanano
LL	Forma lepromatosa, virchowiana
LT α	Linfotoxina α
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1 α , do inglês “ <i>monocytes chemoattractive protein 1 α</i> ”
MDT	Multidrogaterapia
MHC I	Complexo maior de histocompatibilidade, classe 1 do inglês: “ <i>major histocompatibility complex class I</i> ”
MHC II	Complexo maior de histocompatibilidade, classe 2 do inglês: “ <i>major histocompatibility complex class II</i> ”
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MMP-II	Proteína principal de membrana II
NCR	Receptores com citotoxicidade natural
NK	Linfócitos <i>natural killer</i>
NKT	Linfócitos T <i>natural killer</i>
NKG2A	Receptores de lectina do tipo C (subtipo A)
NKG2C	Receptores de lectina do tipo C (subtipo C)
NKG2D	Receptores de lectina do tipo C (subtipo D)
NKG2E	Receptores de lectina do tipo C (subtipo E)
NKG2H	Receptores de lectina do tipo C (subtipo H)
NKp46	Receptores da família NCR
NKp30	Receptores da família NCR
NL	Hanseníase nodular

NOD2	Domínio de oligomerização ligado a nucleotídeos 2 (receptor citoplasmático)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês: " <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> "
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
SLO	Órgãos linfóide secundários, do inglês: "secondary lymphoid organs"
TCR	Receptor de célula T , do inglês: " <i>T-cell receptor</i> "
Th	Linfócitos T auxiliares, do inglês: " <i>T helper</i> "
Th0	Linfócitos T auxiliares 0, do inglês: " <i>T helper 0</i> "
Th1	Linfócitos T auxiliares 1, do inglês: " <i>T helper 1</i> "
Th2	Linfócitos T auxiliares 2, do inglês: " <i>T helper 2</i> "
Th3	Linfócitos T auxiliares 3, do inglês: " <i>T helper 3</i> "
Th17	Linfócitos T auxiliares 17, do inglês: " <i>T helper 17</i> "
TGF- β1	Fator transformador de crescimento, do inglês: " <i>transforming growth factor- beta 1</i> "
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α , do inglês: " <i>Tumor necrosis factor- α</i> "
TNF- β1	Fator de necrose tumoral- β 1, do inglês: " <i>Tumor necrosis factor- β1</i> "
TLR	Do inglês: receptores " <i>Toll-like receptors</i> ".
TLR1	Heterodímeros de receptores " <i>Toll-like receptors</i> " 1
TLR2	Heterodímeros de receptores " <i>Toll-like receptors</i> " 2
TLR4	Heterodímeros de receptores " <i>Toll-like receptors</i> " 4
TLR6	Heterodímeros de receptores " <i>Toll-like receptors</i> " 6
TLR8	Heterodímeros de receptores " <i>Toll-like receptors</i> " 8
TLR9	Heterodímeros de receptores " <i>Toll-like receptors</i> " 9
TT	Forma tuberculoide
UFC	Universidade Federal do Ceará
VV	Forma virchowiana, lepromatosa.

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Mícrometro
KDa	Quilodalton
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
μm	Micrómetro
pH	Potencial hidrogeniônico
cm	Centímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Breve histórico	15
2.2	Agente etiológico.....	15
2.3	Formas clínicas.....	16
2.4	Histopatologia das lesões.....	17
2.5	Imunopatologia da hanseníase.....	19
2.5.1	A imunidade inata na hanseníase.....	20
2.5.2	A imunidade adquirida na hanseníase.....	24
2.6	Linfócitos Natural Killer (NK).....	28
2.6.1	Tipos de linfócitos NK.....	30
2.6.2	Receptores de linfócitos NK.....	35
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivos Gerais.....	40
4.2	Objetivos Específicos.....	40
5	MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1	Desenho do estudo.....	41
5.2	Aspectos éticos.....	41
5.3	Local do estudo.....	41
5.4	Seleção dos pacientes.....	41
5.4.1	Critérios de inclusão.....	42
5.4.2	Critérios de exclusão.....	42
5.5	Métodos.....	42
5.5.1	Histologia.....	42
5.5.2	Imunoistoquímica.....	43
5.5.2.1	Padronização da técnica.....	43
5.5.2.2	Técnica de imunoistoquímica.....	44
5.5.2.3	Controles.....	48
5.5.2.4	Avaliação individual e entre observadores.....	49
5.5.3	Baciloscopia.....	49
5.6	Avaliação quantitativa.....	49

5.7	Análise estatística.....	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Caracterização da amostra.....	51
6.2	Comparação entre a imunexpressão e os dados demográficos e as variáveis clínico-patológicas.....	52
6.2.1	Imunexpressão de CD16 ⁺	55
6.2.2	Imunexpressão de CD56 ⁺	60
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	70
9	REFERÊNCIAS	71
10	APÊNDICE	78
11	ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica causada principalmente por *Mycobacterium leprae*, patógeno intracelular obrigatório, que provoca lesões na pele e nos nervos periféricos, com alteração de sensibilidade e acometimento neural, podendo causar incapacidade funcional e deformidades. Apresenta um variável espectro clínico e histopatológico, de acordo com o padrão de resposta imunológica do hospedeiro (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011; SCOLLARD, 2006). *M. leprae* caracteriza-se por apresentar alta infectividade e baixa patogenicidade, sendo a maioria da população, mais de 95% dos indivíduos, naturalmente imune (TALHARI; NEVES, 1997; VAN BRAKEL, 2000). Este patógeno infecta principalmente macrófagos e células de Schwann. Acredita-se que sua transmissão ocorre por contato direto e prolongado entre um indivíduo susceptível e um paciente infectado pelo bacilo (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

A hanseníase é endêmica em países tropicais. No mundo, dos 103 países que notificaram os casos de hanseníase, foram detectados 180.464 casos no final do primeiro trimestre de 2014, enquanto que o número de casos novos em 2013 foi de 215.557, e a prevalência registrada foi de 180.618 (OMS, 2014a). O Brasil é o segundo país com maior número de casos absolutos de hanseníase no mundo, perdendo apenas para a Índia. Em 2013 o Brasil apresentou 31.044 casos novos, um coeficiente de prevalência de 1,42 casos/10 mil habitantes (OMS, 2014b). No Ceará, no ano de 2013 foram notificados 2.069 casos novos, sendo que dos 184 municípios do Ceará, há 23 (12,5%) municípios sem registros de casos localizados próximos a áreas com alta endemicidade ou hiperendêmicas, podendo haver nestas regiões casos chamados de “silenciosos” (CEARÁ, 2013).

Os linfócitos NK participam da imunidade inata, influenciando a resposta imunológica adaptativa e a imunorregulação. Apresentam algumas diferenças em relação aos outros linfócitos, como a ausência do receptor de célula T (TCR), molécula central da resposta imunológica do linfócito T que necessita de experiência tímica para ganhar a circulação e mostrar efetividade na vigilância do organismo (POLI, 2009).

A função das células NK em pacientes com hanseníase não está bem estabelecida. Um dos primeiros estudos realizados sobre a atividade destas células

nesta doença mostrou que não houve diferença na atividade das células NK de indivíduos com hanseníase lepromatosa ou com as formas dimorfas, comparados aos indivíduos saudáveis, porém revelou atividade reduzida dos linfócitos NK em pacientes com a forma lepromatosa (LL) com eritema nodoso hansênico (ENH) (HUMPHRES; GELBER; KRAHENBUHL, 1982). Estudos posteriores relataram que células NK tem menor atividade em pacientes com hanseníase lepromatosa não tratados e não reacionais, quando comparados aos controles normais. Pacientes com reações reversas mostraram atividade normal dessas células, quando foram comparados com a forma *borderline* tuberculóide (BT) (CHIPLUNKAR, 1990; CONVERSE; BJUNE, 1986).

Em estudos realizados por Sólón (2012) foi observada uma redução na população de células NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) no sangue periférico de pacientes hansênicos antes de qualquer intervenção terapêutica. Após o tratamento adequado da hanseníase, houve uma recuperação na contagem desta população celular, enquanto as outras subpopulações: linfócitos T totais ($CD3^+$), T auxiliares ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$), T ($CD4^+CD8^+$), B ($CD19^+$), e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) mantiveram-se inalteradas. Outro estudo, realizado por Pinheiro (2013) comparou a população de linfócitos NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) de pacientes com hanseníase com aquela de indivíduos saudáveis, onde também foi observado uma redução na população de linfócitos NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) em pacientes hansênicos.

É possível que as células NK estejam envolvidas ativamente na resposta imunológica inata e precoce, já que as contagens reduzidas de células NK encontradas nos pacientes com hanseníase poderiam representar uma migração desta população de células para os sítios de lesão na tentativa de promover proteção contra o bacilo, através da destruição de macrófagos e células de Schwann infectadas por *M. leprae* (PINHEIRO, 2013; SÓLON, 2012).

Devido suas variadas manifestações clínicas, a hanseníase apresenta um espectro de resposta imunológica atrativa para pesquisadores, sendo um bom modelo humano de estudo das respostas do hospedeiro contra patógenos intracelulares em geral e contra os nervos periféricos em particular (NATH; SAINI; VALLURI; 2015). Vários estudos têm avaliado o perfil imune desses pacientes no sangue periférico uma vez que as alterações imunológicas têm um potencial papel no prognóstico da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico

A hanseníase é uma das mais antigas doenças que acomete o homem, identificada desde os primórdios da civilização, mas sua origem exata é incerta. (AZIZI; BAHADORI, 2011). Há questionamentos quanto a origem da doença, se na Ásia ou na África. Contudo, com a tecnologia da genômica comparativa, pesquisadores sugerem que a doença tenha se originado na África Oriental e se disseminado através das migrações humanas (MONOT, 2005).

Em 1873, o médico norueguês Gerhard Armauer Hansen identificou o agente etiológico *M. leprae*, a partir de lesões cutâneas de indivíduos doentes. Apesar da descoberta do agente etiológico, a doença permaneceu incurável por muitos anos até a introdução das sulfonas na década de 1940. Desde 1950, o tratamento deixou de ser o isolamento dos doentes e a terapêutica passou a ser realizada em ambulatórios (VELLOSO; ANDRADE, 2002). Em 1970, a doença lepra, palavra oriunda do termo grego “lepros” que significa escamoso, foi renomeada de doença de Hansen ou hanseníase em homenagem a Armauer Hansen e como forma de diminuir o estigma associado à doença (LASTÓRIA; ABREU, 2014; OPROMOLLA; MARTELLI, 2005)

2.2. Agentes etiológicos

Taxonomicamente, *M. leprae* pertence ao gênero *Mycobacterium*. Morfologicamente é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondadas, medindo 1,5-8,0 micrometros (μm) de comprimento por 0,2-0,5 μm de diâmetro, imóvel, não formador de esporos e que sobrevivem bem em ambientes de microaerofilia. *M. leprae* é diferente de outras micobactérias em termos de arranjo, uma vez que é organizado em cadeias paralelas, unidos formando as globias (LASTÓRIA; ABREU, 2014; SCOLLARD, 2006). *M. leprae* apresenta citoplasma, membrana plasmática, parede celular e cápsula. Onde a cápsula que é a estrutura externa, tem lipídios, especialmente dimecoserosatos fitiocerol e os glicolípideos

fenólicos (PGL-1) que são antigenicamente específicos para *M. leprae* (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Foi descoberto em 2008, que além do *M. leprae*, há outra espécie chamada *Mycobacterium lepromatosis* que também leva à hanseníase e que é a causa mais comum de hanseníase lepromatosa difusa. Sendo encontrada principalmente no México e no Caribe (GEETHA, 2008).

2.3. Formas clínicas da doença

As formas clínicas da hanseníase apresentam um espectro variável, desta forma, houve a necessidade de classificar estas formas clínicas para facilitar o tratamento e o manejo do doente (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007). Este espectro varia com o padrão de resposta imunológica desenvolvida pelo indivíduo, cujas extremidades são representadas pelo polo de resistência, onde predomina a resposta imunológica celular: forma tuberculóide (TT), e pelo polo de susceptibilidade conhecido como polo anérgico, no qual há predomínio da resposta imunológica humoral: forma virchowiana (VV) ou lepromatosa (LL); além dos subtipos entre esses dois polos e de uma forma inicial chamada forma indeterminada (I) (ARAÚJO, 2003; MENDOÇA, 2008a).

Atualmente, há duas classificações baseadas nos aspectos clínico-imunológicos e utilizadas para caracterizar as formas clínicas da hanseníase: a classificação de Madri e a de Ridley-Jopling e uma terceira classificação para efeitos operacionais, utilizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2011).

A classificação de Madrid de 1953 baseia-se nos aspectos clínicos e nos resultados da baciloscopia, dividindo a hanseníase em dois grupos polares estáveis e opostos (tuberculóide e lepromatoso) e dois grupos instáveis (indeterminado e *borderline*) (LASTÓRIA; ABREU, 2014). Onde a forma indeterminada seria um grupo transitório e inicial da doença e a forma *Borderline* (B) ou Dimorfa (D) como grupo instável e intermediário que caminharia para um dos polos no processo de evolução natural da doença (ARAÚJO, 2003; SOUZA, 1997).

A classificação de Ridley-Jopling de 1966 associa os aspectos imunológicos dentro de um espectro de resistência do hospedeiro. Resumindo, adota critérios

clínicos e bacteriológicos, e enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos (SOUZA, 1997). São descritas as formas polares: TT, VV e os três subgrupos intermediários, *Borderline*-Tuberculóide (BT), *Borderline - Borderline* (BB) e *Borderline -Virchowiano* (BV) (RIDLEY; JOPLING, 1966; SOUZA, 1997), essas formas de apresentação da doença representam diferentes evoluções a partir da forma indeterminada (I), fase inicial, não granulomatosa da doença (TALHARI, 2015).

Em 1982, na tentativa de facilitar o tratamento, a OMS criou a classificação operacional que divide a doença em duas formas: Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB) (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007). Onde a forma PB caracteriza-se pela presença de até cinco lesões cutâneas, baciloscopia negativa e ausência de troncos nervosos acometidos, enquanto que a forma MB caracteriza-se pela presença de mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva e/ou pelo menos um tronco nervoso acometido (SOUZA; EL-AZHARY; FOSS, 2009). Contudo, em 1995, a OMS recomendou o critério atualmente em vigência, pelo qual os doentes são alocados de acordo com o número de lesões: PB até cinco lesões, e MB, mais de cinco (CRESPO, 2014). Os critérios da OMS também são adotados pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2011).

2.4. Histopatologia das lesões

Os aspectos histopatológicos das lesões de hanseníase variam de granulomas bem definidos a infiltrado difuso linfo-histiocitário (SOUZA, 1997). No polo de resistência, a hanseníase tuberculóide (TT) caracteriza-se pela formação de granuloma tuberculóide bem definido, formado por células fagocitárias mononucleares agregadas com diferenciação epitelióide e presença de células gigantes multinucleadas tipo Langhans no centro da lesão e com participação de linfócitos contornando esse granuloma como um halo denso. Estes granulomas estendem-se a partir da derme profunda até a papilar, podendo atingir a camada basal da epiderme e comprometer filetes nervosos e anexos cutâneos (FLEURY, 1989; GOULART, 2002; SOUZA, 1997). Resumindo, a forma tuberculóide caracteriza-se quando células epitelióides imaturas estão presentes em conjunto com células gigantes de Langhans e numerosos linfócitos (LOCKWOOD, 2011).

Neste grupo clínico, é possível encontrar a hanseníase tuberculóide neural pura, que apresenta somente comprometimento neural, sem lesões cutâneas (SOUZA, 1997).

Na hanseníase lepromatosa (LL) ou polo anérgico, a lesão histopatológica apresenta um extenso infiltrado celular (monótono e monomórfico) formado por histiócitos-macrófagos com citoplasma contendo bacilos, que apresentam elevada quantidade de lipídios em sua parede, com aspecto de células espumosas (células de Virchow) e às vezes multivacuoladas. A epiderme atrófica está achatada (aplainamento das suas cristas interpapilares) e a zona subepidérmica não está envolvida. O infiltrado lepromatoso não atinge a camada basal da epiderme, ficando separado por uma faixa de fibras colágenas, conhecida como faixa de Unna (GOULART, 2002; SOUZA, 1997). Nesta forma, apesar da numerosa quantidade de bacilos, há escasso número de linfócitos e plasmócitos (LOCKWOOD, 2011; SOUZA, 1997).

O grupo *borderline* é instável e a diferença entre os grupos de menor susceptibilidade (BT) para outro de maior susceptibilidade (BL) está baseado na indiferenciação progressiva da célula macrófaga, na diminuição do número de linfócitos e no aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos (FLEURY, 1989; GOULART, 2002). Normalmente, na forma BT, de alta resistência, as lesões apresentam raros bacilos, com granulomas epitelióides focalizados por zona periférica de linfócitos, com presença ocasional de células gigantes tipo Langhans (GOULART, 2002; LOCKWOOD, 2011).

Já os casos *borderline borderline* (BB) tendem a mover-se para um dos polos, devido sua instabilidade. O número de bacilos é maior, com células epitelióides difusamente espalhadas por todo o granuloma e não focalizadas por zonas de linfócitos. Células gigantes e linfócitos em geral são escassos e difusos. Há presença de edema intra e intercelular, o qual é um aspecto comum nas formas BB associado à sua tendência às reações hansênicas (GOULART, 2002).

A forma BL apresenta granulomas com macrófagos indiferenciados que contém moderado número de bacilos e numerosos linfócitos, além de manter a faixa de Unna (GOULART, 2002; LOCKWOOD, 2011).

A forma da hanseníase indeterminada (I) está presente quando alguma inflamação do nervo é vista com raros bacilos álcool ácido resistente (BAAR) e uma ausência de granulomas epitelióides ou de macrófagos (LOCKWOOD, 2011).

