

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

DANIELA VENTIN PRATES REZENDE

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS T-REG EM
PACIENTES COM FORMAS POLARES DE HANSENÍASE E REAÇÕES
HANSÊNICAS.**

FORTALEZA

2013

DANIELA VENTIN PRATES REZENDE

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS T-REG EM
PACIENTES COM FORMAS POLARES DE HANSENÍASE E REAÇÕES
HANSÊNICAS.**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior
Coorientador: Prof. Dr. José Wilson Accioly Filho

FORTALEZA

2013

DANIELA VENTIN PRATES REZENDE

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS T-REG EM
PACIENTES COM FORMAS POLARES DE HANSENÍASE E REAÇÕES
HANSÊNICAS.**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Heitor de Sá Gonçalves
Centro de Dermatologia Dona Libânia (CDERM)

Ao meu marido Flávio e aos meus pais
Gilberto e Esther pela presença constante
durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta etapa vencida e mais uma conquista alcançada.

A minha família por estar sempre perto. A meus pais, Gilberto Nova Prates e Maria Esther Ventin de Oliveira Prates, pelo amor, apoio e incentivo de sempre. A meus irmãos, Fernanda Ventin de Oliveira Prates, Carolina Ventin de Oliveira Prates e Gabriel Ventin de Oliveira Prates, pelo estímulo e cumplicidade. Ao meu marido Flávio Miranda Rezende, companheiro de vida, ao meu lado até nos momentos em que estive ausente.

Ao Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior, meu orientador, pela dedicação e atenção dispensadas a mim, essenciais à conclusão deste mestrado.

Ao Prof. Dr. José Wilson Accioly Filho, coorientador, pelos constantes ensinamentos transmitidos com tanto zelo.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Patologia da Universidade Federal do Ceará, pelo conhecimento compartilhado durante as aulas, e pela atenção especial deferida aos mestrandos.

A Paula Palácios e Mila Aragão, secretárias do Mestrado em Patologia, pelo acolhimento e disponibilidade.

Aos colegas e amigos de mestrado, por tornarem esta jornada mais leve e divertida. Em especial às amigas Rosiane Teles e Daniela Monteiro, que tanto contribuíram para a realização desse mestrado.

A Renan Teixeira Lobo, acadêmico de medicina, pela ajuda fundamental no desenvolvimento da pesquisa.

A Dra. Cláudia Leal Macedo, patologista, professora do curso de medicina da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) Campus de Vitória da Conquista-BA, pelas valiosas contribuições nos momentos decisivos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ricardo Braga Júnior, professor de Bioestatística da Universidade Federal da Bahia (UFBA) Campus de Vitória da Conquista-BA, pela realização dos cálculos estatísticos.

À equipe do Laboratório Biogen, em especial a Elizabeth e Ignazio, pela execução da técnica de imunohistoquímica.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, pelo processamento das biópsias de pele.

À equipe do Hospital Universitário Walter Cantídio, que tanto se empenhou para me ajudar na seleção dos pacientes da pesquisa, em especial à Dra. Márcia Gonçalves Brasil, aos residentes de dermatologia, às enfermeiras e às auxiliares de enfermagem.

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, sem os quais sua realização não seria possível.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho.

“A vida é a manutenção de um estado de equilíbrio permanentemente ameaçado.”

(Jules Bordet, 1920)

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* e apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas que dependem da resposta imunológica do hospedeiro. Em um polo está a forma tuberculoide, na qual os pacientes apresentam uma resposta imunológica Th1 celular contra o bacilo, com formação de granulomas bem delimitados com doença localizada. No outro polo temos a forma virchowiana caracterizada pela ausência de imunidade celular específica ao *Mycobacterium leprae*, com padrão de resposta imunológica Th2, com macrófagos repletos de bacilos, mas com poucos linfócitos, sem formação de granulomas e com disseminação da doença. Além dos linfócitos Th1 e Th2, outra população de linfócitos T foi descrita recentemente. Os linfócitos T regulatórios desempenham um papel imunossupressor na atividade de outros linfócitos e de outras células inflamatórias e parecem participar da modulação da resposta imunológica em infecções crônicas em seres humanos e da autotolerância. Neste trabalho, foram analisadas 35 biópsias cutâneas de lesão de pacientes portadores de diferentes formas de hanseníase quanto à expressão dos marcadores celulares CD4, CD8 e FoxP3 por imunohistoquímica. Enquanto a expressão do CD4 foi maior nos pacientes portadores da forma tuberculoide da hanseníase, a expressão do CD8 mostrou-se maior nos portadores de hanseníase virchowiana. Quanto à expressão do FoxP3, esta foi maior nos portadores da forma virchowiana da hanseníase e da reação hansênica tipo 1 em relação aos indivíduos saudáveis. Parece que, assim como já demonstrado em outras doenças infecciosas granulomatosas, os linfócitos Treg participam da imunopatologia da hanseníase. Entretanto, estudos com maior número de pacientes são necessários, para um melhor entendimento da relação entre a presença desses linfócitos e a forma clínica da doença.

Palavras-chave: Hanseníase. Linfócitos T Reguladores. *Mycobacterium leprae*. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and presents a wide range of clinical manifestations, depending on the host immune response. At the tuberculoid pole, patients have an effective Th1 cellular immune response against bacillus, with well-demarcated granulomas, which limits the disease, while the lepromatous pole is characterized by the absence of specific cellular immunity against *Mycobacterium leprae*, with a Th2 immune response, uncontrolled proliferation of leprosy bacilli and a spread disease. In addition to Th1 and Th2 lymphocytes, recently other subset of T cells has been described. T regulatory lymphocytes play an immunosuppressive role in the activity of other cells and seem to participate in modulating the immune response in human chronic infections and self-tolerance. We performed immunohistochemical study on skin biopsies of 35 patients with different forms of leprosy using anti-CD4, anti-CD8 and anti-FoxP3 antibodies. There was an increased CD4 expression in tuberculoid patients and an increased CD8 expression in lepromatous patients. The FoxP3 expression was higher in lepromatous and reversal leprosy reaction patients. As previously demonstrated in other granulomatous infections, T regulatory cells may play a role in the immunopathology of leprosy. However, studies with larger series of patients are required to further elucidate the relationship between the presence of these cells and the clinical form of the disease.

Key-words: Leprosy. RegulatoryT-Lymphocytes. *Mycobacterium leprae* Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CTLA-4	Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos
DAB	3,3' Diaminobenzidina Tetrahydroclorido
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
IFN	Interferon
MHI	Hanseníase indeterminada
MHBB	Hanseníase borderline borderline
MHBT	Hanseníase borderline tuberculoide
MHBV	Hanseníase borderline virchowiana
MHT	Hanseníase tuberculoide
MHV	Hanseníase virchowiana
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Natural matadoras
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucléico
RR	Reação reversa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
Th	T auxiliar
TMA	Arranjo em matriz tecidual
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Linfócitos T reguladores
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos morfológicos do <i>M. leprae</i>	15
Figura 2 -	Relação entre o espectro clínico da hanseníase e a carga bacilar.....	18
Figura 3 -	Principais mecanismos pelos quais os linfócitos Treg podem suprimir a resposta de células T efetoras.....	25
Figura 4 -	Aspecto histológico de MHT em coloração de hematoxilina e eosina com aumento de 400X (A), 1000X (B) e 4000X (C)....	33
Figura 5 -	Aspecto histológico de MHV em coloração de hematoxilina e eosina com aumento de 400X (A), 1000X (B) e 4000X (C) ...	33
Figura 6 -	Aspecto microscópico do <i>M. leprae</i> em MHV por coloração de Wade com aumento de 1000X.....	34
Figura 7 -	Ilustração do bloco doador do TMA.....	35
Figura 8 -	Ilustração do bloco receptor do TMA.....	35
Figura 9 -	Imagem do software Histoquant®	38
Figura 10 -	Distribuição dos pacientes portadores de formas polares da hanseníase ou de reações hansênicas por sexo	40
Figura 11 -	Distribuição dos pacientes do grupo controle por sexo.....	41
Figura 12 -	Distribuição dos grupos de estudo de acordo com o diagnóstico	42

Figura 13 - Distribuição dos pacientes dos grupos de estudo e do grupo controle por faixa etária.....	44
Figura 14 - Imunoexpressão de linfócitos T CD4+ em MHT com aumento de 400X	46
Figura 15 - Imunoexpressão de linfócitos T CD4+ em MHV com aumento de 200X	47
Figura 16 - Imunoexpressão de linfócitos T CD8+ em MHT com aumento de 400X	47
Figura 17 - Imunoexpressão de linfócitos T CD8+ em MHV com aumento de 200X	48
Figura 18 - Imunoexpressão de linfócitos FoxP3+ em MHT com aumento de 400X	48
Figura 19 - Imunoexpressão de linfócitos FoxP3+ em MHV com aumento de 400X	49
Figura 20 - Expressão citológica de CD4 em casos de hanseníase	50
Figura 21 - Expressão citológica de CD8 em casos de hanseníase	51
Figura 22 - Expressão citológica de FoxP3 em casos de hanseníase.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos participantes por grupo de estudo e por sexo.....	43
Tabela 2 - Médias de idade por grupo de estudo	45
Tabela 3 - Distribuição de lâminas coradas por cada anticorpo por grupo de estudo.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Epidemiologia.....	14
1.2	Etiologia e forma de transmissão.....	14
1.3	Quadro clínico, classificação e aspectos imunopatológicos.....	17
1.4	Linfócitos T reguladores.....	22
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Desenho do Estudo.....	29
4.2	Casuística.....	29
4.3	Critérios de inclusão.....	30
4.4	Critérios de exclusão.....	30
4.5	Avaliação dermatoneurológica.....	30
4.6	Avaliação histopatológica.....	31
4.7	Coleta dos dados.....	31
4.8	Grupos de estudo.....	31
4.9	Coleta de amostras de pele e análise histopatológica	32
4.10	Arranjo em matriz tecidual (TMA)	34
4.11	Avaliação das populações de células CD4+, CD8+ e FoxP3+ por imunohistoquímica	36
4.12	Quantificação da imunoexpressão.....	37
4.13	Análise dos dados.....	38
4.14	Aspectos Éticos.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Descrição da amostra.....	40
5.2	Imunoexpressão.....	45
5.2.1	Detecção da população de células CD4+	49
5.2.2	Detecção da população de células CD8+.....	50
5.2.3	Detecção da população de células FoxP3+.....	52

6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICES.....	67
	ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A hanseníase faz parte do grupo de doenças, classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como negligenciadas. Desde 2004, o número de novos casos detectados no mundo vem apresentando tendência à redução. Durante o ano de 2011, foram detectados 219.075 novos casos da doença em todo o mundo. Índia, Brasil e Indonésia foram responsáveis por 83% dos casos detectados em 2011, sendo que a Índia ocupa o primeiro lugar com 58% dos casos (127.295), o Brasil ocupa o segundo lugar com 16% (33.955) e a Indonésia o terceiro lugar com 9% (20.023). A prevalência global registrada no início de 2012 era de 181.941 (WHO, 2012).

No Brasil, os coeficientes de prevalência da hanseníase apresentam tendência decrescente. Entretanto, as regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste são consideradas endêmicas. No Ceará, a hanseníase ainda constitui um sério problema de saúde pública. Em 2012 foram 2.066 casos notificados no Estado, alcançando um coeficiente de detecção geral de 24,0 /100.000 habitantes. Essa taxa é considerada pelo Ministério da Saúde como “muito alta”, sendo que o Ceará ocupa o 13º lugar em números de casos novos no país e o 4º lugar em número de casos novos no Nordeste. Deve-se considerar também, além do número de casos, o alto potencial incapacitante da hanseníase, uma vez que 63,1% dos casos de 2012 foram notificados na faixa etária entre 20 e 60 anos que corresponde à população economicamente ativa (CEARÁ, 2012; CEARÁ, 2013).