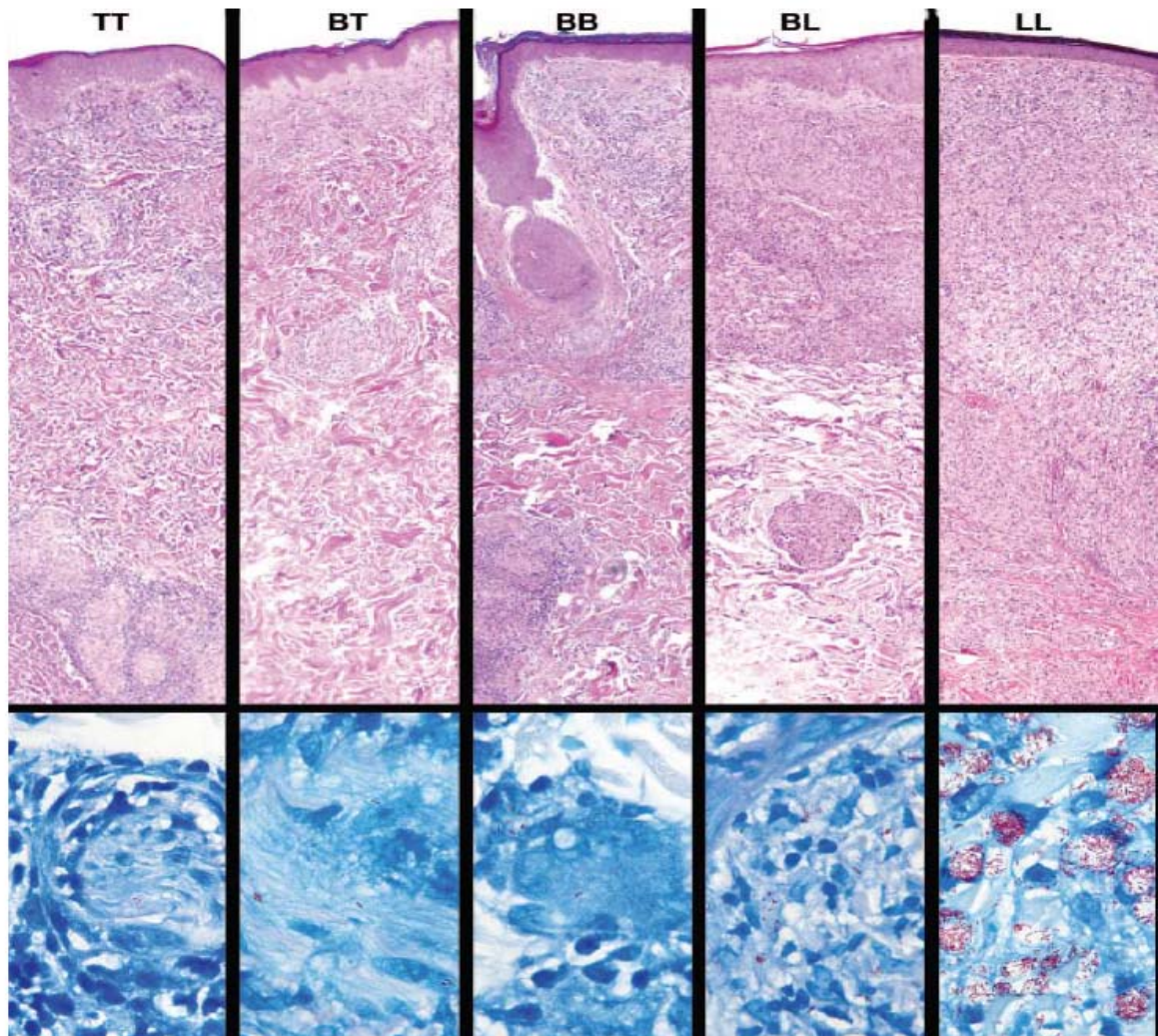


Figura 1: Espectro imunopatológico da hanseníase. Os campos representam cada um dos tipos histopatológicos da hanseníase na classificação de Ridley e Jopling (1966). Na parte superior, as biópsias foram coradas com hematoxilina-eosina (Aumento de 63x). Observa-se que os infiltrados granulomatosos epitelióides, bem definidos nas lesões tuberculóides (TT), tornam-se agregados completamente desorganizados de histiócitos espumosos, com raros linfócitos, em lesões lepromatosas (LL). Na parte inferior foi realizada a coloração de Fite-Faraco (1938) (Aumento de 1000x), com campos representativos de cada classificação, demonstrando a raridade de bacilos nas formas TT e BT (Fonte: Scollard *et al.*, 2006).

2.5. Imunopatologia da hanseníase

A resposta do sistema imunológico é classicamente dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa (VIVIER, 2011).

2.5.1. A imunidade inata na hanseníase

A capacidade do hospedeiro para reconhecer patógenos é uma característica da imunidade inata e é mediada por receptores de reconhecimento de padrões que identificam várias classes moleculares de microorganismos, incluindo as micobactérias (KANG, 2004; MENDONÇA, 2008a). A imunidade inata, primeira defesa do organismo frente a um dano tecidual, atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta, independente de estímulo prévio. É compreendida por barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis (CRUVINEL, 2010). Geralmente, a imunidade inata se refere a uma ampla variedade de células mielóides e linfóides que podem exercer a função efetora rápida através de um repertório limitado de receptores (VIVIER, 2011). Entretanto, esta imunidade também pode ser prejudicial, agredindo o organismo por mecanismos autoimunes ou mesmo, na sua ausência, oferecer espaço aos agentes infecciosos para agirem de forma exacerbada (JOBIM; JOBIM, 2008).

A imunidade inata é a primeira barreira contra infecção por *M. leprae*. Independente da ativação da resposta imunológica adaptativa, é feita principalmente por células fagocitárias, como macrófagos ativados, neutrófilos e células dendríticas, como também por linfócitos T citotóxicos e células NK, que podem eliminar os bacilos (IYER, 2009). A base da resistência ao desenvolvimento das manifestações clínicas da hanseníase pode estar diretamente relacionada a uma resposta imune inata eficaz em combinação com a baixa virulência de *M. leprae*, levando a diferentes graus de resposta celular no hospedeiro (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

M. leprae, parasita intracelular obrigatório, ao invadir o hospedeiro, passa a residir dentro de macrófagos, células dendríticas e células de Schwann. Há várias formas utilizadas pelo bacilo para invadir o hospedeiro, uma delas é através do PGL-1, glicolipídio específico de *M. leprae*, que reconhece o fragmento do complemento CR3 levando à fagocitose. O reconhecimento de patógenos por células do sistema imune inato pode acontecer tanto por fragmentos do complemento, receptores de reconhecimento de padrão (PRR) e receptores Toll-like (TLR) presentes nas células dendríticas e macrófagos. O PGL-1 leva à baixa produção de TNF, IL1 β , e IL10 (BRIGHTBILL, 1999; NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

O sistema imunológico inato exerce importante papel na infecção por bactérias intracelulares, sendo capaz de regular a inflamação, a secreção de citocinas e quimiocinas e as vias efetoras microbicidas, como a maturação e a fusão de fagossomos bacterianos com lisossomos, a atividade de peptídeos antimicrobianos, a produção de mediadores de estresse oxidativo, a indução de apoptose e a via de autofagia. Sendo todas estas vias reguladas por interferon gama (IFN- γ). Apesar destas vias de defesa, *M. leprae* tem desenvolvido formas de escapar de peptídeos microbicidas, do estresse ácido e oxidativo, da limitação de nutrientes e de oxigênio e subsequentemente, escapar da morte. *M. leprae* pode inibir a fusão de fagossomos-lisossomos e desta forma impedir a maturação dos fagossomos numa fase precoce (OTTENHOFF, 2012).

A fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas de fase aguda, como as citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata (CRUVINEL, 2010). No início da infecção, há uma resposta imunológica indefinida no hospedeiro, que será regulada por citocinas inflamatórias e quimiocinas que podem levar à proliferação de linfócitos T *helper* 1 (Th1) ou de linfócitos T *helper* 2 (Th2) contra *M. leprae*. De acordo com o tipo de proliferação prevalente haverá uma resposta imunológica celular (Th1) ou humoral (Th2). Isso vai determinar a evolução da doença para a forma TT ou LL, respectivamente (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Os TLR são uma família de receptores altamente conservados, responsáveis pelo reconhecimento imunológico inato de micobactérias, uma vez que se liga à lipoproteínas presente nas bactérias. Uma varredura de todo o genoma de *M. leprae* detectou 31 supostas lipoproteínas. Estudos comprovam que a expressão e a ativação regulada desses receptores contribuem para a defesa do hospedeiro contra agentes microbianos patogênicos, vários mecanismos de ativação e inibição têm sido identificados (MODLIN, 2010; NATH; SAINI; VALLURI; 2015).

Modlin acredita que as lipoproteínas microbianas desencadeiam respostas no hospedeiro através de TLR2, exigindo a presença de grupamentos acil para exercer a atividade. Observou-se que as lipoproteínas triaciladas dos patógenos ativam heterodímeros TLR2/1, enquanto que as lipoproteínas diaciladas ativam heterodímeros TLR2/6. Os heterodímeros TLR2-TLR1 medeiam ativação celular por morte de *M. leprae*, indicando a presença de lipoproteínas triaciladas. Estudos

comprovam que lipopeptídeos sintéticos ativam ambos monócitos e células dendríticas. Essa ativação é reforçada pelas citocinas tipo I e inibidas por citocinas tipo II. INF- γ favorece a expressão de TLR1 em monócitos e GM-CSF favorece a expressão de TLR1 em células dendríticas, enquanto que IL-4 reprime a expressão de TLR2 (MODLIN, 2010). TLR2 e TLR4 reconhecem *M. leprae*, ativando os monócitos, levando à liberação de IL-12, uma citocina que induz as citocinas pró-inflamatórias e a morte do bacilo. A sobreposição da resposta imunológica inata e adaptativa tem demonstrado que IL-4, uma citocina Th2, e IL-10 desempenham um papel regulador negativo, regulando a expressão de TLR2 e a produção de citocinas. (NATH; SAINI; VALLURI; 2015). Os TLR1 e TLR2 são fortemente expressos em lesões da forma TT em comparação com a forma disseminada da doença, forma LL (MODLIN, 2010).

Além do TLR1-TLR2, já foram identificados outros TLR e PRR, que também possuem papel importante na regulação da resposta imune inata. Dentre eles, o TLR4, TLR8 e o TLR9. Outro receptor também estudado é o receptor citoplasmático NOD2 (domínio de oligomerização ligado a nucleotídeos), pertencente à família dos receptores NOD-like, que apresenta partes homólogas ao TLR, contendo repetições ricas em leucinas que medeiam a resposta a peptídeoglicanos, incluindo os derivados de micobactérias (MODLIN, 2010).

Os linfócitos NK participam da imunidade inata, influenciando a resposta imunológica adaptativa e a imunorregulação (POLI, 2009). Apresentam algumas diferenças em relação aos outros linfócitos, como a ausência do receptor de célula T (TCR), molécula central da resposta imunológica do linfócito T que necessita de experiência tímica para ganhar a circulação e mostrar efetividade na vigilância do organismo. As células NK são timo independente, e os pacientes com ausência das NK sofrem de infecções virais persistentes, particularmente de vírus do tipo herpes (JOBIM; JOBIM, 2008).

A função das células NK em pacientes com hanseníase não está bem estabelecida. Um dos primeiros estudos realizados sobre a atividade destas células na hanseníase mostrou que não houve diferença na atividade das células NK de indivíduos com hanseníase lepromatosa (LL) ou com as formas dimorfas, comparados aos indivíduos saudáveis, porém mostrou atividade reduzida dos linfócitos NK em pacientes LL com ENH (HUMPHRES; GELBER; KRAHENBUHL,

1982). Estudos posteriores mostraram células NK com baixa atividade em pacientes com hanseníase virchowiana não tratados e não reacionais, quando comparados aos controles normais. Pacientes com reações reversas mostraram atividade normal dessas células, quando foram comparados com a forma BT (CONVERSE; BJUNE, 1986).

Chiplunkar *et al.* (1990) demonstraram que as células NK de pacientes com a forma LL não tratados e tratados com multidrogaterapia (MDT) foram menos eficazes em promover a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em comparação com pacientes com a forma TT ou controles saudáveis. As células NK promovem a depuração dos bacilos de *M. leprae* via citotoxicidade contra células de Schwann e macrófagos infectados. Esta ação pode ser incrementada pela injeção intra-lesional de interleucina-2 (IL-2) (CHIPLUNKAR, 1990; KAPLAN, 1989; STEINHOFF, 1991).

Em estudos realizados por Sólón (2012) com técnica de citometria de fluxo, foi observada uma redução na população de células NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) no sangue periférico hanseniano, antes de qualquer intervenção terapêutica. Após o tratamento adequado da hanseníase, houve uma recuperação na contagem desta população celular, enquanto as outras subpopulações: linfócitos T totais ($CD3^+$), T auxiliares ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$), T ($CD4^+CD8^+$), B ($CD19^+$), e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) mantiveram-se inalteradas.

Outro estudo, realizado por Pinheiro (2013), comparando a população de linfócitos NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) de pacientes com hanseníase com indivíduos saudáveis, também observou uma redução na população de linfócitos NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) em pacientes hansenianos.

Sólón (2012) e Pinheiro (2013) sugerem que as células NK estejam envolvidas ativamente na resposta imunológica inata, já que as contagens reduzidas de células NK encontradas nos pacientes com hanseníase poderiam representar uma migração desta população de células para os sítios de lesão na tentativa de promover proteção contra o bacilo, através da destruição de macrófagos e células de Schwann infectadas por *M. leprae*. A possibilidade de imunodeficiência especificamente na população de células NK é considerada mais remota, pois estes indivíduos com hanseníase experimentaram uma recuperação das contagens de células NK após o tratamento específico da doença.

2.5.2. A imunidade adquirida na hanseníase

A resposta imunológica adquirida caracteriza-se pela interação altamente específica dos linfócitos, células dendríticas, macrófagos, e fatores solúveis. Dentre os fatores solúveis, há os anticorpos secretados pelas células B, que capturam bactérias livres, e as citocinas secretadas pelas células T que atravessam as membranas celulares para debelar patógenos intracelulares (NATH; SAINI; VALLURI; 2015).

Classicamente, a imunidade adaptativa pode ser subdividida em celular ou do tipo 1, e humoral ou do tipo 2. Apresenta mecanismos que se baseiam no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas membranas dos linfócitos T e B. A capacidade dos linfócitos T auxiliares (CD4⁺), também conhecidos como linfócitos T *helper* (Th), em induzir as respostas celular ou humoral está relacionada com os tipos de citocinas secretadas. INF- γ leva ao desenvolvimento da resposta Th1 e IL-4 à Th2. Na hanseníase, em alguns pacientes, tem sido descrito o perfil Th0 com produção de ambas citocinas INF- γ e IL-4 (MISRA, 1995; MORAES, 2006; YAMAMURA, 1992).

Pacientes hansênicos mostram uma dicotomia nas respostas de células B e T (NATH; SAINI; VALLURI; 2015). A resposta imunológica na hanseníase está associada com o desenvolvimento de formas clínicas distintas, em que o predomínio da resposta celular está relacionado à forma clínica mais branda da doença (tuberculóide) e a ausência da resposta celular, com a forma clínica mais grave (lepromatosa) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Hasan *et al* (2006) sugerem que a ativação diferencial de citocinas em pacientes com hanseníase parece ser crítica na disseminação e progressão da doença. O padrão de citocinas vem sendo amplamente estudado, através de técnicas de imunistoquímica, hibridização *in situ*, ELISA do soro de pacientes e do sobrenadante de culturas de PBMC (células mononucleares do sangue periférico), etc. Os clones de células T derivados de lesões de pacientes apresentam padrões de citocinas diferentes de acordo com a forma clínica da doença.

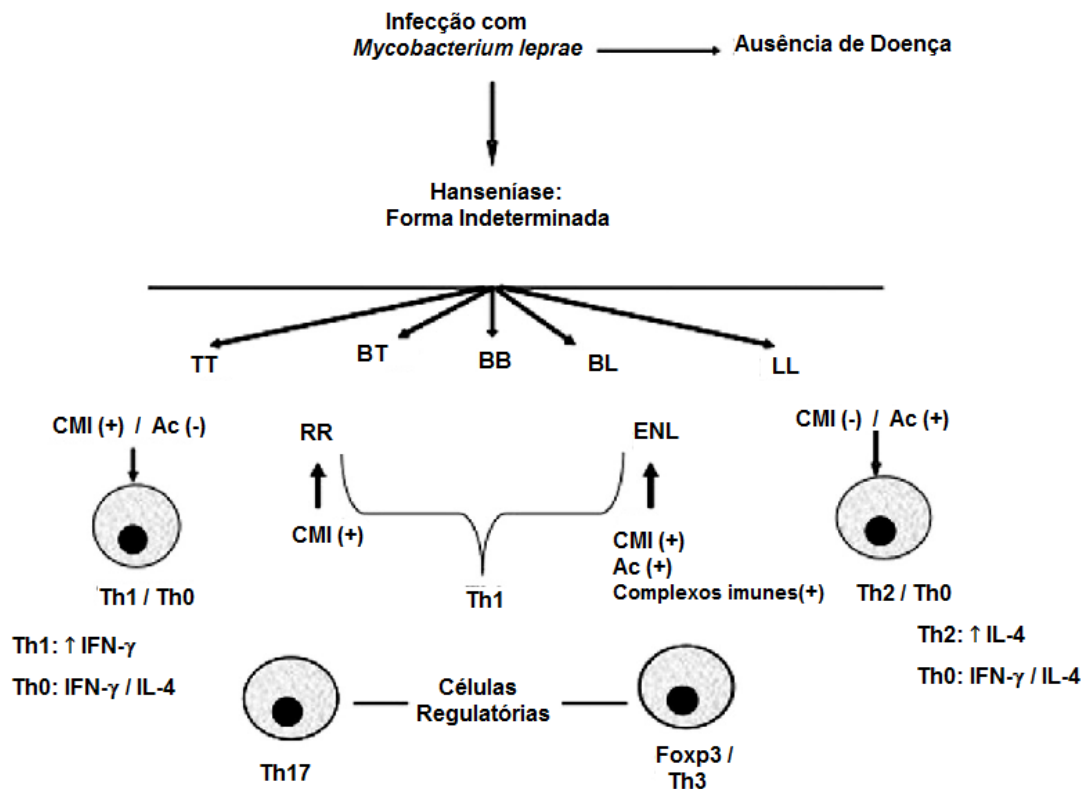


Figura 2: Características imunológicas do espectro da hanseníase (Classificação de Ridley Jopling), reações hansênicas e sua relação com a carga bacilar. TT: forma polar tuberculóide; BT: forma *borderline* tuberculóide; BB: forma *borderline-borderline*; BL: forma *borderline* lepromatosa; LL: forma polar lepromatosa; RR: Tipo 1 / Reação Reversa; ENL: Tipo 2 / Eritema nodoso hansênico. Th1: T helper 1; Th2: T helper 2; Th0: T helper 0; Th17: célula T auxiliar produtora de IL 17; Fxp3: célula T com fator de transcrição "fork head box p3"; CMI: imunidade mediada por células T; Ac: anticorpos; IFN-γ: interferon gama; IL-4: interleucina 4. Fonte: Adaptada de Nath (2015).

Recentemente, duas células T reguladoras têm sido estudadas em hanseníase, as células Th17 e as células Fxp3. O subconjunto de células Th17 produz citocina IL-17, descritas em reações de ENH (Eritema nodoso hansênico ou reação do tipo 2) (MARTINIUK, 2012). Segundo Saini *et al* (2013), as células Th17 podem constituir um terceiro tipo de perfil Th na hanseníase, uma vez que foram observadas em lesões e em culturas de PBMC de pacientes TT, com maior associação de Th17 com tipos Th0 não polarizada. O perfil Th17 pode ser uma via alternativa em pacientes incapazes de montar uma resposta Th ou quando a polarização de Th ainda não foi definida (Figura 2) (NATH; SAINI; VALLURI; 2015).

O segundo subconjunto de células T reguladoras são as células Foxp3 ou linfócitos Th3 e / ou células T reguladoras ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$), que são induzidas pelo aumento de $TGF\beta$, regulam negativamente as respostas imunes e as células Th17, apresentando função supressora (KUMAR, 2013). Acredita-se que estas células T reguladoras podem ser ativadas na presença de uma grande quantidade de IL-4, como na forma LL, induzindo a produção de $TGF-\beta 1$ e IL-10, contribuindo com a persistência do parasito e a indução da cronicidade da doença (GOULART, 2002; VENTURINI, 2011).

Estudos sugerem que há considerável plasticidade nestes dois subgrupos de células reguladoras e em alguns momentos uma sobreposição nas respostas imunológicas (Figura 2). A biologia da célula T envolve uma interação complexa entre as células efetoras e reguladoras, pode levar a uma proteção através da eliminação do patógeno e / ou danos nos tecidos causados por uma hipersensibilidade do tipo tardia (NATH; SAINI; VALLURI; 2015).

Os pacientes TT apresentam relativa resistência ao patógeno, a infecção é localizada e as lesões são caracterizadas pelo perfil Th1 com expressão de citocinas como IL-2 e $IFN-\gamma$, resultando em uma resposta imunológica mediada por célula. $IFN-\gamma$ ativa macrófago e IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou cura. No polo oposto, também chamado de polo anérgico, os pacientes com a forma LL apresentam susceptibilidade a *M. leprae*, a infecção é disseminada e as lesões caracterizam-se pela expressão de citocinas do perfil Th2: IL-4, IL-5 e IL-10, com predomínio de resposta humoral e uma resposta imune celular ineficiente ou mesmo ausente a *M. leprae*. IL-4 estimula a produção de imunoglobulina E (IgE) e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva (GOULART, 2002; MODLIN, 1994). Nesta forma da hanseníase, as lesões são caracterizadas por redução de células T $CD4^+$ e aumento de células T $CD8^+$ (MISCH, 2008).

Nos grupos dimorfos, dados sobre a produção de citocinas são escassos. Misra *et al.* (1995) verificaram perfis Th1 e Th0 em pacientes BT, enquanto que os pacientes BL tinham perfis Th2 e Th0. Mc Clean *et al.* (1994) observaram que lesões de pacientes BT apresentam mais células $CD4^+$ e que os pacientes BL possuem maior quantidade de células $CD8^+$. Tem sido observado que pacientes com

hanseníase na forma LL e BL cursam, em sua evolução, com elevadas concentrações de anticorpos no soro, como o anti-PGL1, associado com a depressão da imunidade celular (FOSS, 1997).

Estudos realizados por Venturini (2011), utilizando sangue periférico com cultura de PBMC e fragmentos de lesões de pacientes hansênicos com as formas clínicas *borderlines* mostraram que pacientes BT apresentavam maior expressão de enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), IFN- γ e IL-10, com baixa expressão de TGF- β 1 e igual expressão de TNF- α quando comparados com pacientes BL. A alta expressão de iNOS e baixa expressão tecidual de TGF- β 1, associada com a presença de células IL-10(+) na periferia do granuloma e no tecido conjuntivo sugere um papel imunoregulador de IL-10. Além disso, o aumento de iNOS e IFN- γ sugere uma resposta imunológica mais eficiente do tipo Th1 ou celular, com consequente morte de bacilos.

Nos pacientes BL foi observado uma alta expressão de TGF- β 1 e IL-10 que podem favorecer a manutenção de bacilos em granulomas, já que ambos podem suprimir resposta celular a *M. leprae*. A expressão de TNF- α foi semelhante nas duas formas clínicas. Como esta citocina atua em sinergia com IFN- γ , aumentando a capacidade microbicida de fagócitos e favorecendo a manutenção do processo granulomatoso, acredita-se que esse processo favoreça uma diminuição da carga bacilar que restringe o processo infeccioso em pacientes BT, enquanto que em pacientes BL, a presença de níveis baixos de IFN- γ e elevados níveis de TGF- β 1 permite a proliferação bacilar.

No local da infecção, as DCs são as primeiras células a capturar *M. leprae*. Elas produzem IL-10 e IL-12, fundamentais no direcionamento da resposta Th1 ou Th2 contra o bacilo causador da hanseníase. As DCs derivadas de macrófagos têm demonstrado alta capacidade de capturar antígenos e de exercer de forma efetiva a apresentação dos mesmos (MIRA, 2004; MODLIN, 2010), porém, com baixa ativação de células T (BARKER, 2006).

O macrófago possui características distintas dependendo da forma clínica da doença. Uma vez que é a célula hospedeira primária de *M. leprae* desempenha um papel importante na patogênese da hanseníase. Nas lesões das formas tuberculóides (TT), onde há formação de granuloma, dificilmente são encontradas bactérias dentro dos macrófagos, mas na hanseníase lepromatosa (LL), as lesões

caracterizam-se pelo acúmulo de macrófagos que são incapazes de impedir a multiplicação de *M. leprae*. Estudos mostram haver uma distinção dos receptores celulares expressos nos macrófagos de cada forma clínica da doença (KRUTZIK, 2003).

Os linfócitos T são cruciais no desenvolvimento da resistência contra o *M. leprae* (KIMURA, 2004). Os linfócitos T auxiliares (CD4⁺) reconhecem peptídeos ligados a MHC II, e são especializados em enviar sinais a outras células do sistema imunológico como macrófagos, linfócitos B e T CD8⁺, através de citocinas e interação direta. Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) reconhecem peptídeos ligados ao MHC I e são especializados em detectar as células infectadas para destruí-las. O principal mecanismo de ação dos linfócitos T citotóxicos é a indução de apoptose, seja através da expressão de receptores de morte, seja pela liberação de perforinas e granzimas. Além disso, os linfócitos T citotóxicos secretam citocinas como IFN- γ e TNF, as quais podem aumentar a apresentação de antígenos e mediar os efeitos contra os patógenos, por interferirem na replicação viral e bacteriana (SCHEPERS; ARENS; SCHUMACHER, 2005).

2.6. Linfócitos *Natural Killer* (NK)

Dentre as células que compõem o sistema imune inato se incluem as células NK que contribuem para a vigilância imunológica. Estas células foram classificadas como pertencentes a imunidade inata por serem capazes de induzir diretamente a morte de células tumorais e células infectadas com vírus, na ausência de imunização específica. Correspondem a cerca de 10 a 20% dos linfócitos circulantes. Morfologicamente, são maiores do que os linfócitos T e B, apresentando citoplasma granular e marcadores de superfície CD16⁺ e CD56⁺ (JOBIM; JOBIM, 2008; VIVIER, 2011). As células NK diferenciam-se de linfócitos T por não necessitarem de maturação no timo, como também por não expressarem em sua superfície o TCR e o CD3 (JOBIM; JOBIM, 2008; SANZ, 2013).

Funcionalmente, diferem dos integrantes da imunidade adaptativa por reagirem de maneira rápida, durante a invasão do organismo, sendo importantes no reconhecimento de patógenos intracelulares e de células tumorais. De forma semelhante aos linfócitos, sua função efetora se dá por intermédio de secreções de

citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e imunossupressoras (IL-10, TGF- β), fatores de crescimento (GM-CSF e G-CSF), liberação de citocinas como granzimas e perforinas, expressão do receptor de superfície CD95 (FAS) capaz de induzir apoptose em células alvo, liberação de quimiocinas, de INF- γ e pela relação estreita com as células dendríticas (GRAY, 1998; JOBIM; JOBIM, 2008; VIVIER, 2011).

Recentemente, há evidências de que as células NK apresentam características de células da resposta imune adaptativa, incluindo: habilidade para reconhecer especificamente antígenos microbianos; e potencial para se desenvolver em uma célula de memória de vida longa, que protege contra infecções subsequentes. Estes achados implicam que novas estratégias para vacinas podem ser desenvolvidas para facilitar a indução de células NK de memória de vida longa, patógeno-específica, que pode contribuir para prevenção ou controle de infecções (SUN, BEILKE, LANIER, 2009; SUN, BEILKE, 2011; PAUST, SENMAN, ANDRIAN, 2010; PAUST, SENMAN, ANDRIAN, 2011).

Atualmente, questiona-se a função das células NK estar relacionada apenas à imunidade inata, uma vez que, considerando as diversas funções descritas das células NK, pode-se verificar sua participação efetiva na imunidade adaptativa. Dentre as diversas funções das células NK, foi observado que a produção de citocinas e quimiocinas por estas células, afetam as células T e células B, com subsequentes respostas específicas ao antígeno. A elevada produção de IFN- γ pelas células NK pode ajudar a moldar a resposta de linfócitos T nos nódulos linfáticos. Sugere-se que a interação direta dos linfócitos T "virgens" com as células NK, que migram dos tecidos periféricos inflamados para os órgãos linfóides secundários, pode levar à respostas de células T, possivelmente por diminuição da carga antigênica ou porque os restos das células alvo podem promover reações cruzadas com a apresentação de antígeno às células T CD8⁺ citotóxicas. Além disso, a secreção de quimiocinas é considerada fundamental para a quimiotaxia de outras células, tais como as células dendríticas para o local da inflamação (VIVIER, 2011).

Através de estudos em camundongos e humanos, foi demonstrado que as células NK podem adquirir diversos fenótipos e funções, dependendo do desafio imune. As células NK podem ser "instruídas" e selecionadas durante seu desenvolvimento, exibindo antígenos específicos, submetidos à expansão clonal

durante a infecção, e se tornando células de memória efectoras de vida longa. Embora a habilidade de células NK interagirem com a resposta imunológica adaptativa já tenha sido amplamente caracterizada em infecções e em células malignas, estudos recentes mostram a importância de funções imunossupressoras pelas células NK também na autoimunidade, na imunodeficiência e nos transplantes (CROME, 2013; SANZ, 2013).

2.6.1 Tipos de Linfócitos NK

As células NK são desenvolvidas durante a vida fetal, bem como após o nascimento a partir de células-tronco hematopoiéticas através de um progenitor linfóide comum (CLP). Estas células são bastante heterogêneas e são encontradas em diferentes órgãos, tais como o fígado, pulmão, útero e intestino. (EVERSLOH; KILLIG; ROMAGNANI, 2013).

Os diferentes graus de amadurecimento são identificados pela expressão de receptores na superfície membranar das células NK. Acredita-se que esse desenvolvimento ocorre no sangue periférico, nos órgãos linfóides secundários e nos tecidos. Ainda não está claro se a heterogeneidade tem origem de sinais específicos nos tecidos que influenciam tanto na diferenciação terminal quanto no desenvolvimento *in situ* das células NK. Supõe-se que o meio ambiente específico de cada tecido pode influenciar a diferenciação *in situ* de células NK e explicar a grande heterogeneidade funcional e fenotípica encontrada entre estas células derivadas de diferentes tecidos. As células NK migram para os tecidos periféricos para sofrer maior diferenciação. A figura 3 ilustra o desenvolvimento das células NK de acordo com a imunoexpressão dos marcadores de superfície (EVERSLOH; KILLIG; ROMAGNANI, 2013).

Em humanos, as células NK são classificadas em diferentes subgrupos baseados na intensidade de expressão de marcadores de superfície, tais como CD16 (receptor para a porção Fc de imunoglobulina ou FCγRIII) e CD56 (molécula de adesão mediada por adesão homotípica) como também, no estudo de sua capacidade efectora citotóxica (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; SANZ, 2013).

As células NK foram agrupadas de acordo com a expressão de marcadores expressos na superfície destas células. As que expressam alto número de cópias de CD56⁺ ou CD16⁺ em sua membrana (CD56^{bright} ou CD16^{bright}), as que expressam um baixo número de cópias de CD56 ou CD16 em sua membrana (CD56^{dim} ou CD16^{dim}) além de ambos os marcadores com expressão nula (CD16⁽⁻⁾ ou CD56⁽⁻⁾) (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001).

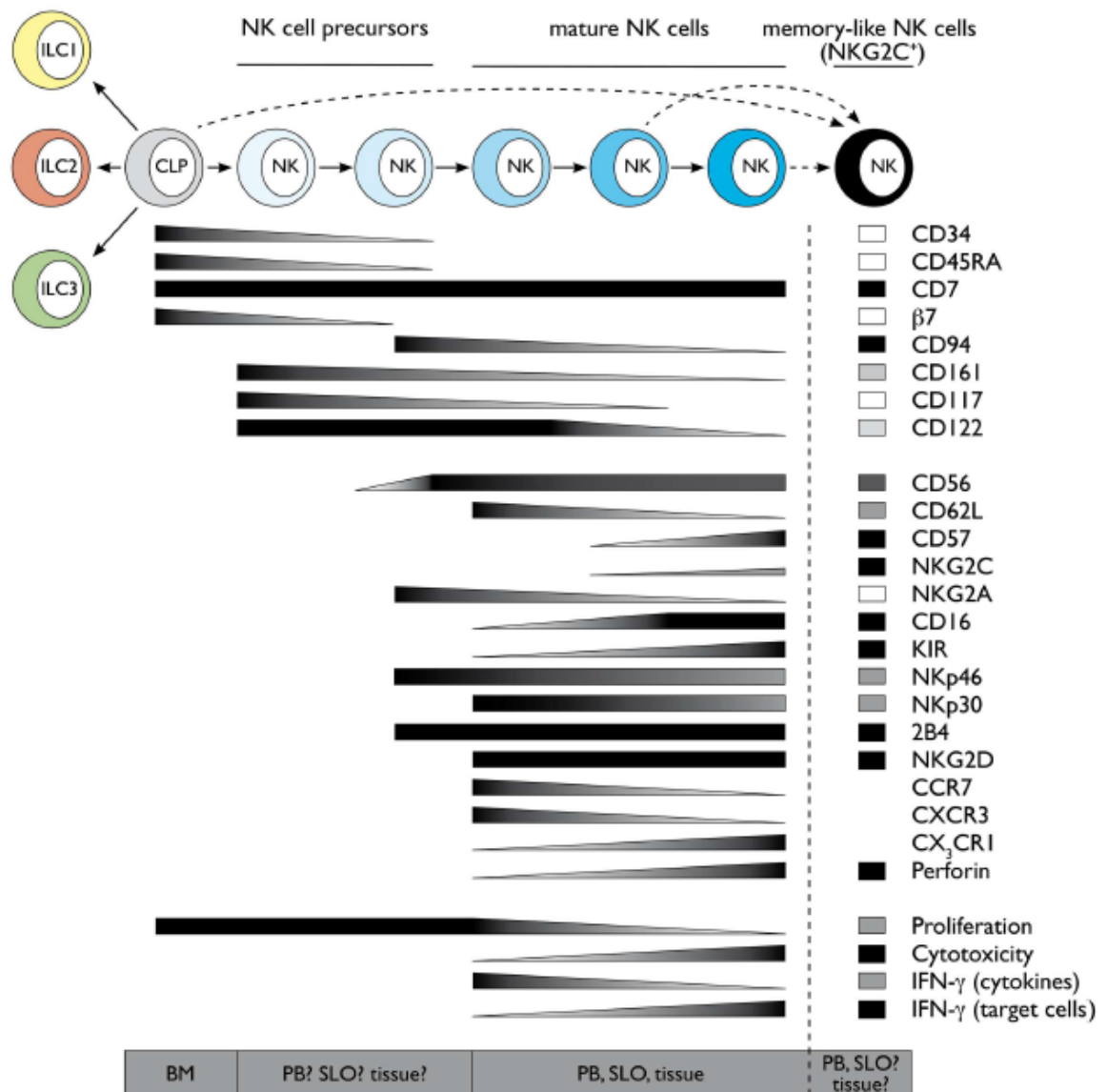


Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento e diferenciação terminal de célula NK humana. Da esquerda para a direita está representado o desenvolvimento destas células a partir de um progenitor linfóide comum. A aquisição, a perda de marcadores de superfície e as propriedades funcionais são propostas em um modelo linear de desenvolvimento e diferenciação terminal de células NK humanas. Os níveis de expressão de proteína são retratados como preto em alta expressão e branco sem expressão, cinza indica níveis intermediários. As propriedades funcionais são indicadas de forma correspondente. Abreviaturas: progenitor linfóide comum (CLP), medula óssea (BM), células linfóides inatas (ILC), sangue periférico (PB), órgãos linfóides secundários (SLO). Fonte: Adaptada de Eversloh; Killig; Romagnani (2013).

Em sangue periférico de humanos, foram definidas cinco subpopulações de células NK: (1) $CD56^{bright} CD16^{(-)}$ (50-70% de $CD56^{bright}$), (2) $CD56^{bright} CD16^{dim}$ (30-50% de $CD56^{bright}$), (3) $CD56^{dim} CD16^{(-)}$, (4) $CD56^{dim} CD16^{bright}$ e (5) $CD56^{(-)} CD16^{bright}$ (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; POLI, 2009). Cerca de 90% das células NK em humanos apresentam baixa expressão de CD56 e alta expressão de CD16, sendo as células NK $CD56^{dim} CD16^{bright}$ o principal subgrupo circulante no sangue periférico. Os outros 10% das células NK apresentam alta expressão de CD56. Os outros sub-grupos são encontrados em concentrações muito pequenas em indivíduos saudáveis e com funções desconhecidas (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001).

Basicamente, há dois grupos majoritários de células NK, os que expressam o antígeno de superfície $CD56^{+}$ em alto número de cópias em sua membrana ($CD56^{bright}$) junto com a expressão de um baixo ou nulo número de cópias de $CD16^{+}$ em sua membrana ($CD16^{dim/-}$), ou seja, $CD56^{bright} CD16^{dim/-}$ (células NK reguladoras); e outro grupo que seria o inverso $CD56^{dim} CD16^{bright}$ (células NK citotóxicas). Ambos os grupos, apresentam características funcionais diferentes (SANZ, 2013).

A capacidade efetora citotóxica das células NK é determinada em função da capacidade de lisar espontaneamente *in vitro* células que não expressam moléculas de histocompatibilidade de classe I (citotoxicidade espontânea ou natural); da capacidade, induzida *in vitro* com estímulo de citocinas, de lisar células que expressam moléculas de histocompatibilidade de classe I (atividade LAC ou citotoxicidade induzida) e da capacidade de lisar mediante o reconhecimento de células previamente marcadas por imunoglobulinas IgG, as quais se ligam nos receptores CD16 (citotoxicidade dependente de anticorpo ou ADCC) (SANZ, 2013).

As células NK citotóxicas apresentam uma alta capacidade citotóxica natural, citotóxica induzida e ADCC. Em contrapartida, as células NK reguladoras apresentam baixa capacidade citotóxica natural e ADCC, mas uma alta capacidade citotóxica induzida, sendo responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Figura 4) (SANZ, 2013).