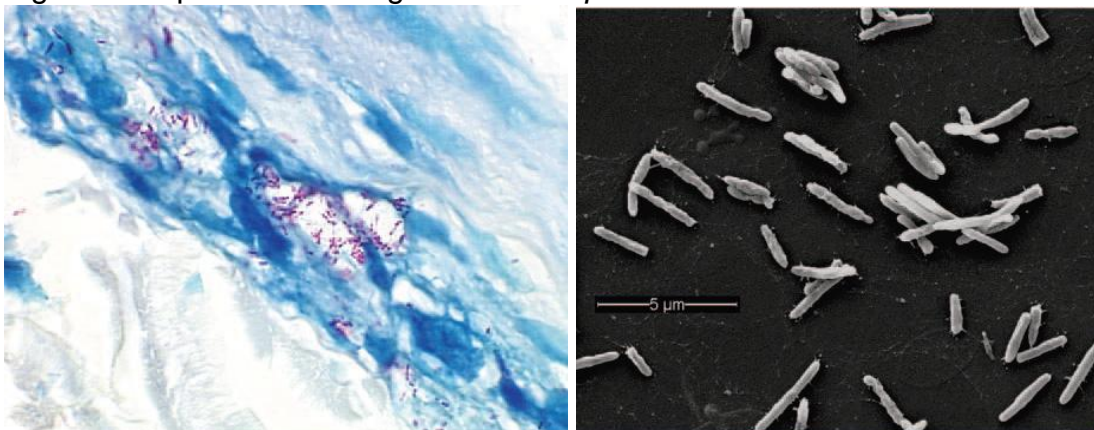
1.2 Etiologia e forma de transmissão

A origem exata da hanseníase é desconhecida, mas pesquisadores acreditam que esta tenha surgido na África oriental ou no Oriente médio e então tenha se disseminado para outras partes do mundo devido às migrações. Evidências da hanseníase foram encontradas na China, Egito, e Índia. Estudos em restos de esqueletos antigos, sugerem a existência da hanseníase na Índia no ano 2000 a.C. (AZIZI; BAHADORI, 2011).

Monot *et al.* em 2005 pesquisaram o genoma do *M. leprae* em pacientes de diferentes países e regiões geográficas e descobriu uma forte ligação geográfica entre determinados polimorfismos, que podem ser rastreados desde o início das rotas comerciais, como a Rota da Seda, uma rota de caravanas que costumava ligar o Mediterrâneo com as partes mais remotas da Ásia.

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), também chamado bacilo de Hansen, transmitida pelas vias aéreas superiores de pessoa a pessoa através do convívio de susceptíveis com doentes bacilíferos sem tratamento (LOCKWOOD, 2004). O *M. leprae* foi descrito em 1873 pelo norueguês Amauer Hansen como o primeiro patógeno associado a uma doença humana (TALHARI; NEVES, 1997). É um microrganismo intracelular obrigatório com tropismo pela célula de Schwann do sistema nervoso periférico e macrófagos. Para seu crescimento, apresenta preferência por áreas mais frias do corpo (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Tem a forma de um bastonete reto ou ligeiramente curvo de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. Cora-se de vermelho pela fucsina e não se decora pelo álcool e ácidos, sendo, portanto, considerado um bacilo álcool-ácido resistente - BAAR (TALHARI; NEVES, 1997) (Figura 1).

Figura 1: Aspectos morfológicos do *M. leprae*.



Fonte: Adaptado de Scollard *et al.* (2006).

É uma bactéria sem motilidade, microaerófila e não formadora de esporos (SCOLLARD *et al.*, 2006). Ainda hoje o bacilo não pode ser cultivado em meios artificiais *in vitro*, mas existem modelos animais utilizados no seu estudo e reprodução, como o tatu e camundongos. O genoma do *M. leprae* possui 3,3 Mpb,

entretanto apenas metade contém genes que codificam proteínas, o restante contém pseudogenes e regiões não codificadoras. Acredita-se que o *M. leprae* tenha perdido em torno de 1500 genes durante sua evolução, o que resultou na eliminação de algumas vias metabólicas, gerando necessidades específicas para o crescimento desse patógeno (BHAT; PRAKASH 2012).

Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, os bacilos podem ser encontrados isolados ou agrupados formando as chamadas globias. A formação de globias é um achado peculiar do *M. leprae* e resulta da união sólida de numerosos bacilos por uma substância chamada gleia (TALHARI; NEVES, 1997). O *M. leprae* possui uma parede celular semelhante a outras micobactérias, composta por peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácido micólico ligados de forma covalente. O principal lipídio da parede celular que confere ao *M. leprae* especificidade imunológica é o glicolípido fenólico 1 (PGL-1). Estudos sugerem a participação do PGL-1 na interação do *M. leprae* com a laminina da célula de Schwann, sugerindo assim um papel importante na interação do bacilo com nervos periféricos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Admite-se que as vias aéreas superiores constituem a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo. A pele erodida, eventualmente, pode ser porta de entrada da infecção. As secreções orgânicas como leite, esperma, suor, e secreção vaginal, podem eliminar bacilos, mas não possuem importância na disseminação da infecção (TALHARI; NEVES, 1997). O período de incubação da hanseníase é longo, de três a dez anos, havendo, entretanto, relato de até 30 anos (BHAT; PRAKASH, 2012). É importante ressaltar que más condições de moradia e alimentação inadequada são fatores importantes na disseminação da doença, pois uma superpopulação doméstica, particularmente noturna, fornece as condições ideais para a disseminação da infecção, através de gotículas respiratórias (JOPLING; MCDUGALL, 1991). Sendo assim, melhores condições sócio-econômicas, de escolaridade e de moradia reduzem a disseminação da hanseníase (LOCKWOOD, 2004). Fato importante sobre o *M. leprae* é que a maioria dos indivíduos, mesmo na condição de contato intradomiciliar, durante muito tempo, de um doente bacilífero sem tratamento, não desenvolve a doença. Estima-se que 90% da população apresente imunidade natural contra o *M. Leprae* (TALHARI; NEVES, 1997).

1.3 Quadro clínico, classificação e aspectos imunopatológicos

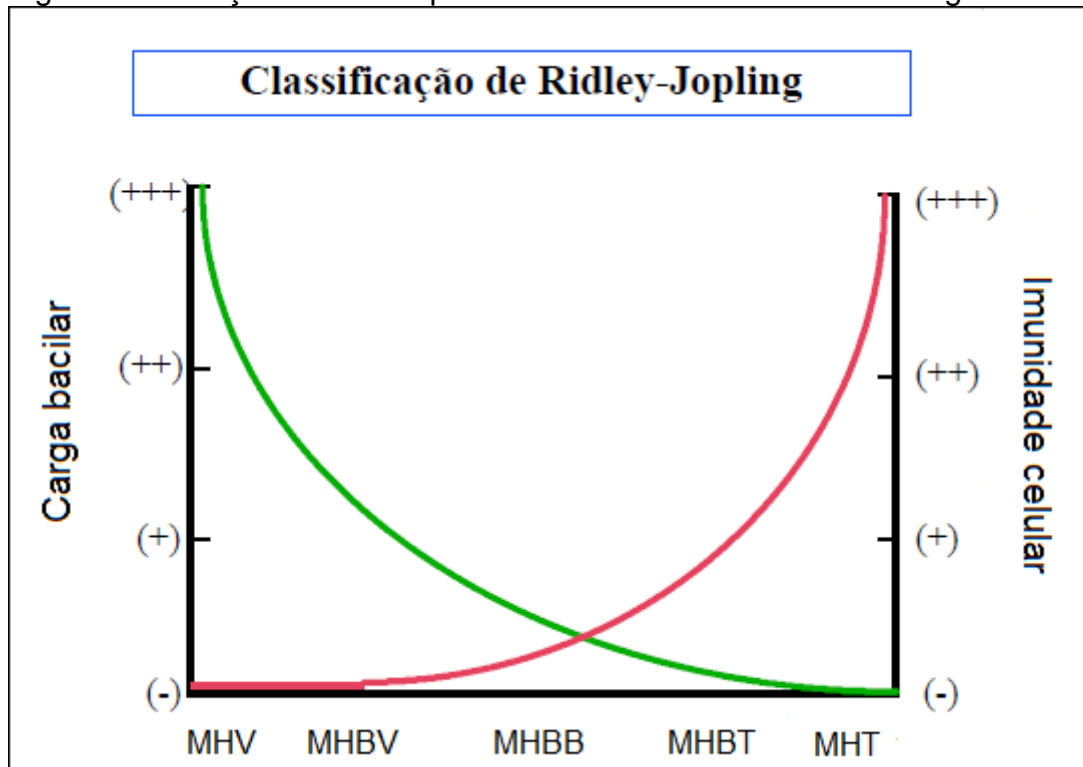
Para um melhor entendimento do quadro clínico e classificação da hanseníase, alguns aspectos imunológicos devem ser mencionados. Sabe-se que o *M. leprae* é um bacilo com alto poder infectante e baixo poder patogênico (TALHARI; NEVES, 1997). Depois da sua entrada no organismo, não ocorrendo a sua destruição, este irá se localizar na célula de Schwann e macrófagos. Sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, nas quais o agente infectante não encontra resistência contra a sua multiplicação. Nesse caso, os linfonodos, olhos, testículos e fígado podem abrigar grande quantidade de bacilos (TALHARI; NEVES, 1997). A hanseníase apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e histopatológicas. Essa diversidade depende da capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva contra o *M. leprae* (SCOLLARD *et al.*, 2006). Desta forma, é classificada em dois grupos polares, o tuberculoide (MHT) e o virchowiano (MHV), e um grupo intermediário chamado de borderline. O diagnóstico da hanseníase é clínico e baseia-se na presença de um ou mais dos seguintes sinais: placas hipopigmentadas ou eritematosas com perda de sensibilidade; espessamento de nervos periféricos; presença de bacilos álcool-ácidos resistentes na linfa ou em amostra de biópsia de pele. Entretanto, o diagnóstico histopatológico, quando disponível, é considerado padrão ouro (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A classificação proposta por Ridley e Jopling em 1966 (*apud* LOCKWOOD, 2004, p. 29.4), é utilizada em pesquisas e leva em consideração a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro. Esta classificação não inclui a forma indeterminada no espectro e o exame histopatológico torna-se necessário para sua utilização. São descritas as formas polares tuberculoide (MHT) e virchowiana (MHV), com padrões de resposta imunológica bem definidos, e os casos borderline, que a depender do local que se encontram no espectro entre as formas polares, são subdivididos em borderline tuberculoide (MHBT), borderline-borderline (MHBB) e borderline virchowiano (MHBV) (LOCKWOOD, 2004; TALHARI; NEVES, 1997; JOPLING; MCDUGALL, 1991).

O teste de Mitsuda é um teste intradérmico que avalia a capacidade do indivíduo em desenvolver uma resposta granulomatosa contra antígenos do *M. leprae*. Embora a resposta ao teste de Mitsuda não seja específica, uma resposta

negativa está associada com as formas virchowianas da hanseníase, demonstrando uma incapacidade de resposta ao bacilo. Um teste de Mitsuda positivo (em 4 semanas) está associado com a capacidade de desenvolver uma resposta granulomatosa, envolvendo células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4+ em pacientes com hanseníase, o que favorece a eliminação dos bacilos (SCOLLARD *et al.*, 2006). A imunidade celular medida pelo teste de Mitsuda é inversamente proporcional à carga bacilar (Figura 2).