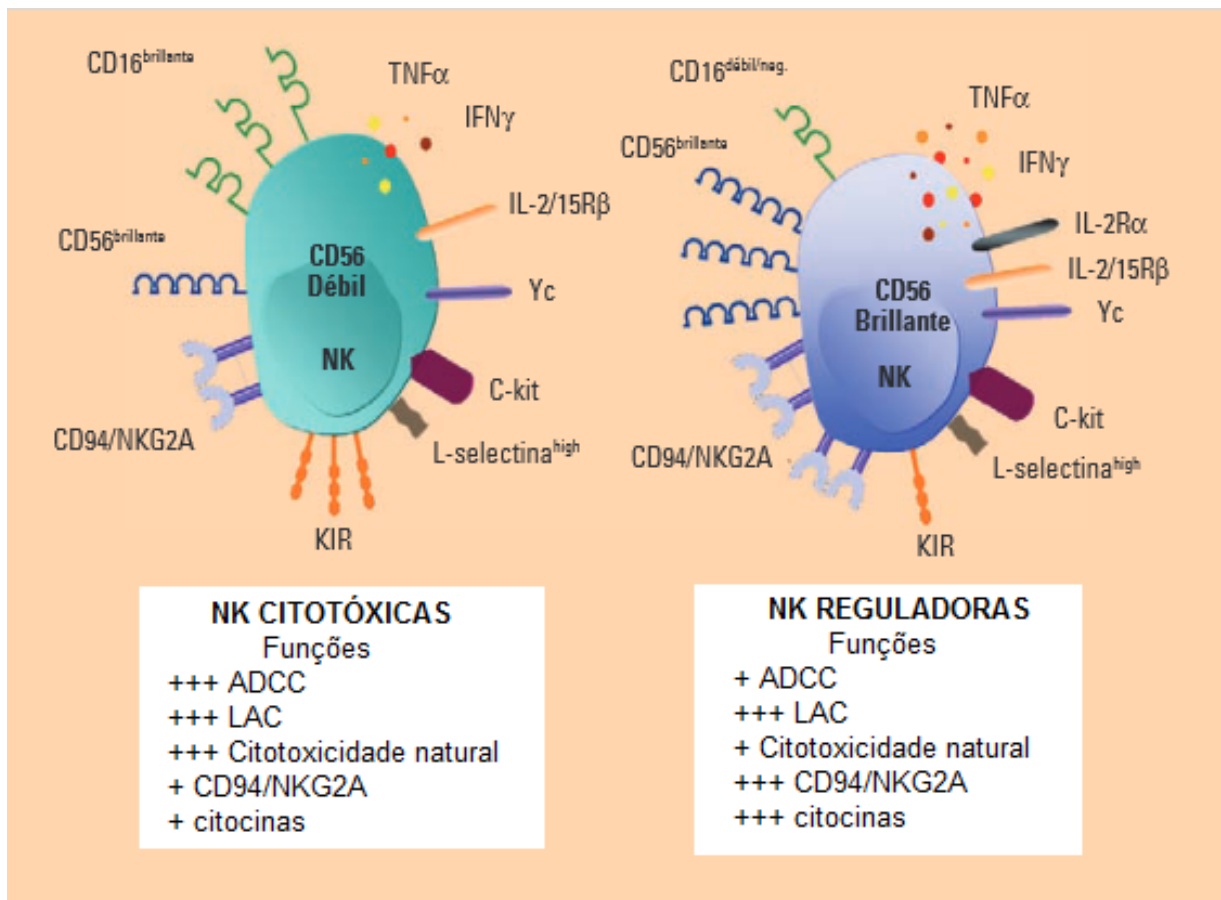


Figura 4: Classificação das células *natural killer* (NK) em função de suas capacidades efetoras e reguladoras. NK: *natural killer*. Fonte: Adaptada de Sanz (2013).

As células NK $CD56^{dim} CD16^{bright}$ representam cerca de 90% das células NK do sangue periférico, e são denominadas NK citotóxicas devido sua alta capacidade lítica e sua baixa capacidade de secretar citocinas. Elas destroem eficientemente células alvo e têm baixa produção de citocinas quando expostas à IL-12, mas produzem altos níveis de IFN- γ quando estimuladas através dos seus receptores de ativação (CROME, 2013; SANZ, 2013).

Embora as células NK $CD56^{bright} CD16^{dim}$ representem os 10% restante, estas células após ativadas apresentam baixa capacidade lítica e alta capacidade imunoreguladora, podendo liberar elevadas quantidades de citocinas, incluindo IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, mas para exercer a função citotóxica precisam de longo tempo de ativação ou exposição à IL-2. Apesar de sua pequena concentração no sangue periférico, elas estão bastante presentes nos tecidos linfóides secundários. Ao contrário, as células NK $CD56^{bright} CD16^{(-)}$ são o subconjunto primário encontrado em lesões inflamatórias (CROME, 2013).

As células NK localizadas nessas lesões apresentam baixa produção de IFN- γ , quando estimuladas com IL-12 e IL-18, sendo negativas para perforinas. As células NK CD56^{bright} CD16⁽⁻⁾ parecem ser o principal subconjunto de células NK efetoras nos tecidos. A dicotomia de função entre as populações de células NK sugere provavelmente que elas representam estados distintos de ativação ou diferenciação de células NK (CROME, 2013).

2.6.2 Receptores de Linfócitos NK

As células NK apresentam uma variedade de receptores em sua superfície que podem estimular a reatividade destas células (receptores de ativação) ou diminuir essa reatividade celular (receptores inibitórios) (VIVIER, 2011). As funções das células NK são determinadas pelas interações entre seus receptores ativadores e/ou inibidores com seus ligantes, que levará a ativação ou inibição destas células, induzindo uma resposta protetora no organismo (SANZ, 2013). Os receptores de ativação incluem receptores que interagem com ligantes solúveis, tais como citocinas e com moléculas da superfície das células. Receptores de citocinas, como IL-15R, IL-2R, IL-21R, estão envolvidos no desenvolvimento de células NK e função efetora. Em particular, IL-15 é necessária para a maturação e sobrevivência de células NK (VIVIER, 2011). Os subconjuntos de células NK diferem no padrão de receptores inibidores e ativadores codificados na linha germinal, como também em relação à expressão diferencial de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas (CROME, 2013).

A combinação de todos os receptores, com a expressão exclusiva de alguns deles por certas subpopulações de células NK e a variedade genética intrínseca de cada indivíduo gera populações de células NK eficientes, mas bastante heterogêneas. Acredita-se que a expressão genética de uma ampla diversidade de receptores nas células NK determinem os mecanismos utilizados por elas para debelar infecções ou neoplasias. Dentre esses receptores, os KIR (receptores de células natural killer) são importantes no reconhecimento de MHC classe I presente nas células normais do organismo, reconhecendo-as como células próprias (SANZ, 2013).

Estudos têm mostrado que as células NK sofrem um processo de maturação funcional para desempenhar estas funções, ou seja, para que as células NK possam atingir seu potencial efetor total, há necessidade de interação entre seus receptores e as citocinas como IL-15 liberadas por DC e IL-12 e IL-18 liberadas por macrófagos (VIVIER, 2001).

Os receptores de células NK se classificam em dois grupos, os ativadores e inibidores. Os receptores inibidores apresentam uma cauda citoplasmática grande (DL ou *domain large*) com uma ou mais sequências ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). A ativação desses receptores levaria à inibição das células NK. Há duas famílias de receptores inibitórios, a família dos KIR (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*), um subconjunto amplo e diversificado de receptores envolvidos no reconhecimento de moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e a família de lectinas tipo C, que inicialmente representava os receptores ativadores, até descobrir-se o CD94/NKG2A inibitório. Os receptores KIR inibidores caracterizam-se por apresentar DL com sequências de ITIM e três domínios de imunoglobulinas extracelulares, exceto o KIR2DL que, embora tenha DL, apresenta sequências ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), sendo, portanto um receptor ativador (SANZ, 2013).

Os receptores ativadores seriam uma associação de proteínas adaptadoras (DAF12) com sequências ITAM em seus domínios intracelulares. Estas sequências são necessárias para que as células NK sejam ativadas e exerçam sua atividade efetora citotóxica. Neste caso, os domínios citoplasmáticos são curtos (DS ou *domain short*) e traduzem uma ativação via molécula adaptadora DAF12 através de domínios ITAM. Frequentemente, apresentam dois domínios de imunoglobulinas extracelulares. Dentre os receptores ativadores pode-se diferenciar cinco famílias: os receptores ativadores KIR (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR2DS5 e KIR3DS1), os receptores de lectinas tipo C (NKG2D, CD94/NKG2C e CD94/NKG2E/H), os receptores com citotoxicidade natural (NCR), os domínios de imunoglobulinas (DNAM-1, 2CD244 e o CD16) e os TLR (TLR2,4 e TLR9) (SANZ, 2013).

Alguns receptores da família NCR são expressos exclusivamente pelas células NK, sendo utilizados como marcadores para identificação dessas células. Estes receptores são responsáveis pela citotoxicidade natural, uma vez que ao

ligarem-se aos receptores ITAM levam a uma ativação potente. A quantidade desses receptores expressos na superfície das células NK é proporcional à atividade citotóxica frente às células alvo e ao tamanho da massa tumoral (SANZ, 2013; VIVIER, 2011).

Outro receptor é o CD16, responsável pelo processo chamado de ADCC. A presença desse receptor na superfície das células NK, torna-a capaz de ligar-se com baixa afinidade à imunoglobulinas do isotipo IgG, levando as células NK de forma específica até a célula alvo, transmitindo sinais de ativação sobre a própria célula NK. Os sinais traduzidos pelos CD16 via domínio ITAM levam a uma atividade citotóxica potente e a secreção de citocinas (SANZ, 2013, VIVIER, 2011).

As células CD56^{bright} CD16^{dim} secretoras de citocinas expressam altos níveis do complexo de receptores inibitórios, reconhecem HLA-E, mas perdem a inibição via ligação de receptores KIR com MHC classe I. Ambos os subconjuntos de células NK expressam receptores de ativação NKG2D, NKp30 e NKp46. As células NK CD56^{dim} CD16⁽⁺⁾ são CD94⁽⁻⁾ NKG2A^(+/-) CD25⁽⁻⁾ CD117⁽⁻⁾ mas expressam KIR. As células CD56^{bright} CD16⁽⁻⁾ expressam um repertório mais completo de receptores inibitórios, provável origem ao limite superior necessário para a atividade citotóxica em relação aos seus homólogos CD56^{dim} CD16⁽⁺⁾. As células NK CD56^{bright} CD16⁽⁻⁾ expressam constitutivamente CD62L (L-selectina) e receptor de quimiocinas CC (CCR)7 que facilita seu recrutamento no sangue periférico e justifica sua maior capacidade de deslocamento para tecidos linfóides secundários e locais de inflamação. Finalmente, as células NK CD56^{dim} CD57⁽⁺⁾ terminalmente diferenciadas, têm sido sugeridas como a contrapartida de células NK de memória KLRG1⁽⁺⁾ descritas em camundongos (CROME, 2013).

Em hanseníase, estudos realizados com foco nas manifestações de padrão tuberculóide reacional, foram analisadas 10 biópsias de casos de forma dimorfa tuberculóide reacional não tratada e 10 de casos de hanseníase dimorfa com reação reversa (DRR), onde foi empregado o marcador CD57 para células NK. Observou-se que as células CD57⁺ estavam localizadas dentro e entre os granulomas, havendo aumento do número de células NK no grupo DRR (BARRETO, 2005).

Em outro estudo com biópsias da pele de três grupos de pacientes hansenícos, sendo 11 com diagnóstico clínico de NL e 23 crianças e 24 adultos com hanseníase tuberculóide clássica, onde foram empregados anticorpos anti-CD56 para marcar

células NK, sendo observado que as células NK eram células redondas e grandes, distribuídas esparsadamente no interior dos granulomas. Contudo, não houve diferença quantitativa dessas células entre os grupos (FAKHOURI, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Em revisão de literatura não foram encontrados estudos realizados em biópsias cutâneas de pacientes hansênicos, utilizando os marcadores de células NK, CD16 e CD56, e correlacionando sua imunoexpressão com as formas clínicas. Os trabalhos encontrados utilizavam CD57 ou CD56; estudando os mesmos em casos específicos, como em hanseníase tuberculóide reacional (BARRETO, 2005), ou em hanseníase nodular (NL) em criança versus hanseníase tuberculóide em adultos (FAKHOURI, 2003).

Estudos realizados em sangue periférico de humanos, utilizando citometria de fluxo, demonstraram que as células NK apresentavam subtipos que se diferenciavam pela intensidade da imunoexpressão de CD56 e CD16 em sua superfície membranar; conferindo funções distintas a estes subgrupos, onde células NK CD16⁺ apresentam elevada citotoxicidade, enquanto células NK CD56⁺ apresentam elevada produção de citocinas (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo foi observada uma redução na população absoluta de células NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) no sangue periférico de pacientes hansênicos, antes de intervenção terapêutica. Inicialmente, esta população foi comparada em relação a pacientes hansênicos após tratamento (Sólon, 2012), posteriormente, em relação a indivíduos saudáveis (Pinheiro, 2013), havendo em ambos os casos, normalização desta população de células após tratamento. Esses achados estimularam o estudo e a avaliação da presença destas células NK em lesões de pacientes com hanseníase, na tentativa de verificar se esta redução no sangue periférico poderia ou não estar relacionada à migração destas células para o local da lesão, como forma de controlar a infecção e debelar o patógeno. Desta forma, optou-se por estudar a presença das células NK, considerando a heterogeneidade de marcadores na sua superfície celular (CD16 e CD56), relacionando com as formas clínicas polares da doença, como também com as formas *borderlines*.

O primeiro estudo sobre a relação entre os principais marcadores de superfície de células NK em lesões de pacientes com as diferentes formas clínicas de hanseníase é o presente. O papel das células NK em hanseníase ainda é pouco compreendido.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a imunoexpressão de marcadores de células Natural Killer (NK), CD16⁺ e CD56⁺, em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase antes do tratamento.

4.2 Específicos

- Quantificar as subpopulações de linfócitos NK CD16⁺ e NK CD56⁺ em biópsias de pele de pacientes com hanseníase virgens de tratamento.
- Comparar as subpopulações de linfócitos NK em lesões de pacientes classificados como tuberculóides, *borderlines* e lepromatoso.
- Verificar a possível relação entre a expressão de células CD16⁺ e/ou CD56⁺ com o gênero, o resultado da baciloscopia e com as formas clínicas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

Estudo transversal retrospectivo de caráter observacional.

5.2. Aspectos Éticos

O projeto foi submetido à Plataforma Brasil para registro da pesquisa (nº do parecer: 139.628 / data: 28/11/2012), e após obter parecer favorável, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia e aprovado sob o número 009/2012 (Anexo).

5.3. Local do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Dermatologia Dona Libânia e no Laboratório de Técnicas Cito-histopatológicas Especiais (LABTECH) do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da FAMED (Faculdade de Medicina) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.4. Seleção dos pacientes

Foi realizado estudo baseado na avaliação de amostras histopatológicas provenientes do Laboratório de Patologia do Centro de Dermatologia Dona Libânia com diagnóstico clínico-laboratorial de Hanseníase, de acordo com a classificação de Ridley-Jopling.

Os dados foram coletados de prontuários dos pacientes cujas biópsias tiveram diagnóstico confirmado de hanseníase, selecionados a partir de alguns critérios: ter informações clínicas acerca de gênero, idade, procedência e informações relacionadas à patologia, tais como a forma clínica, carga bacilar no diagnóstico, classificação operacional, ter realizado biópsia de pele antes de tratamento prévio, exibir quantidade suficiente de material no bloco parafinado; não ter artefatos de fixação ou de outra natureza.

A seleção dos prontuários foi subdividida em três grupos de acordo com as formas clínicas: tuberculóide, *borderline* e lepromatosa. Dos 54 casos estudados, 19 eram da forma clínica tuberculóide (TT), 14 da forma *borderline* (BT, BB e BL) e 20 da forma lepromatosa (LL), sendo 1 caso da forma clínica indeterminada (I).

5.4.1 Critérios de inclusão

- Diagnóstico de hanseníase, segundo avaliação clínica e histopatológica por especialista em unidade de referência.

5.4.2 Critérios de exclusão

- Forma clínica neural pura;
- Ausência de biópsia cutânea no diagnóstico;
- Tratamento anterior de hanseníase há menos de 5 anos;
- Associação com outras doenças graves (HIV/aids, tuberculose, malária, leishmaniose tegumentar, calazar, doenças mieloproliferativas e linfoproliferativas) ou uso de imunossupressores.

5.5. Métodos

5.5.1 Histologia

De acordo com os laudos histológicos dos pacientes, as biópsias foram colhidas no local das lesões selecionadas com punch que variavam de 0,3 a 0,8 cm.

Após seleção dos blocos parafinizados, o material foi submetido à microtomia, em micrótomo digital Leica®, obtendo-se cortes com espessura de 4 µm que foram colocados em lâminas comuns para coloração com Hematoxilina & Eosina, e em lâminas silanizadas para realização da imunoistoquímica.

Os casos selecionados foram examinados microscopicamente, por um patologista experiente para confirmar tanto o diagnóstico histopatológico existente no prontuário, quanto para confirmar as formas clínicas de acordo com a classificação de Ridley-Joppling. Essa análise foi realizada em pelo menos dois

cortes de cada caso corados em HE. O patologista também realizou a leitura das lâminas de imunistoquímica.

5.5.2 Imunoistoquímica

5.5.2.1 Padronização da técnica

Para a realização da técnica de imunistoquímica, os blocos de parafina contendo os fragmentos de pele foram cortados em micrótomo, na espessura de 4 µm e montados em lâminas silanizadas. Foram confeccionadas duas lâminas de cada amostra contendo dois cortes cada. Para a pesquisa de CD16⁺, empregou-se anticorpo monoclonal de coelho anti-humano *CD16a (clone SP189) da Spring Bioscience®* como anticorpo primário. E para a pesquisa de CD56⁺, empregou-se anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano *CD56 (clone 123C3) da Dako®*.

A título de padronização, foram avaliadas diferentes concentrações de diluição do anticorpo, visando obter uma melhor visualização dos marcadores, sem a ocorrência de colorações inespecíficas (“background”). Para essa padronização foram utilizados tecidos de controles positivos. Para CD16⁺ e CD56⁺ foram obtidos secções de tecidos de pulmões e tumor carcinoide, respectivamente, conforme recomendações do fabricante.

Na primeira tentativa, para a determinação do título do anticorpo primário, foram feitas reações de imunistoquímica, com as seguintes diluições dos anticorpos: 1/50, 1/100 para CD56 e 1/100 e 1/150 para CD16 em amostras de controle. Em seguida, foram testadas as diluições de 1/100 e 1/200 com *Linker* para CD56 e 1/100 com *Linker* e 1/200 sem *Linker* para CD16. As diluições dos anticorpos selecionadas foram a de 1/100 com *Linker* para CD56 e 1/100 sem *Linker* para CD16, em que os antígenos foram devidamente identificados nos fragmentos, sem a ocorrência de coloração de fundo. Como controle negativo, foi utilizada a mesma amostra do controle positivo, sem a adição do anticorpo primário durante a reação.

5.5.2.2 Técnica de Imunoistoquímica

Testes imunoistoquímicos para a evidenciação de CD16⁺ e CD56⁺ foram realizados para cada caso selecionado. Os cassetes contendo amostras de lesões de pele de pacientes hansênicos foram submetidos à microtomia, realizando-se secções de 4 µm de espessura, e a aposição dos cortes histológicos em lâminas silanizadas, sendo utilizados dois cortes por lâmina.

As lâminas silanizadas foram colocadas em suporte vertical para lâminas e levadas para a estufa, com temperatura estabilizada a 60°C, durante uma hora, com o objetivo de derreter o excesso de parafina e melhorar a aderência dos tecidos à lâmina.

Ao mesmo tempo, iniciou-se a preparação do tampão de recuperação antigênica. Utilizou-se o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution*, pH=9, código de referência K8000 - *Dako*[®], diluição 1:50. O tampão foi conservado na geladeira à temperatura de 2-8°C.

Em seguida, essa solução de 1500 ml (30 ml de tampão de recuperação antigênica + 1470 ml de água destilada) foi colocada em um tanque de módulo pré-tratamento *Dako*[®] *PT Link*, aparelho que proporciona um banho-maria em sistema fechado, com temperatura monitorizada e controlada automaticamente. Foi realizado o pré-aquecimento do sistema até 65°C durante trinta minutos.

Após uma hora, as lâminas foram retiradas da estufa e colocadas em suportes de lâminas do aparelho (“pentes”), as quais foram posicionadas no tanque do *Dako*[®] *PT Link* (Figura 5), onde foi acionado o segundo “run”, iniciando o aquecimento do sistema até a temperatura de 97°C, permanecendo nessa temperatura por trinta minutos. A seguir, o sistema foi novamente resfriado até 65°C, com o tempo total de processamento de aproximadamente uma hora e meia (Figura 4).



Figura 5: A foto A ilustra o aparelho *Dako*[®] *PT Link*, interligado ao computador, onde é realizada a recuperação antigênica com temperatura monitorizada e controlada automaticamente. A foto B mostra o aparelho aberto, onde é possível visualizar os 2 tanques de módulo pré-tratamento independentes, com capacidade de 24 lâminas por tanque. Fonte: Dados do autor.

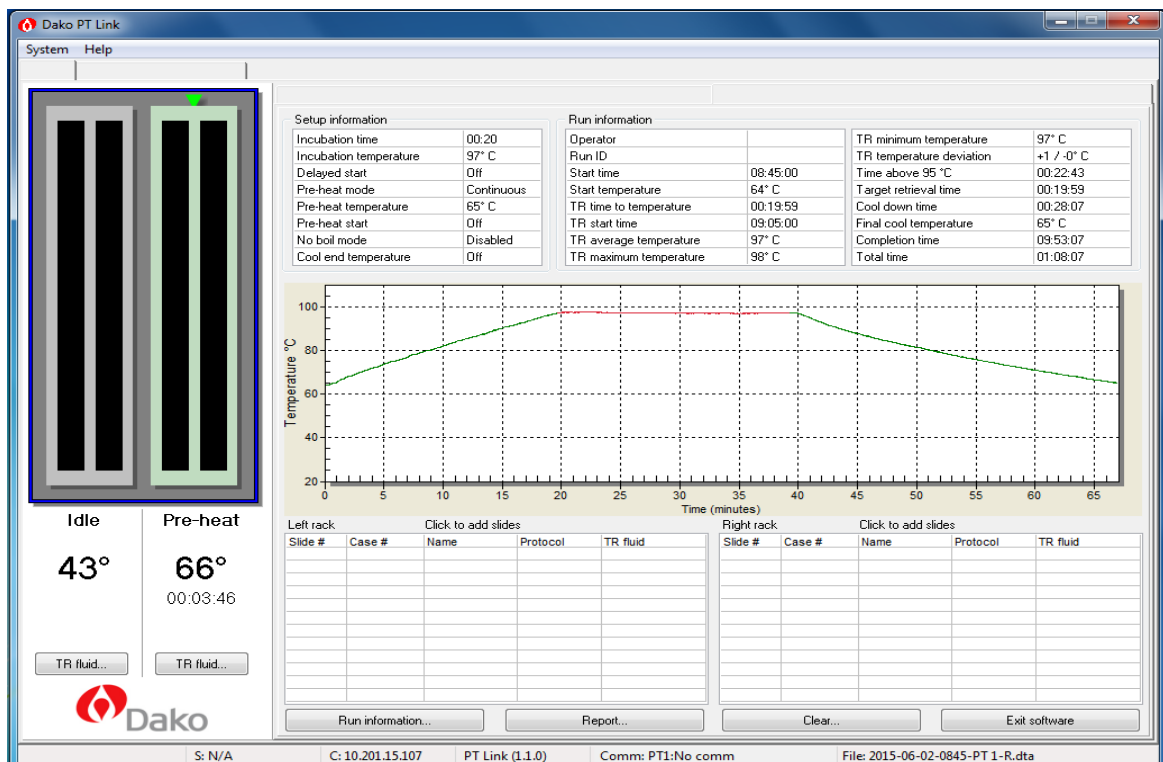


Figura 6 – Gráfico de Recuperação Antigênica - *Dako*[®] *PT Link*. Fonte: Dados do autor.

Esta etapa de recuperação antigênica possibilita, através do calor e da solução tampão, a quebra das pontes e ligações induzidas pela formalina, recuperando assim os epítomos antigênicos, promovendo também a reidratação dos cortes histológicos, permitindo, uma melhor ligação dos anticorpos aos epítomos (SHI; SHI; TAYLOR, 2011).

O material foi retirado dos tanques e as lâminas foram colocadas em um borrel contendo tampão de lavagem, durante 3 minutos. Essa lavagem foi feita três vezes consecutivas. Para a lavagem utilizou-se o tampão do kit (*Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*[®]), na diluição de 1:20.

Os cortes histológicos foram demarcados com caneta hidrofóbica (*Dako*[®] *Pen* – referência S2002), utilizada para demarcar a área em torno do corte histológico, impedindo o vazamento de reagentes.

Após as lavagens e a demarcação, as lâminas foram retiradas do tampão e submetidas ao bloqueio com peroxidase, utilizando *EnVisionTM Flex Peroxidase-Blocking* *Dako*[®] por 10 minutos. Esta etapa tem o objetivo de bloquear a peroxidase dos tecidos para evitar reação de fundo quando da etapa de coloração.

Quadro 1 – Informações sobre os anticorpos e sua metodologia de incubação.

Anticorpo	Clone	Especificidade	Diluição	Incubação
Anti-CD16 <i>Spring</i> <i>Bioscience</i> [®]	Monoclonal (clone SP189)	Anti-humano produzido em coelho	1:100	1 hora, câmara úmida, temperatura ambiente.
Anti-CD56 <i>Dako</i> [®]	Monoclonal (clone 123C3)	Anti-humano produzido em camundongo	1:100	1 hora, câmara úmida, temperatura ambiente.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão, por três vezes consecutivas, sendo 3 minutos cada lavagem. Seguiu-se a incubação com os anticorpos primários, ambos na diluição 1:100. Utilizou-se o anticorpo monoclonal de coelho anti-humano CD16a (clone SP189) da Spring Bioscience[®] e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano CD56 (clone 123C3) da *Dako*[®] (Quadro 1). Foi realizada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, e o conjunto permaneceu em incubação por uma hora, em câmara úmida em temperatura

ambiente. Após incubação, foram realizadas três lavagens de 3 minutos cada, com o tampão diluído 1:20 (*Wash Buffer Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*[®]).

As lâminas foram separadas em dois grupos, utilizando borrel distintos. Um grupo para marcação com o anticorpo CD56 utilizando o *Linker EnVisionTM Flex Mouse Dako*[®], com incubação de 30 minutos e um segundo grupo para o anticorpo CD16, não utilizando o *Linker EnVisionTM Flex Mouse Dako*[®].

As lâminas marcadas com CD16, nas quais não foi utilizado incubação com o *Linker*, seguiram para incubação com o polímero livre de biotina *EnVisionTM Flex/HRP Dako*[®] por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 3 minutos com tampão de lavagem, e logo após, foi feita a coloração com a incubação do cromógeno *Dako*[®] DAB durante cinco minutos e posterior lavagem das lâminas em água corrente. Após, incubação com o *Linker*, o grupo de lâminas marcadas com CD56, seguiu o mesmo protocolo do primeiro grupo.

Em seguida, foi feita a contra coloração de ambos os grupos com hematoxilina de Meyer por 1 minuto, seguida de banhos em água destilada e água corrente. Após essa etapa, foram realizadas três passagens em álcool absoluto, para desidratação e três passagens em xilol, para diafanização ou clareamento. Por último, foram realizadas as montagens das lâminas, através da fixação das lamínulas, utilizando Bálsamo do Canadá.

Após secagem das lâminas, os cortes foram avaliados em microscópio óptico com investigação de presença de células coradas em marrom. As amostras foram examinadas por dois observadores e os resultados discordantes foram resolvidos no consenso.

5.5.2.3 Controles

Os controles positivos para CD16 e CD56 foram obtidos a partir de secções de tecidos de pulmões e tumor carcinóide, respectivamente, que coram fortemente com a proteína de adesão (Figuras 7A e 7C). Os controles negativos foram obtidos a partir da supressão do anticorpo primário (Figuras 7B e 7D).

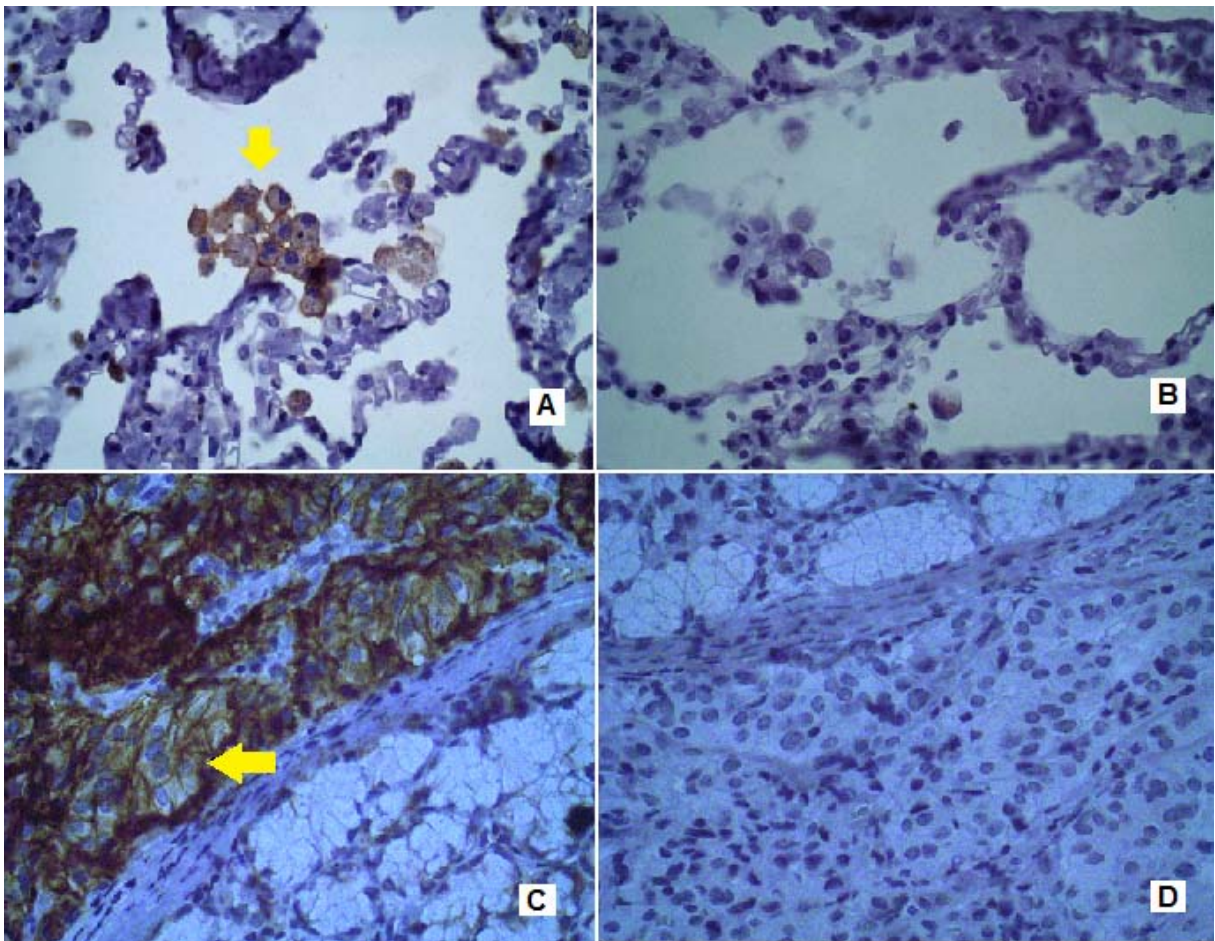


Figura 7: – Imunoistoquímica para CD16 e CD56 em tecido pulmonar e de tumor carcinóide, respectivamente, utilizados como controle da reação. A foto A representa o controle positivo para o marcador CD16: marcação membranar nos macrófagos alveolares (seta amarela). A foto B ilustra o controle negativo para o marcador CD16 com ausência de marcação membranar nos macrófagos alveolares. A e B: Tecido pulmonar. A foto C representa o controle positivo para o marcador CD56: marcação membranar e citoplasmática nas células do tumor carcinóide. A foto D ilustra o controle negativo para o marcador CD56 com ausência de marcação. C e D: Tumor carcinóide. Aumento de 400x. Fonte: Dados do autor.

5.5.2.4 Avaliação individual e entre observadores

Os preparados histológicos para os marcadores de superfície CD16⁺ e CD56⁺ foram analisados pelo autor deste trabalho e por um patologista experiente, em microscópio AXIO Scope A1 Zeiss[®] (Figura 8).

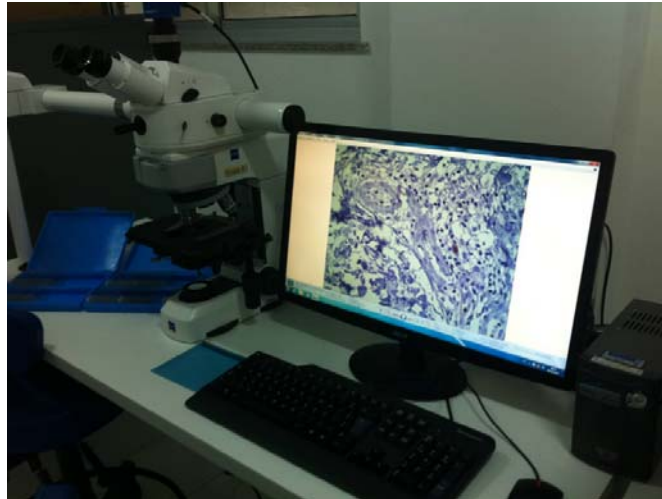


Figura 8: Microscópio AXIO Scope A1 Zeiss[®]. Fonte: Dados do autor.

5.5.3 Baciloscopia

Os resultados foram obtidos nos laudos laboratoriais dos prontuários dos pacientes.

5.6 Avaliação Quantitativa

Os cortes imunomarcados foram avaliados em microscópio AXIO Scope A1 Zeiss[®] em aumento de 400x. Foram analisados todos os campos da biópsia, sendo utilizados dois fragmentos da lesão por lâmina. Foram quantificadas as células que apresentaram imunomarcagem acastanhada característica e inequívoca, tanto na membrana quanto no citoplasma, para ambos os marcadores (CD16 e CD56).

5.7 Análise estatística

Neste trabalho foi utilizado o teste exato de Fisher para dados categóricos, como nas correlações clínico-patológicas e nos dados demográficos, quando a comparação foi entre dois grupos. O teste de Qui-quadrado para comparação entre três ou mais grupos. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações de medianas de dados numéricos de três amostras independentes que não apresentaram uma distribuição normal. Enquanto o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de medianas entre dois grupos que não apresentaram distribuição normal.

O valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo. Foram utilizados os programas *GraphPad Prism*TM versão 6 e *Excel*[®] para realização dos testes estatísticos e confecção dos gráficos.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostra

A população de pacientes com hanseníase foi composta de 54 pessoas, das quais 31 (57,4%) foram do gênero masculino e 23 (42,6%) do feminino. Observou-se o predomínio de pacientes do gênero masculino em relação ao gênero feminino (figura 9). A idade variou de 9 a 63 anos, sendo que 68% dos pacientes estavam entre a faixa etária de 30 a 60 anos. A figura 10 representa a distribuição do gênero da população em estudo em relação à faixa etária.

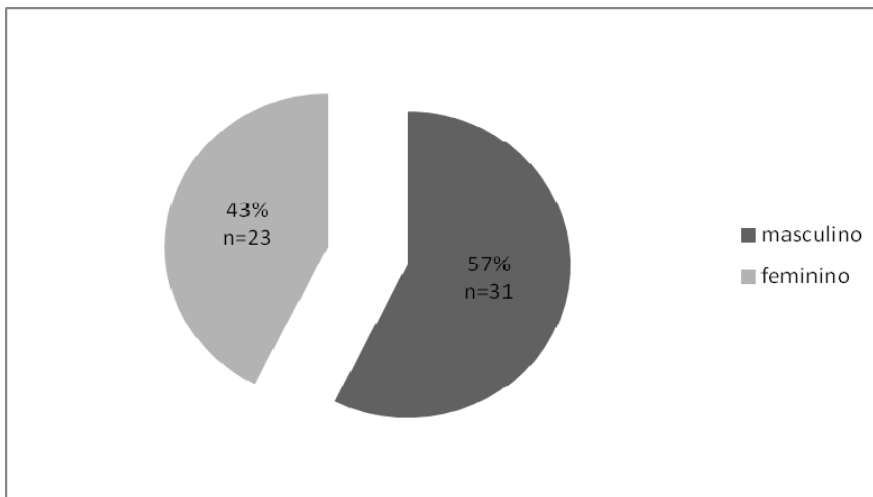


Figura 9: Representação da população quanto ao gênero.