Figura 2 – Relação entre o espectro clínico da hanseníase e a carga bacilar.



Fonte: Adaptado de Goulart *et al.* (2002).

No grupo tuberculoide apenas nervos e pele mostram evidências clínicas da doença com poucas lesões, muitas vezes únicas. A lesão típica da forma tuberculoide é uma placa eritematosa com bordas elevadas e centro hipopigmentado com superfície seca, sem pelos e com alteração de sensibilidade térmica. Podem surgir em qualquer parte da pele, com exceção das áreas mais quentes, como couro cabeludo, axilas, virilhas e períneo. O nervo espessado geralmente é palpável próximo à lesão. Os sintomas neurológicos consistem em dor, perda de

sensibilidade local, parestesia, fraqueza muscular ou paralisia (JOPLING; MCDUGALL, 1991). A baciloscopia, pesquisa de BAAR na linfa, é negativa (TALHARI; NEVES, 1997).

No grupo virchowiano as lesões cutâneas são disseminadas, variadas e simetricamente distribuídas na face, nos membros superiores, nos membros inferiores e nas nádegas. As áreas mais quentes do corpo também são poupadas, assim como na forma tuberculoide (JOPLING; MCDUGALL, 1991). Podem ocorrer máculas, pápulas, infiltração e/ou nódulos. Lesões papulosas podem ocorrer também nos lábios, palato, úvula, língua e gengivas. A mucosa nasal encontra-se geralmente hiperemiada ou ulcerada, sendo comum a ocorrência de epistaxe (LOCKWOOD, 2004). As evidências de dano neural, como perda de pelos e da sensibilidade, é um achado tardio na forma virchowiana. A alteração da sensibilidade se inicia nos pés e nas mãos, a chamada parestesia em “meia e luva”, evoluindo lentamente para face extensora dos membros e tronco. Ocorre espessamento dos nervos com disfunção motora ou sensitiva, a depender do tipo de nervo acometido (JOPLING; MCDUGALL, 1991). A sensibilidade térmica é a primeira a ser perdida, seguida da dolorosa e por fim a tátil (TALHARI; NEVES, 1997). A perda da sensibilidade dolorosa favorece a traumas repetidos, principalmente em mãos e pés, podendo evoluir para mal perfurante plantar (JOPLING; MCDUGALL, 1991). O acometimento do nervo oftálmico causa anestesia da córnea com predisposição a ulceração, infecção e cegueira juntamente com a ocorrência de lagofalmo devido à lesão do nervo facial. O paciente sem tratamento evolui com espessamento da pele da fronte, caracterizando a chamada fácies leonina. Nos estágios mais avançados da doença podem ocorrer madarose, deformidade nasal devido à destruição do septo, rouquidão e queda dos dentes incisivos superiores. Atrofia testicular pode ocorrer, levando a esterilidade, disfunção erétil e ginecomastia (LOCKWOOD, 2004). A baciloscopia é positiva com grande número de bacilos (TALHARI; NEVES, 1997).

No grupo borderline, as lesões cutâneas e a resposta imunológica são intermediárias entre aquelas encontradas nos grupos polares. Podem ocorrer máculas, placas, lesões anulares ou de formato bizarro, distribuídas de forma assimétrica (LOCKWOOD, 2004). Os nervos são acometidos do mesmo modo que na forma tuberculoide, porém concentrações maiores de bacilos são necessárias para estimular a resposta celular (JOPLING; MCDUGALL, 1991).

Na histopatologia, as lesões cutâneas dos pacientes portadores de MHT são caracterizadas por infiltrado inflamatório contendo granulomas bem formados com macrófagos diferenciados, células epitelioides e gigantócitos, com predomínio de células T CD4+ e ausência de bacilos (BHAT; PRAKASH, 2012). Os granulomas se estendem desde a derme profunda até a derme papilar, podendo inclusive atingir a camada basal da epiderme (GOULART *et al*, 2002).

Já as lesões cutâneas dos pacientes portadores de MHV apresentam, na histopatologia, predomínio de células T CD8+, ausência de formação de granulomas e grande quantidade de bacilos (BHAT; PRAKASH, 2012). Apresenta infiltrado celular composto de macrófagos com citoplasma carregado de bacilos que contém grandes quantidades de lipídios em sua parede, conferindo o aspecto de células espumosas (células de Virchow) e às vezes multivacuoladas (GOULART *et al*, 2002).

Enquanto o grupo tuberculoide apresenta um padrão de resposta predominante T helper 1 (Th1), com formação de granulomas bem delimitados e com localização da doença, o grupo virchowiano apresenta padrão de resposta predominante T helper 2 (Th2) e evolui para uma doença disseminada, sem formação de granulomas e com disseminação e replicação do bacilo nos tecidos (YAMAMURA *et al.*, 1991). Da mesma forma, a resistência ou a susceptibilidade do hospedeiro em relação ao *M. leprae*, se correlacionam com os diferentes padrões de produção de citocinas. Nas lesões da forma MHT predomina a produção de interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN- γ), enquanto nas lesões da forma MHV predomina a produção de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10) (YAMAMURA *et al.*, 1991). No polo virchowiano, devido ao padrão de citocinas há a produção de altos títulos de anticorpos específicos contra o glicopeptídeo fenólico 1 (PGL-1), antígeno específico do *M. leprae*, porém sem conferir proteção significativa (GOULART *et al*, 2002).

Além desses grupos, alguns indivíduos podem apresentar um estágio inicial e transitório, no qual o estado imunológico ainda não está determinado, que é conhecido como forma indeterminada da hanseníase (MHI). Nesta forma, ocorrem uma ou mais máculas hipopigmentadas com bordas bem ou mal delimitadas, geralmente de aspecto intermediário. Pode ocorrer leve ou nenhuma anestesia e a pesquisa de BAAR na linfa é geralmente negativa (JOPLING; MCDUGALL, 1991).

A resposta imunológica ao bacilo é dinâmica e apresenta variações espontâneas de reatividade com o tempo e tratamento, caracterizando as chamadas reações hansênicas (GOULART *et al.*, 2002). Essas reações representam episódios inflamatórios agudos localizados ou sistêmicos, que podem ocorrer no curso da doença, antes, durante ou após o tratamento. Guardam relação com a carga bacilar e a resposta imunológica do hospedeiro (MENDONÇA *et al.*, 2008). A inflamação que ocorre nos nervos periféricos durante esses episódios reacionais, constitui uma urgência médica, uma vez que o dano neural pode evoluir rapidamente para perda de sensibilidade, paralisias e deformidades muitas vezes irreversíveis (SCOLLARD *et al.* 2006). Os estados reacionais podem ser interpretados como uma mudança no perfil imunológico do paciente. Tratamento quimioterápico, gestação, infecções intercorrentes e estresses físicos e emocionais são condições desencadeantes (BHAT; PRAKASH, 2012). A reação tipo 1 ou reação reversa (RR) é uma reação de hipersensibilidade tardia vista tipicamente nas formas borderlines (KAHAWITA *et al.*, 2008; JOPLING; MCDUGALL, 1991). Evidências indicam que a RR associa-se a um aumento abrupto da imunidade celular, possivelmente desencadeada por reação aos antígenos bacilares fragmentados (MENDONÇA *et al.*, 2008). Na análise histopatológica, evidencia-se infiltrado inflamatório com predomínio de células T CD4+, macrófagos diferenciados e espessamento da epiderme (LOCKWOOD, 2004; GRAYSON, 2005). Do ponto de vista clínico, o sinal mais importante é a mudança rápida no aspecto das lesões cutâneas associada ao comprometimento neural (LOCKWOOD, 2004). Ocorre edema e eritema nas lesões preexistentes, surgimento de lesões novas, piora da alteração sensitiva ou motora e edema das mãos, pés e face, entretanto, sem sintomas sistêmicos (BHAT; PRAKASH, 2012; (LOCKWOOD, 2004). Envolve a participação ativa de linfócitos T, com produção tecidual de citocinas Th1 (IL2 e IFN- γ) e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , que por sua vez tem papel importante no dano neural. As lesões apresentam-se infiltradas por linfócitos CD4+, com aumento da expressão do receptor para IL-2 em células do infiltrado, assim como nos ceratinócitos (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Já a reação tipo 2, também chamada de eritema nodoso hansênico (ENH) é uma síndrome de imunocomplexos, que ocorre nas formas virchowiana e borderline virchowiana. Clinicamente surgem múltiplos nódulos eritematosos acompanhados de manifestações sistêmicas, entretanto sem modificação das lesões específicas ((KAHAWITA *et al.*, 2008; JOPLING; MCDUGALL, 1991). Nas formas

mais intensas, as lesões cutâneas podem evoluir para vesículas, bolhas ou necrose. O processo inflamatório agudo pode acometer qualquer órgão ou tecido que tenha sido invadido pelo *M. leprae*. Os achados sistêmicos mais comuns são febre, queda do estado geral, edema em face, mãos e pés e proteinúria. Outras manifestações possíveis são exacerbação de sintomas de vias aéreas superiores, irite, episclerite, artrite, artralgia, dactilite, linfadenopatia, organomegalia e orquite. Neurite pode estar presente, mas geralmente é menos intensa que na RR (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008). Os episódios de ENH se repetem e evoluem indefinidamente em surtos, geralmente após alguns meses de tratamento (TALHARI; NEVES, 1997). O diagnóstico geralmente é clínico (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008). A imunopatogênese do ENH é bastante complexa. Associa-se a altas concentrações de TNF- α , infiltrado de neutrófilos e ativação do complemento. Tem sido demonstrado, no soro de pacientes, altos níveis circulantes de IL-1 e TNF- α , paralelamente ao aumento tecidual da expressão de RNA mensageiro para IL-6, IL-8 e IL-10, indicando resposta Th2 (MENDONÇA *et al.*, 2008).

1.4 Linfócitos T reguladores

Além dos linfócitos Th1 e Th2, é descrita também outra subpopulação de linfócitos T CD4+ capazes de desempenhar um papel imunossupressor na atividade de outros linfócitos e de outras células inflamatórias (BALA, MOUDGIL, 2006), denominados linfócitos T reguladores (Treg), que expressam propriedades supressoras, inibindo as funções efetoras das células CD4⁺ e CD8⁺ (MURAKAMI *et al.*, 2002; THORNTON; SHEVACH, 1998).

A visão moderna dos Treg surgiu quando pesquisadores observaram que a transferência de células T CD4+ depletadas de CD25 (receptor da IL2) induzia o desenvolvimento de autoimunidade nos animais receptores, sugerindo que a manutenção da auto-tolerância periférica fosse dependente de células T CD25+ capazes de inibir as células T auto-reativas (ASANO *et al.*, 1996).

Os Treg representam uma subpopulação de linfócitos T CD4 caracterizados pela expressão da molécula CD25 e do fator nuclear *Forkhead box P3* (FoxP3). Essas células, capazes de suprimir as células T efetoras através do bloqueio da ativação e função destas, participam do controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não próprios (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007).