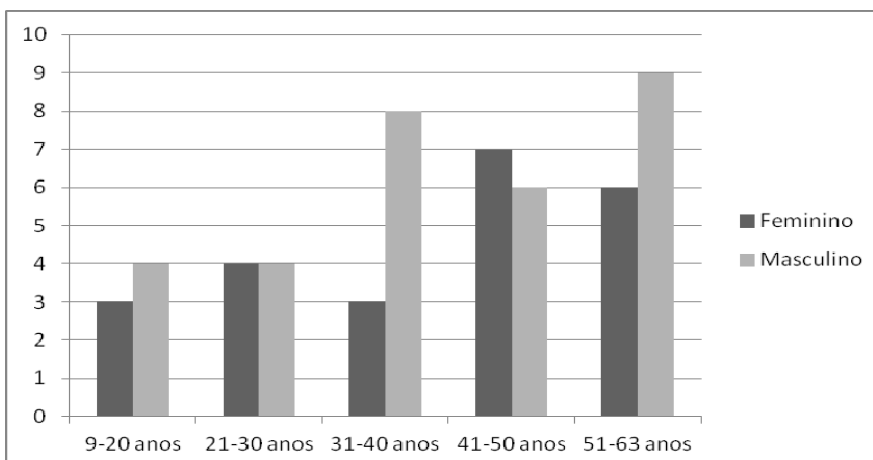


Figura 10: Representação da distribuição do gênero da população em estudo em relação à faixa etária. Fonte: Dados do autor.

A figura 11 representa a distribuição do gênero da população em estudo em relação às formas clínicas. Dezenove pacientes (35,18%) apresentavam a forma clínica TT, quatorze (25,92%) as formas B, vinte (37,03%) a forma LL e apenas um (1,85%) a forma I.

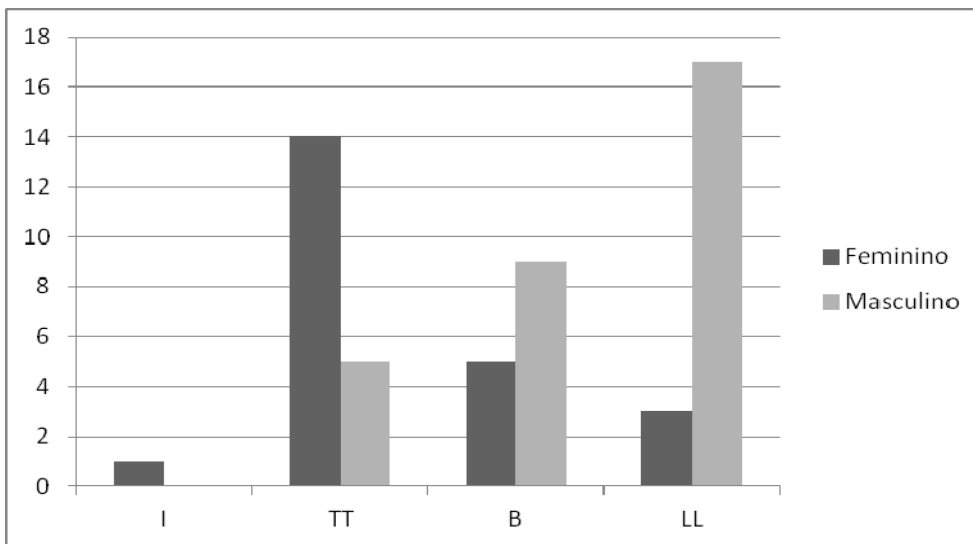


Figura 11: Representação da distribuição do gênero da população em estudo em relação às formas clínicas. Fonte: Dados do autor.

6.2 Comparação entre a imunexpressão e os dados demográficos e as variáveis clínico-patológicas

Foi realizada a comparação da imunexpressão dos marcadores CD16⁺ e CD56⁺ em relação ao gênero masculino e feminino, as baciloscopias positivas e negativas e entre as formas clínicas da doença (TT, *borderlines* e LL).

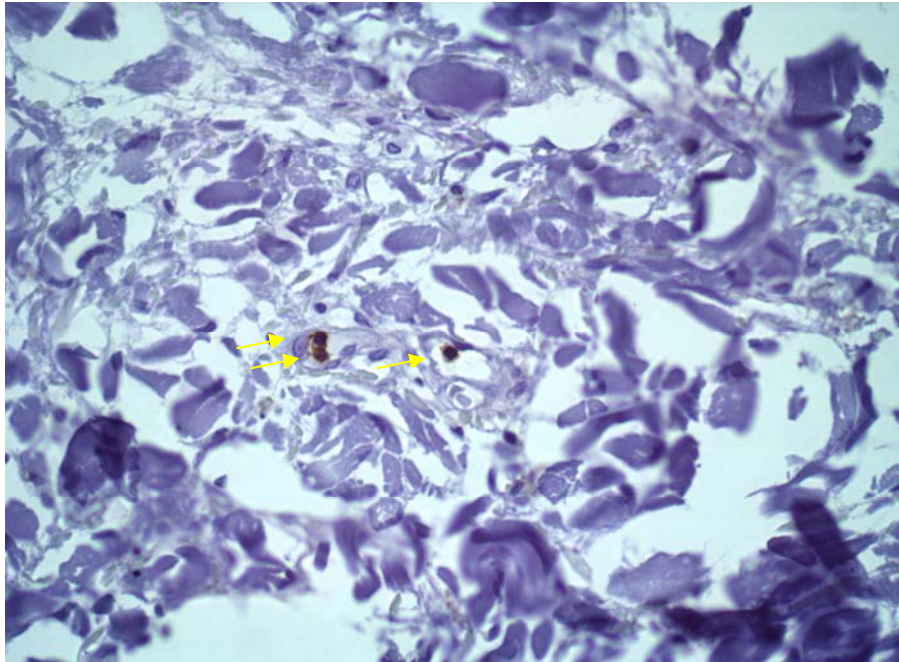


Figura 12: Imunoistoquímica para CD16 em lesão do grupo TT. Foi observado presença de 3 células (setas amarelas) com imunomarcção acentuada para CD16⁺. Aumento de 400x. Fonte: Dados do autor.

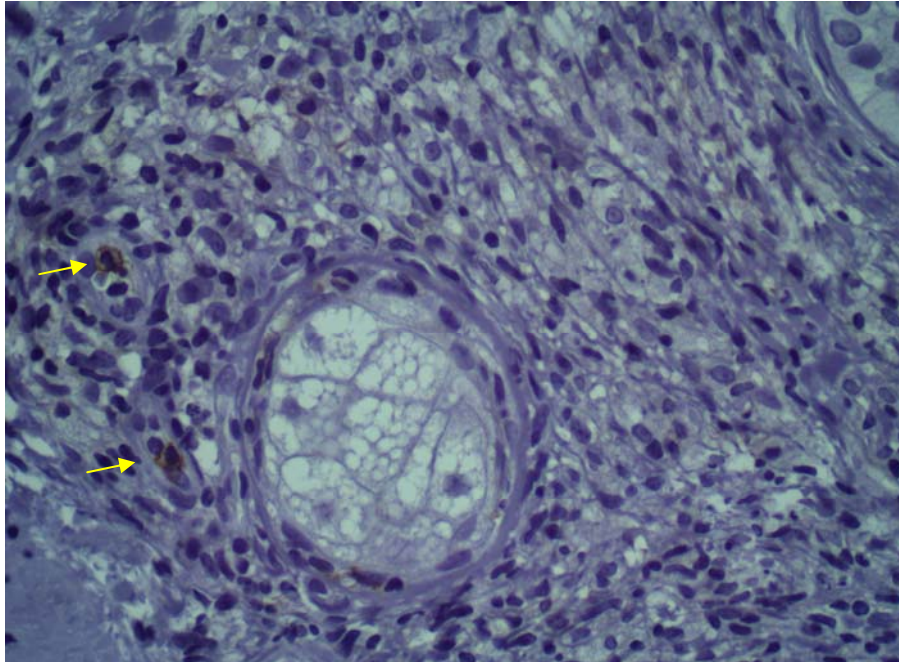


Figura 13: Imunoistoquímica para CD16. Presença de 2 células (setas amarelas) com imunomarcção acentuada para CD16⁺, corte histológico de forma clínica *borderline*. Aumento de 400x. Fonte: Dados do autor.

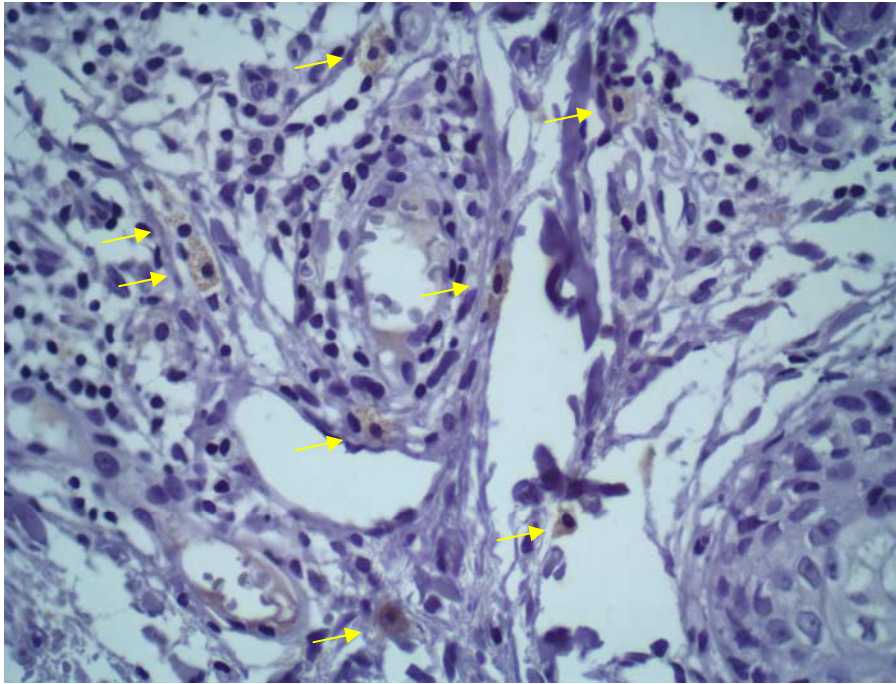


Figura 14: Imunoistoquímica para CD56. Presença de 8 células (setas amarelas) com imunomarcagem moderada para CD56⁺, corte histológico de forma clínica tuberculóide. Aumento de 400x. Fonte: Dados do autor.

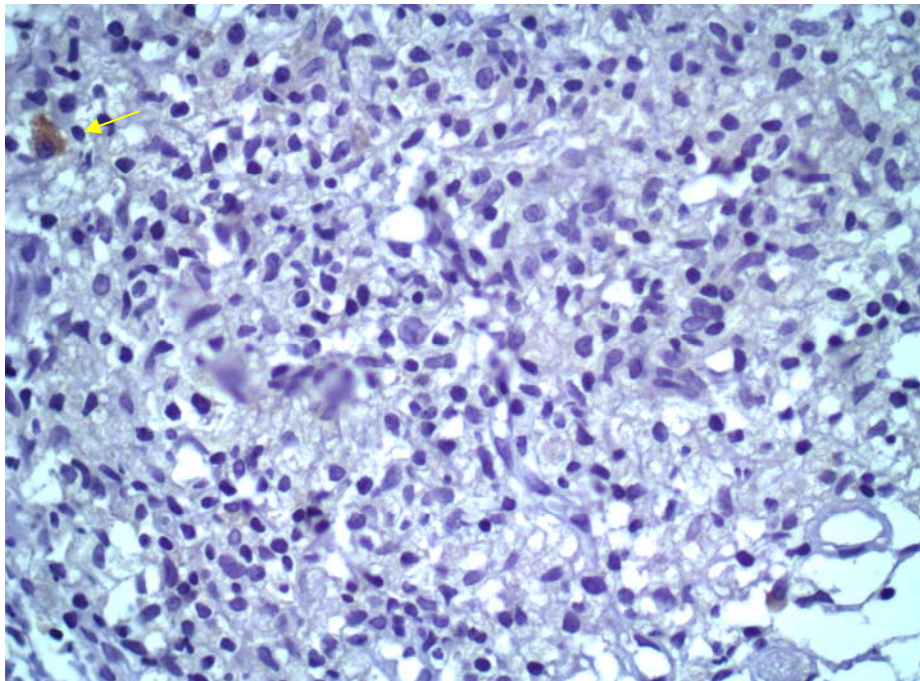


Figura 15: Imunoistoquímica para CD56. Presença de 1 célula (seta amarela) com imunomarcagem acentuada para CD56⁺, corte histológico de forma clínica lepromatosa. Aumento de 400x. Fonte: Dados do autor.

6.2.1 Imunoexpressão de CD16⁺

Considerando o gênero, demonstrou-se que a positividade da expressão de CD16⁺ foi maior no sexo feminino (14/23=60,87%) em comparação ao sexo masculino (8/31=25,81%) que, por sua vez, apresentou uma baixa positividade (Tabela 1, Figura 16). E esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,0129$).

Na comparação da presença ou ausência de bacilos em relação à imunoexpressão de CD16⁺, observou-se que apesar de tendência para maior positividade da expressão de CD16⁺ em pacientes que apresentaram baciloscopia negativa (13/24=54,17%), quando comparados aos pacientes que apresentaram baciloscopia positiva (9/30=30,00%), a diferença entre os resultados obtidos não foram estatisticamente significantes ($p=0,0974$) (Tabela 1, Figura 17)

Para análise da imunoexpressão de CD16⁺, das 54 amostras analisadas, 19 (35,18%) apresentavam a forma clínica tuberculóide, 14 (25,92%) as formas *borderlines*, 20 (37,03%) a forma lepromatosa e apenas 1 (1,85%) a forma indeterminada. Em relação à imunoexpressão de CD16⁺ em linfócitos teciduais, das 53 amostras analisadas, já que a forma clínica indeterminada foi excluída da comparação por apresentar apenas uma amostra, observou-se maior frequência na forma tuberculóide (12/19=63,16%) em comparação às outras formas clínicas: formas *borderlines* (3/14=21,42%) e lepromatosa (7/20=35%). Salienta-se que as formas *borderlines* apresentaram menor prevalência.

Como mostra a figura 18, a comparação dessa imunoexpressão entre um grupo e outro, ou seja, entre a forma tuberculóide em relação às formas *borderlines* apresentou diferença estatística significativa ($p=0,0329$). Enquanto que na comparação entre a forma lepromatosa com as formas *borderlines* e tuberculóide, não houve diferença com significância estatística ($p=0,4674$ e $p=0,1128$, respectivamente). Através do teste Qui-quadrado, comparando os três grupos das formas clínicas da doença em relação ao número de casos positivos para a imunomarcagem com CD16⁺, foi observado diferenças estatísticas significativas ($p=0,042$) (Figura 18).

Tabela 1 - Correlação da expressão qualitativa de CD16⁺ em biópsias teciduais de pacientes hansênicos com dados demográficos e parâmetros clínico-patológicos.

Dados demográficos e Variáveis clínico-patológicas	Imunoexpressão de CD16 ⁺ (n de casos,%)			p
	N (%)	Negativa (%)	Positiva (%)	
Gênero				
Masculinos	31 (57,4%)	23 (74,19%)	8 (25,81%)	0,0129
Femininos	23 (42,6%)	9 (39,13%)	14 (60,87%)	
Baciloscopias				
Negativas	24 (44,44%)	11 (45,83%)	13 (54,17%)	0,0974
Positivas	30 (55,55%)	21 (70%)	9 (30%)	
Formas clínicas				
Tuberculóides (TT)	19 (35,18%)	7 (37,84%)	12 (63,16%)	0,0420
Borderlines	14 (25,92%)	11 (78,58%)	3 (21,42%)	
Lepromatosas (LL)	20 (37,03%)	13 (65%)	7 (35%)	
Total	54	32	22	

A forma clínica indeterminada foi excluída da comparação entre as formas clínicas por apresentar apenas uma amostra. Teste exato de Fisher para comparação de dois grupos e teste de Qui-quadrado para comparação entre três grupos.

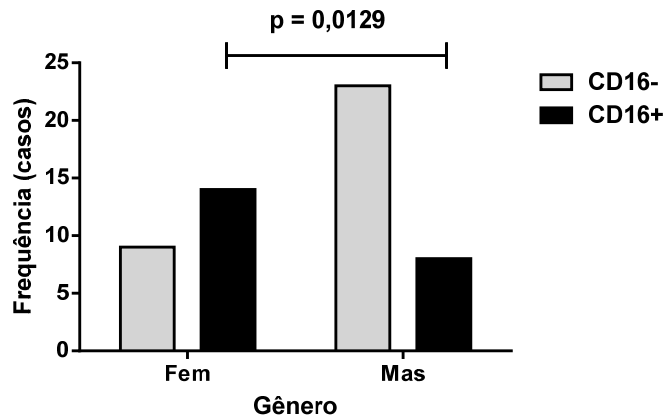


Figura 16: Imunoexpressão de CD16⁺ entre os gêneros masculino e feminino. Foi observada diferença estatística significativa na comparação entre os gêneros, com $p=0,0129$. Teste exato de Fisher. Fem: feminino, Mas: masculino. Fonte: Dados do autor.

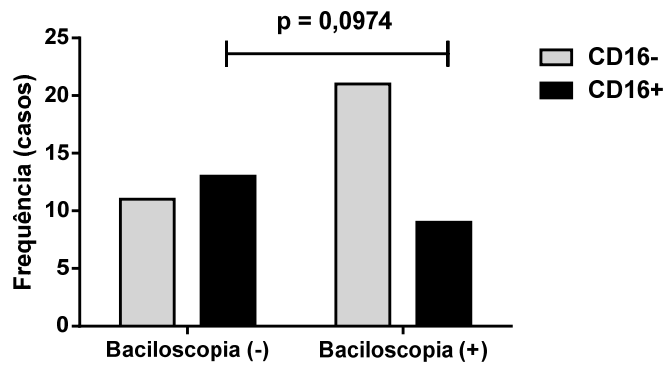


Figura 17: Imunoexpressão de CD16⁺ entre os resultados baciloscópicos negativos e positivos. Não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre os resultados baciloscópicos. Teste exato de Fisher. Fonte: Dados do autor.

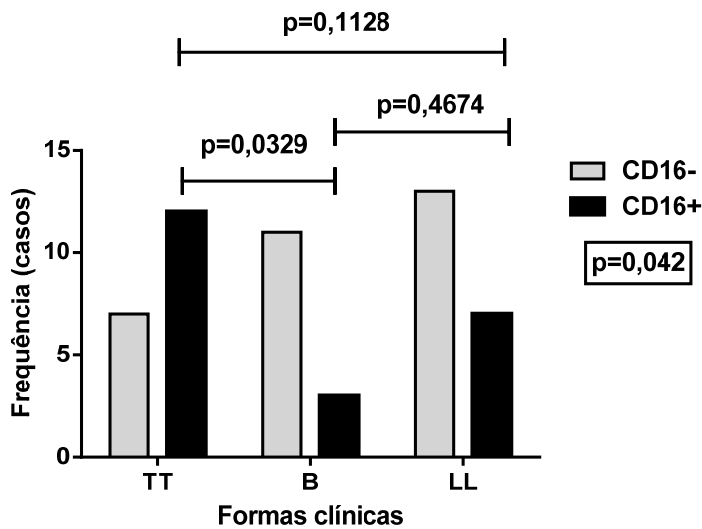


Figura 18: Imunoexpressão de CD16⁺ entre as formas clínicas. Foi observada diferença estatística significativa na comparação entre as formas clínicas TT e B, com $p=0,0329$, mas não foi observada diferença estatística significativa nas comparações entre B e LL ($p=0,4674$) e nem entre TT e LL ($p=0,1128$) pelo teste exato de Fisher. Em comparação entre as três formas clínicas pelo teste de Qui-quadrado, $p=0,042$. TT: tuberculóide, B: *borderline* e LL: lepromatosa. Fonte: Dados do autor.