Atualmente são descritas pelo menos dois tipos de Treg: naturais e adaptativas. As chamadas Tregs naturais são produzidas naturalmente no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, e representam 5 a 10% das células T CD4+ periféricas (SAKAGUSHI, 2005). Originários do timo, estas células adentram os tecidos periféricos em que irão suprimir a ativação de outros linfócitos T reativos a antígenos próprios, mantendo assim a autotolerância e bloqueando o desenvolvimento de doenças autoimunes. Além disso, são responsáveis em parte pela regulação da resposta imunológica do hospedeiro às infecções virais, bacterianas e parasitárias (GAVIN; RUDENSKY, 2003; WOOD; SAKAGUCHI, 2003; BELKAID; ROUSE, 2005). As Tregs denominadas adaptativas, por sua vez são geradas na periferia após estímulos antigênicos (BLUESTONE; ABBAS, 2003). Estas células exercem sua função através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (VIGNALI *et al.*, 2008).

A descoberta do FoxP3 como um fator de transcrição essencial para os Treg trouxe um novo estágio na caracterização da biologia dessas células. Sua detecção é largamente utilizada na identificação dessas células *in vivo* (RONCAROLO; GREGORI, 2008). O FoxP3 é expresso de forma estável em células T regulatórias CD4+ CD25+ humanas, e a transferência *ex vivo* do gene FoxP3 pode converter células T CD4+ virgens humanas em um fenótipo semelhante às células T reguladoras. Dessa forma, o FoxP3 parece ser o gene regulador principal da função supressora das células T CD4+ CD25+ em seres humanos, como já demonstrado em roedores (YAGI *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2003). Mutações do FoxP3 em humanos são responsáveis pelo desenvolvimento de uma doença denominada Síndrome de imunodisfunção poliendócrinopática enteropática ligada ao X (IPEX), na qual o prejuízo na função dos Treg é associada com desordens autoimunes como enteropatia e diabetes tipo 1. Entretanto, apesar da expressão do FoxP3 estar relacionada com o desenvolvimento e função dos Treg, evidências recentes sugerem que, após a ativação, células T efetoras também podem expressar FoxP3, embora transitoriamente. Enquanto o papel dessa expressão transitória do FoxP3 nas células efetoras é pouco compreendido, está claro que essa expressão não se correlaciona com a função supressora (RONCAROLO; GREGORI, 2008).

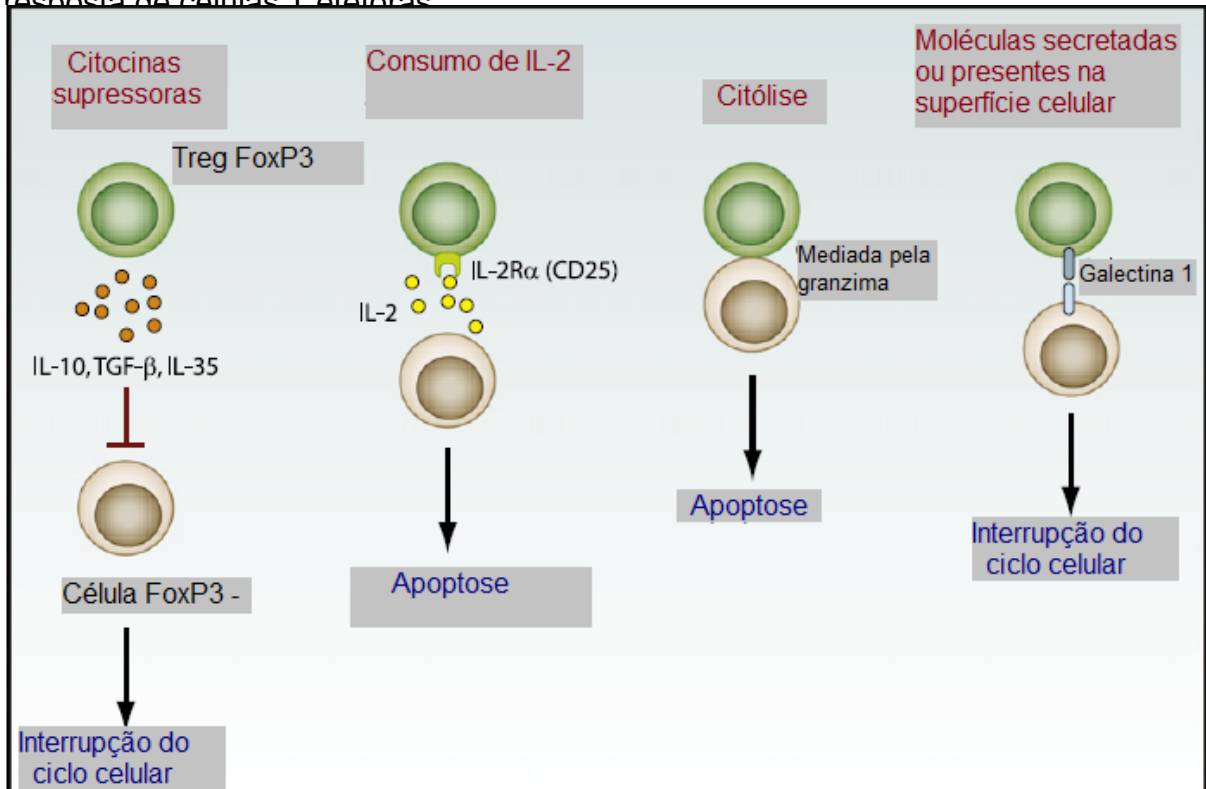
Em humanos, a definição do papel dos Treg durante infecções é mais difícil, uma vez que os Treg FoxP3+ constituem uma população mais heterogênea

do que em camundongos (CONSTANTINO *et al.*, 2008). Além do que, a maioria dos estudos em humanos analisa a frequência ou a função dos Treg no sangue periférico e não nos tecidos acometidos onde os Treg se acumulam nas diversas infecções crônicas (BELKAID, 2008).

A contribuição dos Treg para as doenças infecciosas é complexa. Uma depleção de Treg pode aumentar a resposta antimicrobiana e erradicar os microrganismos e sua presença pode suprimir a resposta antimicrobiana mediada por células, permitindo a sobrevivência desses (SAKUGUSHI *et al.*, 2010). Sendo assim, os Treg podem limitar respostas benéficas através da supressão da imunidade contra certos parasitas e vírus assim como limitar a imunidade antitumoral induzida por vacinas terapêuticas, podendo, então, ser considerados protetores ou ameaçadores a depender da condição clínica (VIGNALI *et al.*, 2008).

Os mecanismos pelos quais os linfócitos Treg exercem sua função supressora ainda são alvo de estudos, mas alguns já são descritos. Esses mecanismos podem ser mediados tanto pela interação direta entre os linfócitos Treg e as células efectoras quanto pela liberação de citocinas. Os linfócitos Treg expressam altos níveis de CTLA-4 (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos), uma molécula coestimulatória capaz de inibir algumas funções dos linfócitos T CD4+ como proliferação celular e secreção de IL-2. Os linfócitos Treg também possuem a capacidade de secretar altas quantidades de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , capazes de inibir diretamente as células T efectoras (SAKAGUCHI *et al.*, 2010; SHEVACH, 2009). Os linfócitos Treg expressam altos níveis de CD25 (receptor da IL-2) podendo competir com as células T efectoras pela IL-2 levando-as a apoptose. Podem também funcionar como células citotóxicas ou expressar moléculas de superfície capazes de interagir com receptores de células T efectoras resultando em interrupção do ciclo celular (SHEVACH, 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Principais mecanismos pelos quais os linfócitos Treg podem suprimir a resposta de células T efectoras



Fonte: Modificado de Shevach (2009).

Os linfócitos Treg têm sido considerados responsáveis pela ausência de uma resposta imunológica efetiva associada a certas infecções crônicas em seres humanos, como infecções por citomegalovírus, vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e *Helicobacter pylori*. Também tem sido estudado o papel destes linfócitos na resposta à infecção por espécies de *Leishmania* e pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (BELKAID; TARBELL, 2009).

Em relação à hanseníase, os dados a respeito do papel dos linfócitos Treg na imunopatologia desta doença, são escassos na literatura médica. Em 2010, Attia *et al.* estudaram a expressão de FoxP3 de linfócitos Treg circulantes em pacientes com diferentes formas de hanseníase, verificando um aumento desses no polo MHT. Os resultados desse estudo sugerem que, apesar de se mostrarem prejudiciais à resposta imunológica, os linfócitos Treg possam ter um papel benéfico na hanseníase. Também em 2010, Massone *et al.* avaliaram a expressão imunohistoquímica de FoxP3 em biópsias de pele de 20 casos de hanseníase, incluindo diferentes formas clínicas e reações hansênicas. Apesar do pequeno

número de casos, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo da expressão de FoxP3 nos pacientes portadores de reação tipo 1 (RR). Entretanto, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas de hanseníase sem episódio reacional. Palermo *et al.* em 2012 quantificaram os linfócitos Treg no sangue periférico e em biópsias de pele de pacientes portadores de hanseníase, encontrando um aumento dessas células nos pacientes multibacilares. Esses achados, então, sugerem um papel patogênico dos linfócitos Treg na forma virchowiana da hanseníase, permitindo a proliferação bacilar incontrolada.

Dessa forma, o possível papel dos linfócitos Treg na imunopatogênese da hanseníase ainda permanece obscuro. No presente estudo, objetivamos estudar a expressão dos linfócitos Treg diretamente nas lesões cutâneas de pacientes portadores de formas polares de hanseníase e reações hansênicas.

2 JUSTIFICATIVA

A alta prevalência da hanseníase em nosso meio, sua elevada morbidade responsável por incapacidades físicas irreversíveis, bem como sua ampla variedade clínica dependente da resposta imunológica do hospedeiro, justificam a realização de um estudo que analisa a possível participação de células T regulatórias na complexa imunopatogênese desta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão imunohistoquímica de células FoxP3+ e de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em biópsias cutâneas de pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas atendidos no Ambulatório de Hanseníase do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), bem como em indivíduos saudáveis.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a expressão de células FoxP3+ cutâneas em pacientes portadores de hanseníase tuberculoide ou hanseníase virchowiana, e pacientes com reações hansênicas, como também em indivíduos saudáveis, utilizando-se o anticorpo anti-FoxP3 humano;

- Quantificar a expressão de linfócitos T CD4+ e T CD8+ cutâneos em pacientes portadores de hanseníase tuberculoide ou hanseníase virchowiana, e pacientes com reações hansênicas, como também em indivíduos saudáveis, utilizando-se os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 humanos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal em pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas atendidos no Ambulatório de Hanseníase do HUWC.

4.2 Casuística

Devido à rigidez dos critérios de inclusão e exclusão, os pacientes do estudo tiveram que ser selecionados de duas formas para que um número suficiente de pacientes fosse alcançado.

- Primeira seleção: Foram selecionados inicialmente 20 pacientes que compareceram ao ambulatório de hanseníase em livre demanda, no período de agosto a dezembro de 2011, e que aceitaram participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

- Segunda seleção: Como não foi possível atingir o número de indivíduos esperado para o estudo, foram selecionadas mais 15 biópsias de pele que se encontravam arquivadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará (UFC), as quais estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo. A seleção dessas biópsias foi iniciada após assinatura do Termo de Fiel Depositário pelo chefe do DPML, autorizando o uso desse material. Além disso, foram selecionadas ainda 11 biópsias de pele normal, também provenientes do acervo do DPML, para confecção do grupo controle, respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão do estudo, excetuando-se os que dizem respeito ao diagnóstico de hanseníase e reações hansênicas. Essas biópsias selecionadas para compor o grupo controle, eram de indivíduos sem doenças infecciosas e que apresentavam na análise histopatológica, amostras de pele normal. Essas amostras foram provenientes de área perilesional de cistos epidérmicos excisados, cirurgias de mamoplastia ou biópsias de pele normal realizadas para auxiliar no diagnóstico de pacientes com suspeita de morfeia.