Através do teste Kruskal-Wallis, comparando os três grupos das formas clínicas da doença em relação ao número de células imunomarcadas com CD16⁺ (apêndice), foi observado que a forma tuberculóide apresentou mediana igual a 2, com valor máximo de 17 e mínimo de 0; a forma *borderline* apresentou mediana igual a 0, valor máximo de 7 e mínimo de 0, enquanto a forma lepromatosa apresentou mediana igual a 0, com valor máximo de 3 e mínimo de 0. Observou-se que a mediana do grupo tuberculóide foi maior, conferindo significância estatística ($p=0,0085$) (Figura 19).

6.2.2 Imunoexpressão de CD56⁺

Considerando o gênero, demonstrou-se que a positividade da expressão de CD56⁺ foi maior no sexo feminino (19/23=82,61%) em comparação com o sexo masculino (18/31=58,06%), mas sem significância estatística ($p=0,0773$) (Tabela 2), como representado na figura 21.

Quando se comparou a expressão de CD56⁺ em relação à presença ou ausência de bacilos, observou-se uma predominância de positividade da expressão de CD56⁺ em ambos os casos, tanto na baciloscopia positiva (20/30=66,67%) quanto na baciloscopia negativa (17/24=70,83%). Sem que os dados obtidos apresentem significância estatística, como mostra a figura 22.

Como mostra a tabela 2, em relação à imunoexpressão do CD56⁺ em linfócitos teciduais, das 53 amostras analisadas observou-se predominância de positividade em todas as formas clínicas, sendo as formas *borderlines* as mais positivas. Observou-se: 68,42% na forma tuberculóide (13/19), 85,71% nas formas *borderlines* (12/14) e 55% na forma lepromatosa (11/20). A comparação dessa imunoexpressão entre as formas clínicas da hanseníase: tuberculóide versus *borderlines* ($p=0,4157$), *borderlines* versus lepromatosa ($p=0,0764$) e tuberculóide versus lepromatosa ($p=0,5145$), não apresentaram diferença estatística. Através do teste Qui-quadrado, comparando os três grupos das formas clínicas da doença em relação ao número de casos positivos para a imunomarcagem com CD56⁺, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p=0,1680$). A figura 23 representa graficamente estes achados.

Tabela 2 - Correlação da expressão qualitativa de CD56⁺ em biópsias teciduais de pacientes hansênicos com dados demográficos e parâmetros clínico-patológicos.

Dados demográficos e Variáveis clínico-patológicas	Imunoexpressão de CD56 ⁺ (n de casos,%)			p
	N (%)	Negativa (%)	Positiva (%)	
Gêneros				
Masculinos	31	13 (41,94%)	18 (58,06%)	0,0773
Femininos	23	4 (17,34%)	19 (82,61%)	
Baciloscopias				
Negativas	24	7 (29,17%)	17 (70,83%)	0,7768
Positivas	30	10 (33,33%)	20 (66,67%)	
Formas clínicas				
Tuberculóides (TT)	19	6 (31,58%)	13 (68,42%)	0,1680
<i>Borderlines</i>	14	2 (14,29%)	12 (85,71%)	
Lepromatosas (LL)	20	9 (45%)	11 (55%)	
Total	54	17	37	

A forma clínica indeterminada foi excluída da comparação entre as formas clínicas por apresentar apenas uma amostra. Teste exato de Fisher para comparação de dois grupos e teste de Qui-quadrado para comparação entre três grupos.

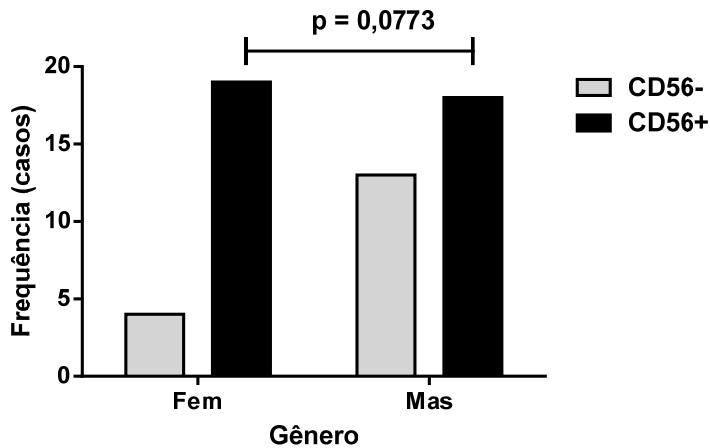


Figura 21: Imunoexpressão de CD56⁺ entre os gêneros masculino e feminino. Não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre os gêneros, com $p=0,0773$. Teste exato de Fisher. Fem: feminino, Mas: masculino. Fonte: Dados do autor.

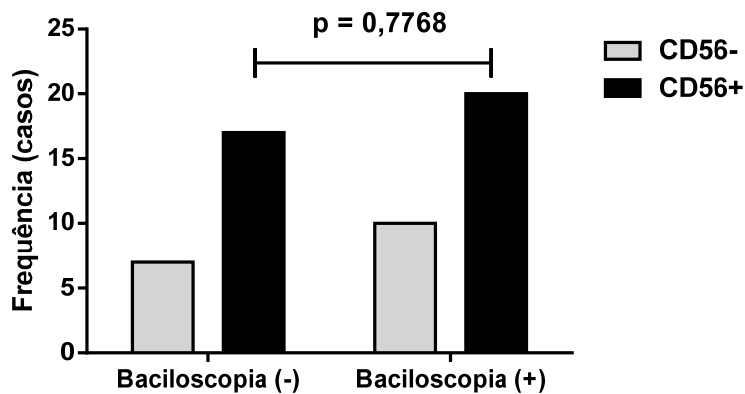


Figura 22: Imunoexpressão de CD56⁺ entre os resultados baciloscópicos negativos e positivos. Não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre os resultados baciloscópicos. Teste exato de Fisher. Fonte: Dados do autor.

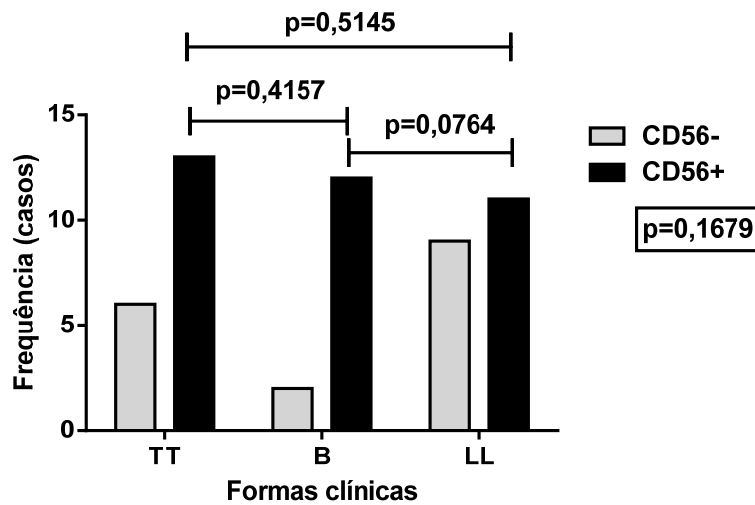


Figura 23: Imunoexpressão de CD56⁺ entre as formas clínicas. Através do teste exato de Fisher, comparando duas formas clínicas entre si: TT e B ($p=0,4157$), B e LL ($p=0,0764$) e TT e LL ($p=0,5145$), não foi observada diferença estatística significativa em nenhuma das comparações. Pelo teste de Qui-quadrado, comparando as três formas clínicas, também não foi observada diferença estatística significativa $p=0,1679$. Fonte: Dados do autor.

Através do teste Kruskal-Wallis, comparando os três grupos das formas clínicas da doença em relação ao número de células imunomarcadas com CD56⁺, foi observado que não há diferença entre a população de células e as formas clínicas, uma vez que o resultado foi estatisticamente não significativo, com $p=0,3595$. A figura 24 representa graficamente este achado.

7. DISCUSSÃO

Apesar de haver amplo conhecimento sobre a resposta imunológica desencadeada pela infecção por *M. leprae*, ainda se conhece pouco sobre a contribuição de células NK neste processo, reconhecendo-se que estas células estão envolvidas tanto em mecanismos de citotoxicidade inato quanto na produção de citocinas que atuam em células de imunidade adaptativa podendo exercer papel de regulação nesta resposta imunológica.

O presente estudo demonstrou que, de um universo de 23 pacientes do gênero feminino com hanseníase, aproximadamente 61% (14) deles apresentavam a forma clínica TT, enquanto na população masculina, dos 31 pacientes, apenas 16% (5) apresentaram esta forma clínica. Foi observada uma predominância de pacientes lepromatosos no gênero masculino. Observou-se que os pacientes do sexo feminino apresentaram positividade maior na imunoexpressão dos marcadores de superfície CD16 e CD56 nas células NK, apresentando para ambos marcadores uma positividade maior que 60%, o que não foi observado nos pacientes do sexo masculino, que apresentaram expressão desses marcadores em valores menores que 60%. Na análise isolada de cada marcador, foi encontrado resultados estatisticamente significantes apenas em relação a CD16, com $p=0,0129$. Esses resultados sugerem que a imunoexpressão desses marcadores pode ter influência não apenas genética, mas provavelmente hormonal, sendo necessários estudos mais elaborados para verificar tal hipótese.

Em estudo recentemente publicado foi demonstrada uma maior expressão do marcador CD16 em monócitos CD14⁺, caracterizando população de monócitos/macrófagos próinflamatórios, em mulheres acima de 51 anos de idade quando comparadas às mulheres em idade reprodutiva, sugerindo componente hormonal. Estas células foram analisadas em gordura perirenal e perivascular de rins de doadores saudáveis (KRÁLOVÁ, 2015). Para avaliar a influência do componente hormonal na expressão das células CD16 na população de pacientes com hanseníase, após separação da população em estudo por faixas etárias, não foi possível encontrar diferenças significativas quanto à expressão dos marcadores estudados ao agrupar-se os indivíduos do gênero feminino nas faixas etárias consideradas como idade reprodutivas, conseqüentemente com maiores produções

hormonais. Provavelmente a limitação a esta comparação ocorreu em virtude do número reduzido de amostras após a extratificação por faixa etária.

Considerando a presença ou a ausência dos bacilos, não foi observada diferença significativa tanto na imunoexpressão de CD16 ($p=0,0974$) quanto de CD56 ($p=0,7768$), mas observou-se que os pacientes que apresentaram baciloscopia negativa, tiveram uma tendência a uma maior positividade da imunoexpressão tanto para CD16, quanto para CD56, enquanto que os pacientes com baciloscopia positiva apresentaram menor imunoexpressão de CD16 e maior imunoexpressão de CD56. E isso corroborou com os achados das formas clínicas tuberculóides do presente estudo que apresentaram aumento de positividade em ambos os marcadores avaliados.

A análise dos marcadores CD16 e CD56 foi motivada, sobretudo, pela observação em estudo prévio de diferenças na concentração das células CD16⁺ em sangue periférico de pacientes com hanseníase antes do tratamento (Pinheiro, 2013; Sólón, 2012). Contudo, não foi possível no presente estudo acompanhar o mesmo grupo de pacientes avaliado previamente no estudo anterior e, desta forma, fazer uma comparação dos dados encontrados no sangue periférico, com os dados encontrados nas lesões, uma vez que a população em que foi estudado o sangue periférico era pequena e em grande parte compreendida de pacientes com formas clínicas *borderlines*.

Comparando a imunoexpressão de CD16 e CD56 em linfócitos teciduais em relação às formas clínicas de hanseníase, observou-se que mais de 60% da positividade de células CD16⁺ e CD56⁺ foram encontradas na forma tuberculóide. Já nas formas *borderlines* e nas formas lepromatosas, esse mesmo fato, não foi observado. Verificou-se uma maior expressão de CD56 em relação a CD16 em ambos os casos, sendo essa diferença mais expressiva nas formas *borderlines*.

Considerando que as duas principais funções das células NK são convencionalmente associadas aos seus subgrupos, e considerando que a atividade citolítica é mais confinada a elevada expressão de CD16 e que a produção de citocinas e a função imunoreguladora estão diretamente ligadas às células NK que expressam maior quantidade de CD56 (CROME, 2013; DE MARIA, 2011), pode-se sugerir que, para que haja uma resposta imunológica eficiente, como na forma tuberculóide, que debela *M.leprae*, é necessário que ambos os subtipos de células NK estejam

presentes, havendo um equilíbrio de suas funções, tanto citolítica quanto imunoreguladora.

Em monócitos circulantes a expressão de CD16⁺ está associada à maior produção de TNF- α e maior chance de apoptose destas células quando infectadas por *M. tuberculosis* (CASTAÑO; GARCIA; ROJAS, 2011). Outro estudo, por outro lado, mostrou que na tuberculose, a expressão de células CD14⁺CD16⁺ em conjunto com células CD3⁻CD16⁻CD56⁺, através de citometria de fluxo, conferem proteção contra tuberculose desde que não haja aumento na expressão de células CD3⁺CD56⁺ (BARCELOS, 2008). Quando se considera a expressão do marcador CD16⁺ em células NK a função biológica relacionada a este marcador é a citotoxicidade celular. Estes dados destacam que não é suficiente a observação apenas de uma população celular para que se compreenda como se comporta a resposta imunológica nestes indivíduos infectados por micobactérias.

Comparando cada marcador separadamente, em relação às diferentes formas clínicas, observou-se resultado estatisticamente significativo da imunoexpressão apenas do CD16 entre a forma tuberculóide em relação às formas *borderlines* ($p=0,0329$), provavelmente devido à baixa positividade encontrada nas formas *borderlines* e a alta positividade nas formas tuberculóides. Enquanto que na comparação entre a forma lepromatosa versus as formas *borderlines* e tuberculóide, não houve diferença estatística significativa ($p=0,4674$ e $p=0,1128$, respectivamente). No entanto, mesmo não tendo sido observada diferença entre a imunoexpressão de CD16 nas formas lepromatosas em relação à tuberculóide, pode-se destacar que houve clara tendência para redução da positividade destas células na forma lepromatosa (35% de casos positivos) quando comparados à tuberculóide (63% de casos positivos). Já em relação à imunoexpressão de CD56, não houve diferença estatística quando se comparou a imunoexpressão e as formas clínicas da hanseníase, a saber: tuberculóide versus *borderlines* ($p=0,4157$), *borderlines* versus lepromatosa ($p=0,0764$) e tuberculóide versus lepromatosa ($p=0,5145$).

Na análise da comparação do número de células marcadas por CD16 e CD56 versus as diferentes formas clínicas da doença, apenas CD16 apresentou resultado estatisticamente significativo, com $p=0,0085$. Observou-se um aumento no número de células marcadas por CD16 na forma tuberculóide, enquanto que comparando o número de células marcadas por CD56, entre os três grupos estudados, não houve

diferença significativa ($p=0,3595$). Em estudo prévio realizado por Barreto e colaboradores (2005), foram avaliadas 20 biópsias de pacientes com hanseníase e formas reacionais, sendo 10 casos de forma dimorfa tuberculoide reacional não tratada e 10 casos de hanseníase dimorfa com reação reversa. O marcador utilizado foi CD57, que é marcador tardio de células NK. O grupo de Barreto descreveu a presença de células NK CD57⁺ dentro e entre os granulomas teciduais, havendo aumento destas células no grupo com reação reversa. Não foram analisados os marcadores tradicionais de células NK, CD16 e CD56, assim como não foram analisados pacientes sem formas reacionais.

O marcador estudado CD57 foi inicialmente considerado como exclusivo de células NK, mas posteriormente foi verificado que também é expresso em linfócitos CD8⁺, bem como em algumas células de origem da crista neural. Dessa forma, atualmente se reconhece que o CD57 é expresso em um subconjunto de células NK funcionalmente distintas. Aparentemente pode ser um marcador de células NK com fraca atividade proliferativa, contrariamente ao que se observou com os marcadores avaliados no presente estudo, CD16 e CD56. Ademais, CD57 parece estar relacionado ao processo de imunosenescência da célula NK. Acredita-se que a aquisição de CD57 em células NK correlaciona-se com a maturação do subconjunto de células NK CD56^{dim}, com menor expressão de NKp46, NKp30, NKG2D, e NKG2A, e maior expressão de CD16, LIR-1, e KIR, sendo a expressão estável de CD57 provavelmente o passo final na maturação das células NK (NIELSEN, 2013).

Poucos estudos avaliaram expressão de células CD56⁺ em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase. Em 2003, Fakhouri e colaboradores, compararam a imunexpressão de vários marcadores celulares teciduais, por imunistoquímica, em biópsias de pacientes com hanseníase nodular e tuberculoide. Estes pacientes foram estratificados em três grupos, sendo 11 crianças com hanseníase nodular, 23 crianças com hanseníase tuberculoide e 24 adultos com hanseníase tuberculoide. Os marcadores avaliados foram CD45RO, CD4, CD8, CD68, CD20, S100+ e CD56. A forma nodular da hanseníase é descrita como benigna e encontrada em lactentes e crianças que convivem em ambientes com alta prevalência de doença. O grupo não encontrou diferenças na expressão das células CD56⁺ entre os grupos estudados. Este estudo acrescenta dado interessante à observação dos dados encontrados no presente estudo realizado com pacientes de Fortaleza. A amostra estudada no presente grupo

incluiu três indivíduos com 16 anos ou menos, sendo uma com 9, uma com 12, e uma com 16. Aparentemente, as diferenças etárias não representariam componente que determinaria mudanças na expressão dessas células.

Uma limitação no presente estudo foi a ausência de marcação simultânea de CD16 e CD56, uma vez que a expressão de CD16 também poderia ser observada em macrófagos. Contudo, a análise morfológica das células por profissional habilitado e experiente permitiu distinguir com clareza os macrófagos de linfócitos, sendo excluídos da contagem as células imunomarcadas com morfologia sugestiva de macrófagos.

A dupla marcação das células NK por imunistoquímica não permitiria a análise de intensidade descrita em estudos com citometria de fluxo, permitindo a determinação de células CD56^{dim} CD16^{bright}, por exemplo. Por outro lado, a dupla marcação nos permitiria identificar e correlacionar melhor as células NK com suas respectivas funções, como células citotóxicas ou reguladoras.