4.3 Critérios de inclusão

- Maiores de 18 anos e menores de 75 anos de idade, de ambos os sexos;
- Diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase tuberculoide e virchowiana antes da introdução do tratamento poliquimioterápico;
- Diagnóstico clínico de reações hansênicas tipos 1 e 2 antes de seu tratamento com corticosteroides ou talidomida, cujo exame histopatológico corroborasse o diagnóstico.

4.4 Critérios de exclusão

- Menores de 18 anos e maiores de 75 anos de idade;
- Pacientes portadores de outras doenças infecciosas crônicas concomitantes ou imunossupressoras;
- Pacientes com amostra de pele insuficiente para realização dos testes imunohistoquímicos;
- Pacientes cujo prontuário não possuísse informações clínicas necessárias para a seleção dos pacientes;
- Pacientes cujo diagnóstico clínico (de hanseníase ou de reação hansênica) não fosse corroborado pelo exame histopatológico;
- Pacientes com diagnóstico de hanseníase formas tuberculoide ou virchowiana que tivessem iniciado previamente o tratamento poliquimioterápico;
- Pacientes com diagnóstico de reação hansênica que tivessem iniciado previamente tratamento específico para as mesmas com imunossupressores (corticosteroides ou talidomida).

4.5 Avaliação dermatoneurológica

O diagnóstico clínico das formas polares de hanseníase baseou-se na classificação de Ridley e Jopling de 1966 (*apud* LOCKWOOD, 2004, p. 29.4): a) forma tuberculoide: poucas lesões (< 10) distribuídas assimetricamente; poucos troncos neurais acometidos; pesquisa negativa de BAAR na linfa. b) forma virchowiana: múltiplas lesões, confluentes e distribuídas simetricamente;

acometimento generalizado e simétrico de troncos neurais; pesquisa positiva de BAAR na linfa.

O diagnóstico clínico das reações hansênicas baseou-se nos seguintes critérios: a) reação hansênica tipo 1: quadro agudo com ocorrência de neurite e/ou piora do eritema e infiltração das lesões prévias e/ou surgimento de novas lesões. b) reação hansênica tipo 2: surgimento de nódulos eritematosos dolorosos em face e superfície extensora dos membros, associado ou não a febre, artralgia ou neurite (LOCKWOOD, 2004).

4.6 Avaliação histopatológica

O diagnóstico histopatológico das formas de hanseníase baseou-se nos seguintes critérios: a) forma tuberculóide: observação de granulomas epitelióides não-caseosos, perianexiais, na ausência de BAAR à coloração de WADE; b) forma virchowiana: presença de macrófagos espumosos (células de Virchow) repletos de BAAR e ausência de granulomas; c) reação hansênica tipo 1: infiltrado linfocitário associado a edema com destruição do granuloma e formação de células gigantes. d) reação hansênica tipo 2: infiltrado inflamatório na derme e tecido subcutâneo adjacente, na presença ou não de polimorfonucleares e vasculite (LOCKWOOD, 2004; GRAYSON, 2005).

4.7 Coleta dos dados

As informações clínicas como idade, sexo, índice baciloscópico inicial, uso de medicamentos e co-morbidades foram colhidas pela própria mestrandia durante o atendimento dos pacientes da primeira seleção e coletadas dos prontuários dos pacientes da segunda seleção, cujas biópsias já estavam arquivadas no DPML.

4.8 Grupos de estudo

Os pacientes selecionados foram então organizados da seguinte forma:

GRUPO 1: Portadores de hanseníase tuberculóide (MHT) – 15 pacientes;

GRUPO 2: Portadores de hanseníase virchowiana (MHV) – 14 pacientes;

GRUPO 3: Portadores de reação hansênica tipo 1 (RR) – 05 pacientes;

GRUPO 4: Portadores de reação hansênica tipo 2 (ENH) – 01 paciente;

GRUPO 5: Não portadores de hanseníase (Controle) – 11 pacientes.

4.9 Coleta de amostras de pele e análise histopatológica

Os pacientes que participaram da primeira seleção, que ainda não apresentavam amostras de pele, após explicitação e assinatura do TCLE, foram submetidos à realização de uma biópsia de lesão cutânea característica do diagnóstico clínico, com assepsia local, seguida de infiltração local de solução de lidocaína a 2% com epinefrina na concentração de 1:200.000, remoção de fragmento medindo 4mm de diâmetro através de instrumento cirúrgico utilizado para este fim, denominado *punch* e posterior sutura com fio nylon 4.0. Estas etapas fazem parte da rotina do Ambulatório de Hanseníase do HUWC, para realização desse procedimento. Neste mesmo local foram realizadas previamente as biópsias da segunda seleção, que se encontravam armazenadas no DPML.

As amostras de pele foram fixadas em formol tamponado a 10%, submetidas ao processamento histológico, sendo confeccionados blocos de parafina. Em seguida, foram realizados cortes histológicos, com espessura de 5 μ , corados por hematoxilina e eosina e pelo método de Wade para pesquisa e quantificação de BAAR (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4 - Aspecto histológico de MHT em coloração de hematoxilina e eosina com aumento de 400X (A), 1000X (B) e 4000X (C).

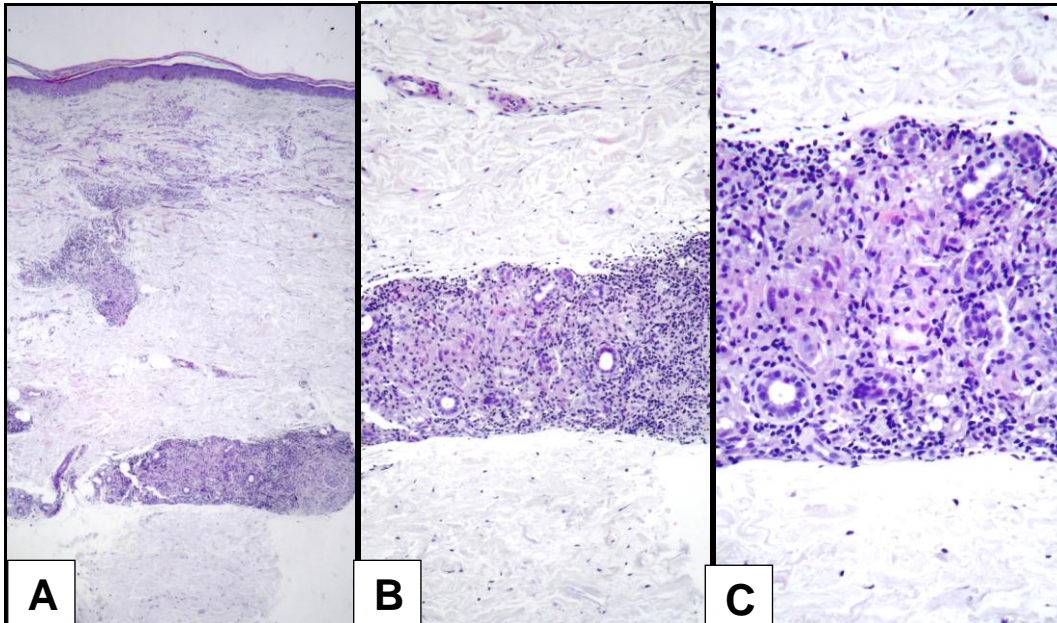


Figura 5 - Aspecto histológico de MHV em coloração de hematoxilina e eosina com aumento de 400X (A), 1000X (B) e 4000X (C).

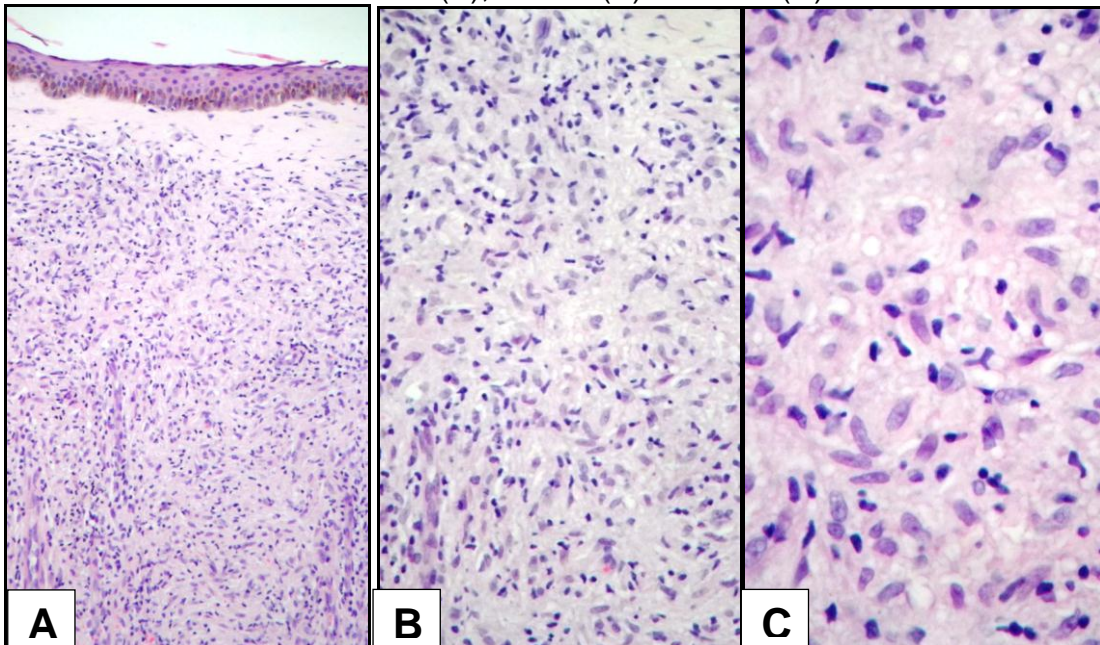
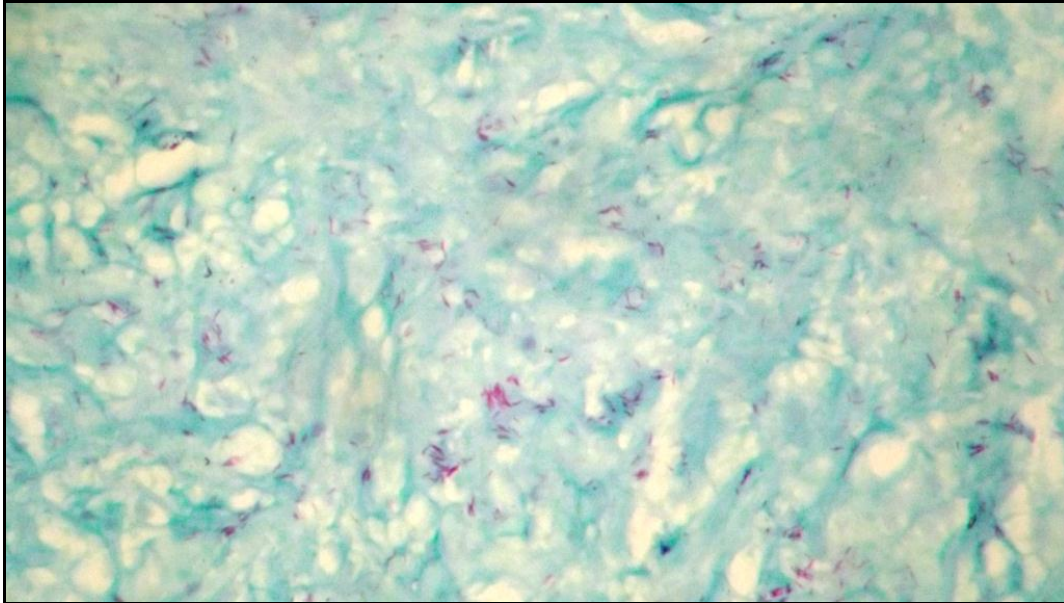


Figura 6- Aspecto microscópico do *M. leprae* em MHV por coloração de Wade com aumento de 1000X.