Pode-se concluir que as células NK possivelmente exercem papel relevante na imunopatogênese da hanseníase, sendo sugerido que para pacientes que apresentam forma clínica tuberculoide, portanto com resposta imunológica protetora, ocorre um equilíbrio entre os subgrupos de células NK CD16⁺ ou CD56⁺ contribuindo, provavelmente, para esta resposta protetora. Além disso, na forma tuberculoide há predomínio de células CD16⁺ (citotóxicas) quando comparadas às formas *borderline* e uma tendência de predomínio em relação à forma lepromatosa. Portanto, é possível que uma menor ação citolítica de células NK e predomínio de ação reguladora (produção de citocinas) poderia favorecer a disseminação do bacilo e evolução para formas bacilíferas e lepromatosas. Em adição, o estudo sugere que há possíveis influências hormonais ou genéticas na distribuição destes marcadores de função de células NK, uma vez que foi observada diferença na distribuição destes marcadores de acordo com o gênero dos pacientes.

8. CONCLUSÃO

O estudo sugere que pode haver possível influência hormonal ou genética na distribuição do marcador CD16⁺ na superfície de células NK, pois foi observada diferença estatística significativa na distribuição deste marcador de acordo com o gênero, onde sugere-se que os pacientes do gênero feminino possivelmente apresentavam uma maior resistência ao desenvolvimento da doença.

Outro achado importante, nos faz sugerir que os pacientes que possuem forma clínica tuberculóide, com resposta imunológica protetora, apresentaram um equilíbrio de imunoexpressão entre os subgrupos de células NK CD16⁺ e CD56⁺ contribuindo, provavelmente, para uma resposta protetora. Enquanto as formas *borderlines* e lepromatosas apresentam maior tendência a imunoexpressão de CD56⁺ em relação ao CD16⁺.

Foi observado também que ao comparar a imunoexpressão de CD16⁺ entre as formas clínicas, a forma tuberculóide cursa com predomínio de células CD16⁺ (citotóxicas) quando comparadas às formas *borderline*, apresentando igual tendência em relação a forma lepromatosa, apesar de não ter apresentado resultado estatístico significativo.

Sugere-se, desta forma, que uma menor atividade citolítica das células NK, com predomínio de atividade imunoreguladora (produção de citocinas) favorece ao polo lepromatoso e conseqüentemente à disseminação do bacilo. Conclui-se assim, que as células NK possivelmente exercem papel relevante na imunopatogênese da hanseníase, necessitando de estudos mais acurados para uma maior compreensão de suas atividade à nível de lesão.

9. REFERÊNCIAS

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

AZIZI, M. H.; BAHADORI, M. A. History of Leprosy in Iran during the 19th and 20th Centuries. **Archives of Iranian Medicine**, v. 14, p. 425-430, 2011.

BARCELOS,W.; SATHLER, A.R.; MARTINS, F.O.A.; CARVALHO, B.N; GUIMARÃES, T.M.; MIRANDA, S.S.; ANDRADE, H.M.; OLIVEIRA, M.H.; TOLEDO, V.P. Natural Killer cell subpopulations in putative resistant individuals and patients with active Mycobacterium tuberculosis infection. **Scand Journal Immunology**, v. 68 (1) p. 92-102, 2008.

BARRETO, J.A. **Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia.** Dissertação (Mestrado) – Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo, 2005.

BARKER, L.P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances Indian. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p.748-759, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 4**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil - análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. - Volume 44, nº 11, Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>>. Acesso em: 05 de agosto de 2015.

BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R. B.; BELISLE , J.T.; BLEHARSKI, J. R.;MAITLAND, M.; NORGDARD, M. V.;; PLEVY S. E.; SMALE, S. T.; BRENNAN, P. J.; BLOOM, B. R.; GODOWSKI, P. J.; MODLIN, R. L. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p.732-736, 1999.

CASTAÑO, D.; GARCIA, L.F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16⁺ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis**, v.91 (5), p. 348-360, 2011.

CEARÁ. Secretaria de Saúde. Situação Epidemiológica de Hanseníase no Ceará. Inf. Epidemiol. Hanseníase, set. 2014. Disponível em: <<http://portal.saude.ce.gov.br/saude>>. Acesso em: 05 de agosto de 2015.

CHIPLUNKAR, S. V.; DESHMUKH, M. V.; SAMSON, P. D.; BUTLIN, R.; BHATKI, W. S.; CHULAWALLA, R. G.; DEO, M. G.; GANGAL, S. G. Natural killer-cell-mediated

and antibody-dependent cellular cytotoxicity in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 58 (2), p. 334-341, 1990.

CONVERSE, P. J.; BJUNE, G. Natural killer (NK) cell activity and reversal reaction in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 54 (4), p. 503-509, 1986.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends in Immunology**, v. 22, p. 633-640, 2001.

CRESPO, M.J.I.; GONÇALVES, A.; PADOVANI, C.R. Haseníase: pauci e multibacilares estão sendo diferentes? **Revista Medicina** (Ribeirão Preto), v. 47(1), p.43-50, 2014.

CROME, S. Q.; LANG, A. P.; LANG, K. S.; OHASHI, P.S. Natural killer cells regulate diverse T cell responses. **Trends in Immunology**, v. 34 (7), p. 342-349, 2013.

CRUVINEL, W.D.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.A.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.D.; SILVA, N.P.S.D.; ANDRADE, L. E. C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50 (4), p. 434-361, 2010.

DE MARIA, A.; BOZZANO, F.; CANTONI, C.; MORETTA, L. Revisiting human natural Killer cell subset function revealed cytolytic CD56^{dim}CD16⁺ NK cells as rapid producers of abundant IFN- γ on activation. **PNAS**, v.108 (2), p.728-732, 2011.

EVERSLOH, M.L.; KILLIG, M.; ROMAGNANI, C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. **Frontiers in Immunology**. v. 4, 2013

FAKHOURI, R.; SOTTO, M.N.; MANINI, M.I.P.; MARGARIDO, L.C. Nodular leprosy of childhood and tuberculoid leprosy: a comparative, morphologic, immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction. **International Journal of Leprosy**, v 71, p. 218-226, 2003.

FLEURY, R. N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. **Hansenologia internationalis**, v.14, p.101-106, 1989.

FOSS. N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 30, p. 335-339, 1997.

GEETHA, N.R.; WEI, L.; SPENCER, J. S.; MAY, G.S.; SCHOBERLE, T.; SIZER, K. C.; SEO, Y.H.; HAN, X. Y. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**. v.130 (6), p. 856-864, 2008.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O; CUNHA, G.. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 365-375, 2002.

GRAY, J.D.; HIROKAWA, M.; OHTSUKA, K.; HORWITZ, D.A. Generation of an Inhibitory Circuit Involving CD8⁺ T Cells, IL-2, and NK Cell-Derived TGF- β : Contrasting Effects of Anti-CD2 and Anti-CD3. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 2248–2254, 1998.

HASAN Z, JAMIL B, ZAIDI I, ZAFAR S, KHAN AA, HUSSAIN R. Elevated serum CCL2 concomitant with a reduced *Mycobacterium*-induced response leads to disease dissemination in leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.63, p. 241-247, 2006.

HUMPHRES, R. C.; GELBER, R. H.; KRAHENBUHL, J. L. Suppressed natural killer cell activity during episodes of erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 49 (3), p. 500-508, 1982.

IYER, A. M. **Immunopathology of leprosy**: towards the search for diagnostic and prognostic biomarkers in elucidating pathobiology and their utility in patient care. 2009. 170f. Thesis - Department of Pathology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, 2009.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. Natural killer cells and immune surveillance. **Jornal de pediatria**, v. 84 (4), p. S58-S67, 2008.

KANG, T. j.; YEUN. C. E.; KIM. B. C.; VOCE. E. Y.; CHAE. G.T.; Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology**, v. 112, p. 674-680, 2004.

KAPLAN, G.; KIESSLING, R.; TEKLEMARIAM, S.; HANCOCK, G.; SHEFTEL, G.; JOB, C. K.; CONVERSE, P.; OTTENHOFF, T. H. M.; BECX-BLEUMINK, M.; DIETZ, M.; COHN, Z. A. The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin 2. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, p. 893–907, 1989.

KIMURA, H.; MAEDA, Y.; TAKESHITA, F.; TAKAOKA, L. E.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria infected macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.60 (3), p. 278–286, 2004.

KRÁLOVÁ, L.I.; POLEDNE, R.; FRONEK, J.; KRÁLOVÁ, A.; SEKERKOVÁ, A.; THIEME, F.; PITHA, J. Macrophase subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women. **Atherosclerosis**, v. 241 (1), p. 255-258, 2015.

KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9 (5), p. 525-532, 2003.

KUMAR, S.; NAGVI, R.A.; ALI, R.; RANI, R.; HANNA, N.; RAO, D.N. CD4+ CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. **Molecular Immunology**, v. 56 p. 513-520, 2013.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. D. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89 (2), p. 205-218, 2014.

LOCKWOOD, D. N. J.; SARNO, E.; SMITH, W. C. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution? **Leprosy Review**, v. 78, p. 317-320, 2007.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, L.; SAGILI, K.D.; CHADUVULA, M.V.; MOHAMMED, I.; BRAKEL, W.V.; 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 (12), p. e1327, 2011.

MARTINIUK F.; GIOVINAZZO, J.; TAN A.U.; SHAHIDULLAH, R.; HASLETT, P.; KAPLAN, G.; LEVIS, W.R. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.11, p.626-630, 2012.

MCCLEAN, K.; G/YESUS, E.; CENINI, P; DEMISSIE.A; AMARE, G. Phenotype and cytokine expression of intralesional cells in borderline leprosy. **International Journal of Leprosy**, v.62, p. 380-388, 1994.

MENDONÇA, V.A.; COSTA, R.D.; MELO, G.E.B.A.; ANTUNES,C.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 343-350, 2008a.

MENDONÇA, V.A., MELO, G.E.B.A.; TEIXEIRA, M.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; ANTUNES,C.M.; TEIXEIRA, A.L. Análise de receptores de quimiocinas na superfície de leucócitos de indivíduos infectados pelo *Mycobacterium leprae*: resultados preliminares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 95-98, 2008b.

MIRA, M. T.; ALCAÏS, A.; NGUYEN, V. T.; MORAES, M. O.; DI FLUMERI, C.; VU, H. T. *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v.12 (427), p. 636–640, 2004.

MISCH, E.A.; MACDONALD, M.; RANJIT, C.; SAPKOTA, B.R.; WELLS, R.D.; SIDDIQUI, M.R.; KAPLAN, G.; HAWN, T.R. Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 231, 2008.

MISRA, N.; MURTAZA, A.; WALKER, B.; NARAYAN, N.P.; MISRA R.S.; RAMESH, V.; SINGH, S.; COLSTON, M.J.; NATH, I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. **Immunology**, v.86, p. 97-103, 1995.

MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p.828-832, 1994.

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

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

MORAES, M.O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v. 77 (3), p. 189-200, 2006.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33(1), p. 90-98, 2015.

NIELSEN, C.M.; WHITE, M.J.; GOODIER, M.R.; RILEY, E.R. Funcional significance of CD57 expression on human NK cells and relevance to disease. **Frontiers in immunology**, v.4, article 422, Dec 2013.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy Today. 2014a. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>> Acesso em: 05 de agosto de 2015.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record v.89, n. 36, p. 389-400, 2014b. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2014/wer8936.pdf?ua=1>>. Acesso em: 05 de agosto de 2015.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 293-294, 2005.

OTTENHOFF, T. H. New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 20 (9), p. 419-28, 2012.

PAUST, S.; SENMAN, B.; ANDRIAN, U.H.V. Adaptive Immune Responses Mediated by Natural Killer Cells. **Immunology Review**. v.235, p. 286–296, 2010.

PAUST, S.; SENMAN, B.; ANDRIAN, U.H.V. Natural killer cell memory. **Nature Immunology** V.12, 2011

PINHEIRO, C.D. **Células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ e CD19⁺ em sangue periférico de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

POLI, A.; MICHEL, T.; THÉRÉSINE, M.; ANDRÈS, E.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **Immunology**, v. 126, p. 458–465, Apr 2009.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and gaps. **The Lancet Infectious Disease**, v.11, p. 464–470, 2011.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types of leprosy and constitute a third subset of non Th1, non Th2 T cells in man. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9 (7) p. e2338, 2013

SANZ, J.M.; TORRIJOS, C.G; MARTÍN, D.D; MARTÍN, A.P; Linfocitos natural killer. **Medicine**, v.11, p. 1728-1736, 2013.

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 (2), p. 338-381, 2006.

SCHEPERS, K.; ARENS R.; SCHUMACHER, T. N. M. Dissection of cytotoxic and helper T cell responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2695–2710, 2005.

SHI, S.R.; SHI, Y.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.59(1), p.13–32, 2011.

SOLON. V. R. M. **Estudo das populações linfocitárias em sangue periférico de pacientes com hanseníase**. Dissertação (Mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

SOUZA, A. D.; EL-AZHARY, R. A.; FOSS, N. T. Management of chronic diseases: an overview of the Brazilian governmental leprosy program. **International Journal of Dermatology**, v.48, p. 109–116, 2009.

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

STEINHOFF, U.; WAND-WÜRTTENBERGER, A.; BREMERICH, A.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium leprae renders Schwann cells and mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 2, p. 684–688, 1991.

SUN, J.C.; BEILKE, J.N.; LANIER, L. L. Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells. **Nature**. V. 29, p.557–561. 2009.

SUN, J.C.; BEILKE, J.N.; LANIER. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. **Nature Review Immunology**. v.11, p. 645–657. 2001

TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia tropical**: hanseníase. 3. ed. Manaus, AM: Tropical, 1997.

VAN BRAKEL, W.H. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. **Leprosy Review**, v. 71, p. S146-153, 2000.

VELLOSO, A. P.; ANDRADE, V. Hanseníase: curar para eliminar. Porto Alegre: Edição das autoras, 2002.

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

VIVIER, E.; RAULET, D.H.; MORETTA, A.; CALIGIURI, A.M.; ZITVOGEL, L.; LANIER, L.L.; YOKOYAMA, W.M.; UGOLINI, S. Innate or Adaptive Immunity? The example of Natural Killer Cells. **Science**, v.331, p.44, 2011.

YAMAMURA, M. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v.255, p.12, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE – PLANILHA COMPLETA DE DADOS.

Imunoexpressão de CD16 e CD56 em biópsias de lesão de pacientes hansênicos e variáveis clínico-patológicas.

Nº	Sexo	Idade	Forma clínica	Nºcél CD16	Nºcél CD16 (IL)	Nºcél CD16 (EL)	Nºcél CD56	Nºcél CD56 (IL)	Nºcél CD56 (EL)	Resultado da Baciloscopia	IB
1	M	46	TT	0			5	0	5	neg	0
2	F	44	TT	2	2	0	1	1	0	neg	0
3	F	41	TT	6	6	0	10	3	7	neg	0
4	F	29	TT	0			0			neg	0
5	F	53	TT	3	2	1	7	4	3	neg	0
6	F	18	TT	2	2	0	32	16	16	neg	0
7	F	28	TT	0			12	6	6	neg	0
8	F	19	TT	2	2	0	5	4	1	neg	0
9	M	9	TT	0			0			neg	0
10	F	16	TT	16	10	6	11	10	1	neg	0
11	M	12	TT	4	3	1	0			neg	0
12	F	49	TT	2	2	0	0			neg	0
13	F	47	TT	0			1	0	1	neg	0
14	F	59	TT	3	1	2	4	1	4	neg	0
15	M	32	TT	0			0			neg	0
16	F	30	TT	4	3	1	13	7	6	neg	0
17	M	17	TT	0			0			neg	0
18	F	51	TT	10	4	6	13	12	1	neg	0
19	F	33	TT	17	12	5	11	4	7	neg	0
20	F	59	BT	0			2	0	2	neg	0
21	F	52	BT	0			6	5	1	pos	1,8
22	F	44	BL	1	1	0	1	1	0	pos	4
23	M	51	BT	0			0			pos	0,25
24	M	25	BB	0			2	2	0	pos	2,5
25	M	35	BT	0			11	8	3	neg	0
26	M	55	BL	0			1	1	0	pos	4
27	F	34	BT	0			3	0	3	neg	0
28	M	36	BT	0			1	1	0	neg	0
29	M	25	BL	0			1	1	0	pos	3,25
30	M	63	BL	0			2	1	1	pos	5
31	M	56	BB	7	4	3	2	2	0	pos	3,5
32	F	39	BT	3	3	0	0			neg	0
33	M	37	BL	0			5	5	0	pos	3,75
34	F	49	I	0			13	9	4	pos	1,4
35	F	56	LL	1	0	1	2	2	0	pos	3,75
36	M	59	LL	1	1	0	5	3	2	pos	2,5

37	M	56	LL	0			6	6	0	pos	6
38	F	43	LL	0			1	1	0	pos	5,25
39	M	44	LL	0			4	4	0	pos	4
40	M	60	LL	1	1	0	1	0	1	pos	4,8
41	M	28	LL	0			0			pos	5,25
42	M	21	LL	1	1	0	4	4	0	pos	4,8
43	M	38	LL	1	1	0	27	27	0	pos	4
44	M	50	LL	2	2	0	0			pos	4,25
45	M	17	LL	0			0			pos	4,4
46	M	48	LL	3	3	0	35	35	0	pos	4,6
47	M	32	LL	0			0			pos	5
48	M	35	LL	0			0			pos	5
49	M	53	LL	0			7	4	3	pos	3,75
50	F	24	LL	0			0			pos	4,25
51	M	47	LL	0			0			pos	5,5
52	M	45	LL	0			0			pos	5,2
53	M	33	LL	0			3	3	0	pos	4,5
54	M	63	LL	0			0			pos	5,2

Abreviaturas. Gêneros: masculino (M), feminino (F). Formas clínicas: tuberculóide (TT), *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB), *borderline* lepromatosa (BL), lepromatosa (LL). Localização das células: intra-lesão (IL), extra-lesão (EL). Índice baciloscópico (IB)

ANEXOS

ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Saúde



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM DERMATOLOGIA SANITÁRIA DONA
LIBÂNIA - CDERM**

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto CEP/CDERM - 009/2012

Título: Imunohistoquímica de linfócitos teciduais (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ e CD19+) em biópsias cutâneas de pacientes com formas reacionais de hanseníase.

Pesquisador responsável: Catiússia Dantas Pinheiro

Proposição do (a) relator (a):

(X) aprovação

() não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP/CDERM: 11/12/2012

Data do parecer final do projeto pelo CEP/CDERM: 11/12/2012

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia CDERM, em sua reunião realizada em 11/12/2012, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do (a) Relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observações:

1. Projeto de Pesquisa Submetido na Plataforma Brasil através da UFC, com parecer **APROVADO**. Foi submetido para análise no Comitê de Ética do Centro de Referência Dona Libânia por ser a Instituição Co-participante no desenvolvimento do projeto e teve parecer favorável para **APROVAÇÃO** de acordo com o parecer do relator.
2. O(s) pesquisador (es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa ao CEP/CDERM.

Fortaleza, 13 de dezembro de 2012.

**CENTRO DE DERMATOLOGIA DONA LIBÂNIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
Maria Irismar da Silva Silveira
Dra. Maria Irismar da Silva Silveira
Coordenadora do CEP/CDERM