4.10 Arranjo em matriz tecidual (TMA)

O arranjo em matriz de amostras teciduais, também conhecido como *tissue microarray* (TMA), é uma técnica descrita em 1998 por Kononen *et al.*, que possui ampla aceitação pela literatura mundial. Consiste na confecção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais, a depender do diâmetro das amostras coletadas. A utilização dessa técnica apresenta múltiplas vantagens em relação ao corte tradicional, dentre elas podemos citar: grande economia de reagentes e de tempo para realização das reações; maior uniformidade das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos; possibilidade de repetição das reações em diferentes níveis do bloco; utilização do mesmo bloco para mais de um projeto. A maior crítica referente à utilização da técnica de TMA é em relação à pequena amostra estudada de cada bloco original. (ANDRADE *et al.*, 2007) Entretanto, como os fragmentos de pele utilizados para análise histopatológica geralmente são pequenos, sendo de 4mm no presente estudo, esta preocupação não se aplica. Para a confecção dos blocos de TMA utilizou-se o sistema *Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray*. Inicialmente realizou-se a identificação dos

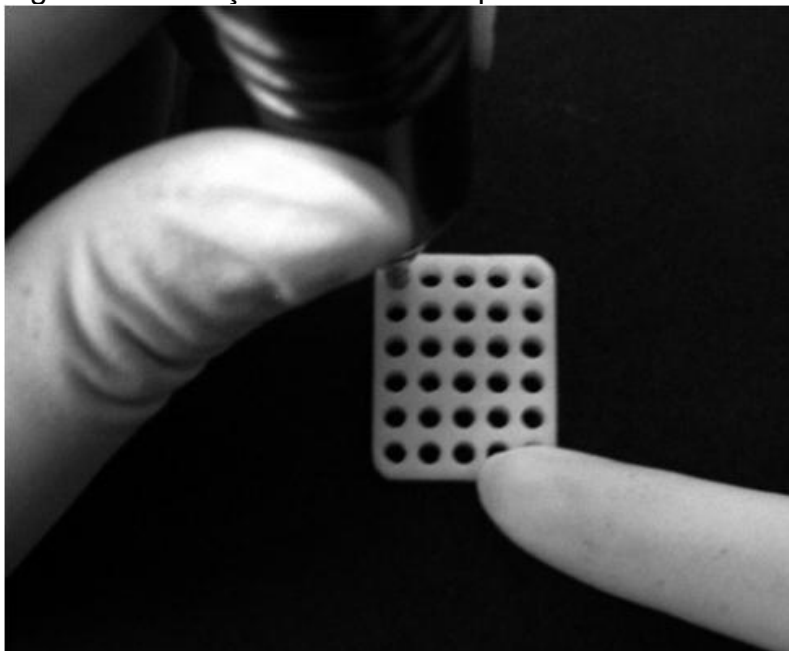
blocos doadores e transferência de todo material de cada bloco por uma agulha de 5mm para 05 blocos receptores (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Ilustração do bloco doador do TMA.



Fonte: Manual do fabricante *Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray*.

Figura 8: Ilustração do bloco receptor do TMA.



Fonte: Manual do fabricante *Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray*.

Para se identificar a posição de início do bloco receptor, a primeira posição superior esquerda não foi utilizada. Após preenchimento de todos os blocos receptores, estes foram colocados em um molde base com o lado onde o tecido foi inserido para baixo, depois ficaram em estufa a 60°C por aproximadamente 30 minutos, até o material derreter e ficar transparente. Utilizou-se, então, um cassete sobre o molde base para introdução de parafina e confecção do bloco de TMA. Por fim, foram confeccionadas as lâminas referentes a cada bloco de TMA.

4.11 Avaliação das populações de células CD4+, CD8+ e FoxP3+ por imunohistoquímica

Inicialmente, para a desparafinização e reidratação dos cortes, foram realizadas em cada lâmina duas passagens de 5 minutos cada em Xilol da marca Synth e duas passagens de 3 minutos em concentrações decrescentes de álcool a 100%, 70% e 50%. Em seguida, as lâminas foram deixadas durante 3 minutos em água destilada. Para a recuperação antigênica, os cortes foram deixados em tampão Tris-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pH 9.0, previamente aquecido a 95-99 ° C em banho-Maria por 15 minutos para o anticorpo anti-CD4 e em tampão Citrato pH 6.0, previamente aquecido a 95-99 ° C em banho-Maria por 20 minutos para os anticorpos anti-CD8 e anti-FoxP3. Depois de feita a recuperação, as cubas (ainda com o tampão) foram resfriadas em temperatura ambiente por 15 minutos. O bloqueador de peroxidase da marca Spring foi aplicado sobre as amostras e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente de 25 °C, com posterior lavagem com Tampão de Lavagem TBST da marca Spring. Após essa etapa, realizou-se a incubação do bloqueador de proteína do mesmo fabricante sobre as amostras por 10 minutos em temperatura ambiente (25°C). O excesso de reagente foi removido sem necessidade de lavagem. Então, após a secagem ao redor dos cortes, foram aplicados os anticorpos já diluídos: anticorpo monoclonal de coelho anti-CD4, clone SP35, Spring - M3354; anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD8, clone C8/114B, Zeta - Z2045M; anticorpo monoclonal de camundongo anti-FoxP3, clone 236A/E7, Abcam – ab20034. Os anticorpos primários foram diluídos em diluente de anticorpo e incubados por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente, nas concentrações de 1:25 para o anti-CD4, 1:200 para o anti-CD8 e 1:50 para o anti-FoxP3. Após a incubação, realizou-se uma etapa de lavagem com o tampão

utilizando-se pisseta. Prosseguiu-se então com a incubação do polímero REVEAL HRP: primeiramente aplicou-se o *Complement* sobre os cortes deixando-o reagir por 10 minutos, em temperatura ambiente. O excesso foi apenas escorrido e em seguida aplicado o HRP *Conjugate* por 15 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas com Tampão de Lavagem TBST. A reação foi revelada com o cromógeno DAB (3,3' Diaminobenzidina Tetrahydroclorido), o qual foi diluído segundo instruções da bula do produto. Realizou-se uma secagem ao redor dos cortes e o DAB diluído foi aplicado e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas então foram lavadas com uma passagem rápida em água corrente. A contracoloração foi realizada com hematoxilina por 2 minutos, lavagem em água corrente e passagem em água amoniacal. Em seguida, nova lavagem em água corrente e destilada foi realizada. Para desidratação do tecido foram realizadas duas passagens de 1 minuto cada em concentrações crescentes de álcool a 50%, 70 % e 100% e duas passagens de 1 minuto em Xilol.

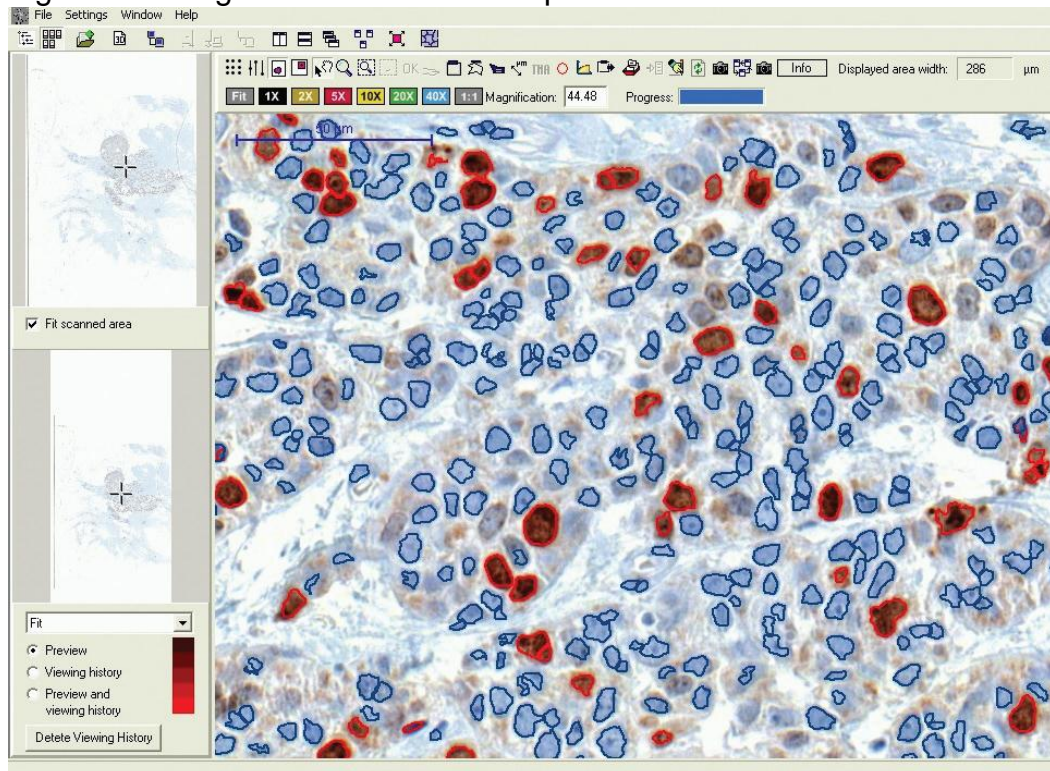
Foram utilizadas amostras de tonsila para controle positivo das reações referentes aos 03 anticorpos.

4.12 Quantificação da imunoexpressão

Imagens digitais das lâminas coradas foram capturadas de forma padronizada utilizando-se um microscópio de luz Panoramic MIDI 3DHISTECH® no aumento de 20 vezes, acoplado a uma câmera digital Hitachi® modelo HV-F22CL 1,4mp. As imagens foram armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP).

As imagens, então, foram analisadas pelo *software* Histoquant® da 3DHistech®, o qual foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores da imunomarcagem (Figura 9). Essa calibragem habilitou o *software* a identificar e quantificar as células marcadas por cada anticorpo por área (mm²). As áreas de interesse para quantificação foram demarcadas pelo operador excluindo-se as áreas com artefatos.

Figura 9 – Imagem do *software* Histoquant®.



Fonte: Folder do fabricante Histoquant®.

4.13 Análise dos dados

As variáveis quantitativas e contínuas foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição.

Comparações entre três ou mais grupos cujos dados apresentaram distribuição normal e variação homogênea (idade e quantificação da imunoposição para o anticorpo anti-FoxP3), foram realizadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para os dados que não apresentaram distribuição normal (quantificação da imunoposição para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8) utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism® versão 5.01 para Windows® foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos e para a elaboração dos gráficos.

Para a estatística descritiva, foram calculados média, mediana, valores mínimos e máximos.

4.14 Aspectos éticos

Os pacientes receberam informações sobre os exames realizados neste estudo, bem como sua importância, e a sua participação foi realizada exclusivamente após assinatura do TCLE (Apêndice A), conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foi garantida a total confidencialidade das informações e o direito de recusar a participação na pesquisa, bem como de retirar seu consentimento a qualquer momento do estudo.

Os pacientes receberam orientação e aconselhamento relacionados à forma de transmissão da hanseníase, importância de trazer contactantes intradomiciliares para exame dermatológico e medidas cotidianas para prevenção de lesão nos pacientes com déficit neurológico. Após confirmação diagnóstica, os pacientes foram encaminhados para tratamento poliquimioterápico conforme preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, o qual é disponibilizado gratuitamente nos serviços públicos de saúde, inclusive no HUWC.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC da Universidade Federal do Ceará, Protocolo número 079.07.11(2), em reunião do dia 30 de agosto de 2011 (ANEXO A). A utilização de biópsias antigas armazenadas no DPML foi aprovada em 05 de novembro de 2012 (ANEXO B).

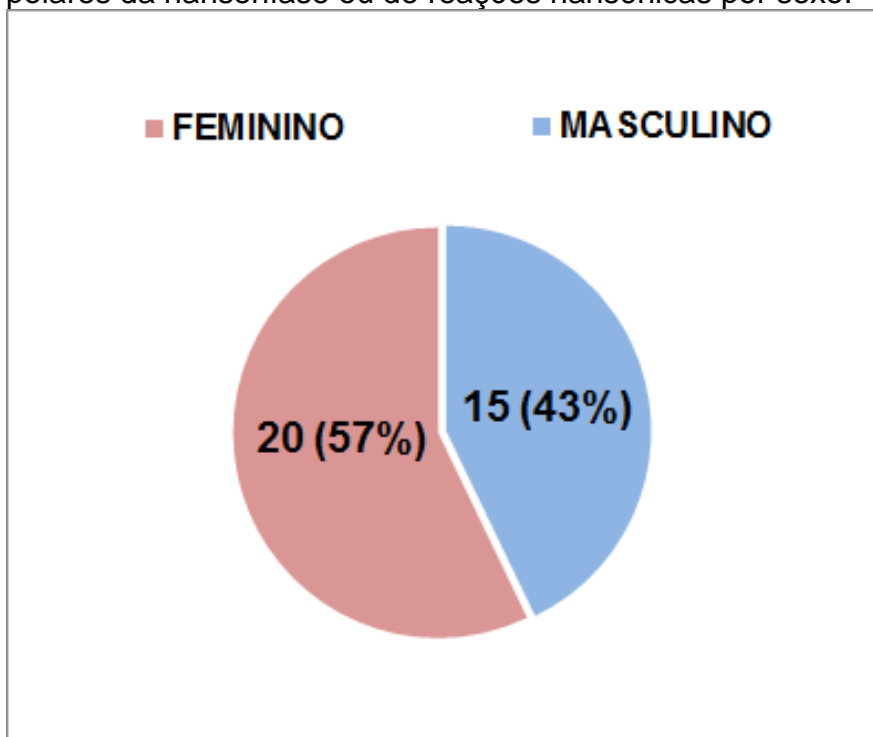
5 RESULTADOS

5.1 Descrição da amostra

O presente estudo avaliou um total de 46 participantes. Desses, 35 eram portadores de formas polares da hanseníase ou de reações hansênicas constituindo os grupos de estudo e 11 eram indivíduos sadios que constituíram o grupo controle.

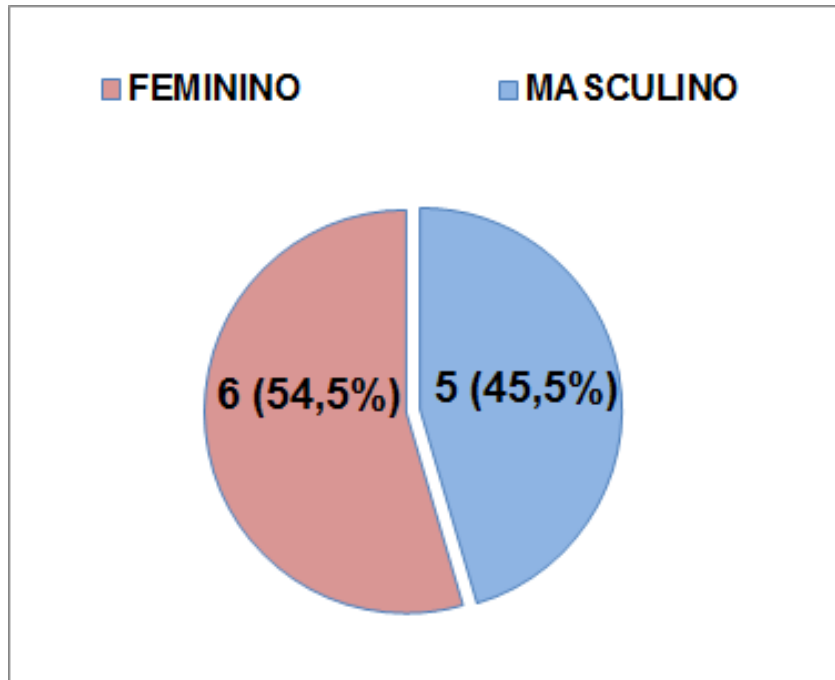
Dos 35 pacientes que participaram dos grupos de estudo, 20 (57%) eram do sexo feminino e 15 (43%) do sexo masculino (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição dos pacientes portadores de formas polares da hanseníase ou de reações hansênicas por sexo.



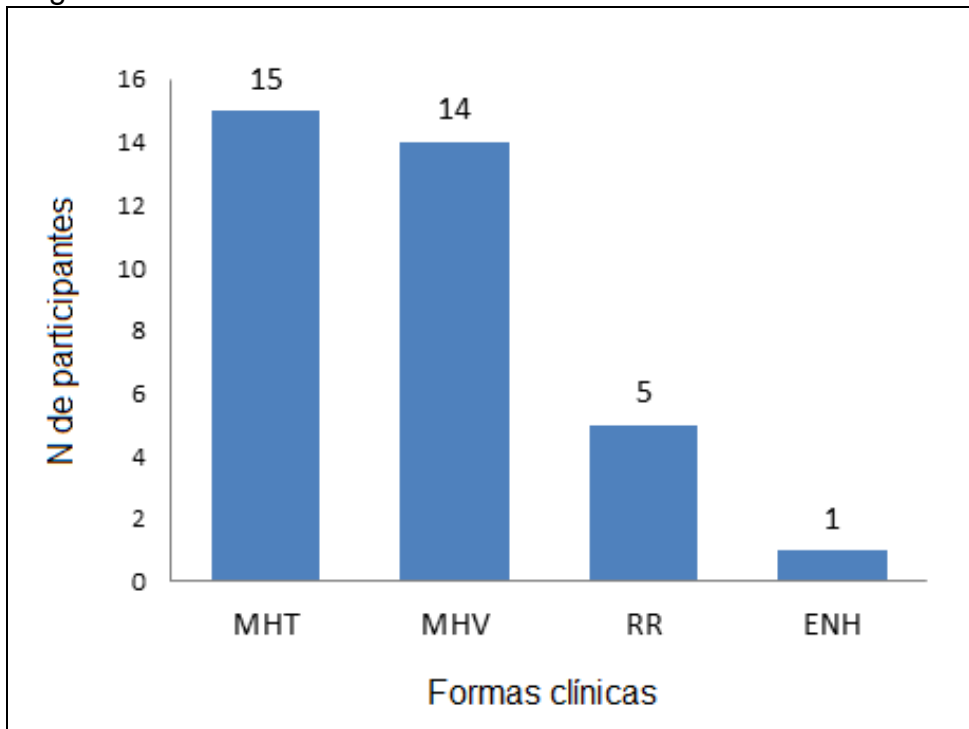
Dos 11 pacientes que participaram do grupo controle, 06 (55%) eram do sexo feminino e 05 (45%) do sexo masculino (Figura 11).

Figura 11- Distribuição dos pacientes do grupo controle por sexo.



Os 35 pacientes portadores de formas polares da hanseníase ou de reações hansênicas foram distribuídos em 04 grupos de estudo de acordo com o diagnóstico: MHT (portadores de hanseníase forma tuberculoide), MHV (portadores de hanseníase forma virchowiana); RR (portadores de reação hansênica tipo 1) e ENH (portadores de reação hansênica tipo 2) (Figura 12).

Figura 12: Distribuição dos grupos de estudo de acordo com o diagnóstico.



O grupo MHT foi constituído por 15 pacientes, sendo 04 (26,7%) do sexo masculino e 11 (73,3%) do sexo feminino. O grupo MHV foi constituído por 14 pacientes, sendo 06 (42,9%) do sexo masculino e 08 (57,1%) do sexo feminino. O grupo RR foi composto por 05 pacientes, sendo 04 (80,0%) do sexo masculino e 01 (20,0%) do sexo feminino. Já o grupo ENH possuiu apenas 01 paciente (100,0%) do sexo masculino (Tabela 1).

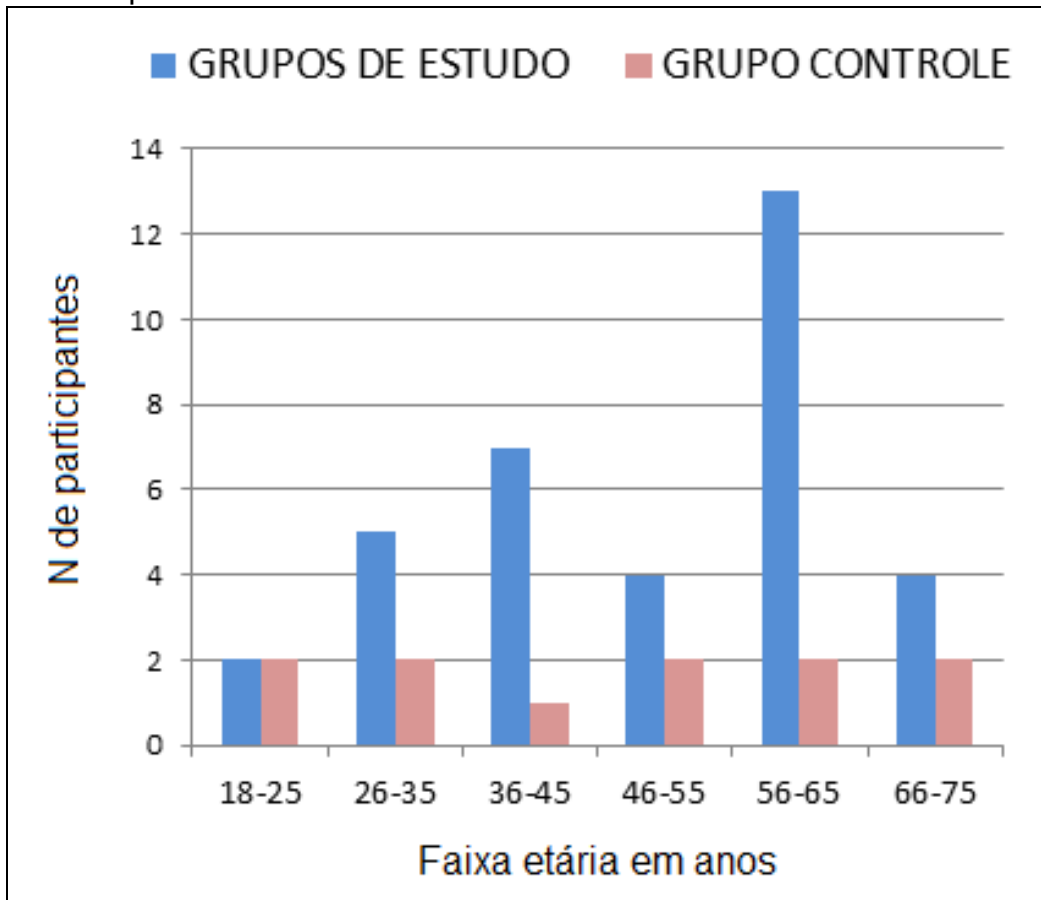
Tabela 1. Distribuição dos participantes por grupo de estudo e por sexo.

GRUPO	MASCULINO	FEMININO
MHT	4 (26,7%)	11 (73,3%)
MHV	6 (42,9%)	8 (57,1%)
RR	4 (80,0%)	1 (20,0%)
ENH	1 (100,0%)	0
Controle	5 (45,5%)	6 (54,5%)

A idade variou de 18 a 75 anos nos grupos de estudo com média de 49,7 ($\pm 15,7$) e de 18 a 71 anos no grupo controle com média de 43,0 ($\pm 19,2$). A diferença entre essas médias não se mostrou significativa com $p=0,2505$.

Nos grupos de estudo, 02 pacientes possuíam entre 18-25 anos, 05 pacientes entre 26-35 anos, 07 pacientes entre 36-45 anos, 04 entre 46-55 anos, 13 entre 56-65 e 04 entre 66-75 anos de idade. No grupo controle, 02 indivíduos possuíam entre 18-25 anos, 02 entre 26-35 anos, 01 entre 36-45 anos, 02 entre 46-55 anos, 02 entre 56-65 e 02 entre 66-75 anos de idade (Figura 13).

Figura 13 – Distribuição dos pacientes dos grupos de estudo e do grupo controle por faixa etária.



As médias de idade dos grupos de estudo distribuídos de acordo com o diagnóstico clínico foram: MHT 46,9 (\pm 14,6); MHV 50,3 (\pm 15,5); RR 54,6 (\pm 22,1); ENH 56 (\pm 0); Controle 43,0 (\pm 19,2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade para os grupos com $p=0,6873$ pelo teste de ANOVA (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de idade por grupo de estudo.

Grupo	Quantidade de Pacientes	Média de Idade (anos)
MHT	15	46,9 (DP \pm 14,6)
MHV	14	50,3 (DP \pm 15,5)
RR	5	54,6 (DP \pm 22,1)
ENH	1	56 (DP \pm 0)
Controle	11	43,0 (DP \pm 19,2)

5.2 Imunoexpressão

Das 45 lâminas selecionadas para o estudo, estavam adequadas para análise 35 lâminas utilizando-se o anticorpo anti-CD4 (12 MHT, 11 MHV, 02 RR, 01 ENH e 09 do grupo controle), 41 lâminas utilizando-se o anticorpo anti-CD8 (14 MHT, 13 MHV, 05 RR, 01 ENH e 08 do grupo controle) e 40 lâminas, utilizando-se o anticorpo anti-FoxP3 (14 MHT, 11 MHV, 05 RR, 01 ENH e 09 do grupo controle) (Tabela 3 e Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19).

Tabela 3. Distribuição de lâminas coradas por cada anticorpo por grupo de estudo.

Grupo	Anti-CD4	Anti-CD8	Anti-FoxP3
MHT	12	14	14
MHV	11	13	11
RR	02	05	05
ENH	01	01	01
Controle	09	08	09
TOTAL	35	41	40

Figura 14 - Imunoexpressão de linfócitos T CD4+ em MHT com aumento de 400X.

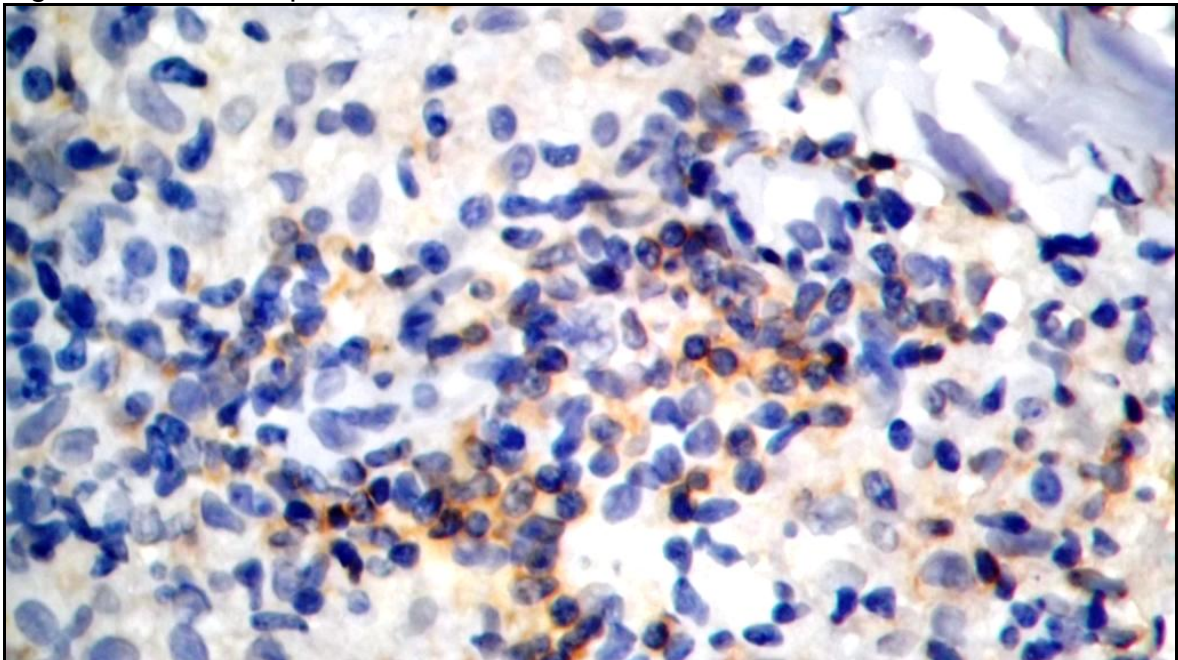


Figura 15 - Imunoexpressão de linfócitos T CD4+ em MHV com aumento com aumento de 200X.

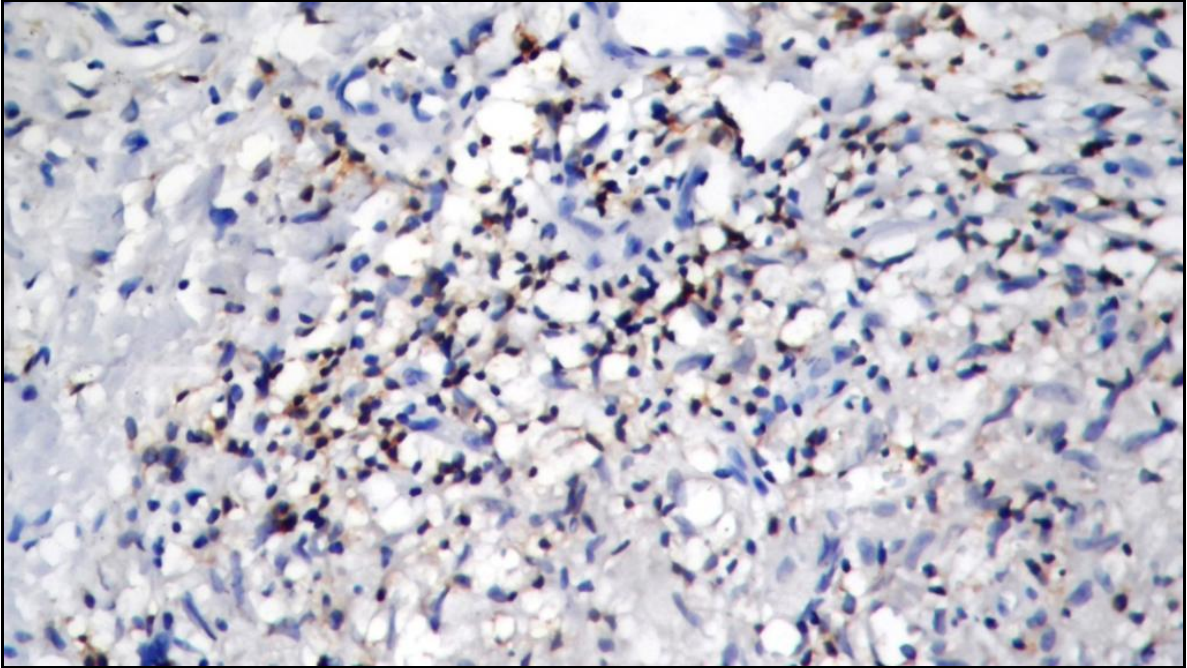


Figura 16 - Imunoexpressão de linfócitos T CD8+ em MHT com aumento de 400X.

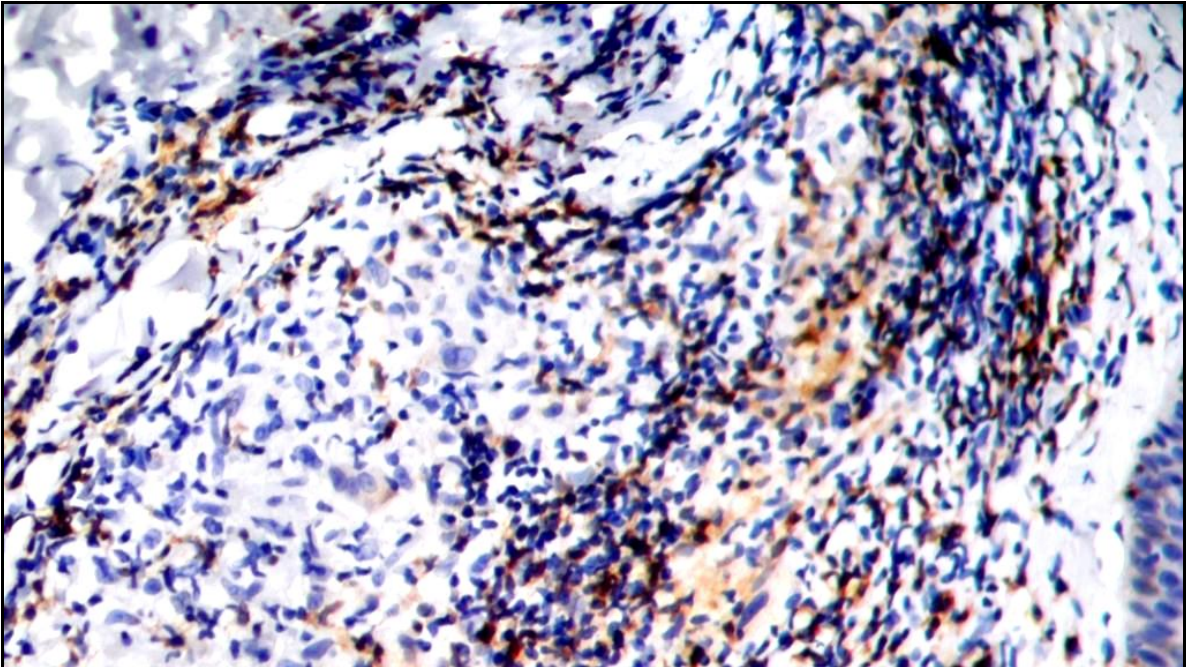


Figura 17 - Imunoexpressão de linfócitos T CD8+ em MHV com aumento com aumento de 200X.

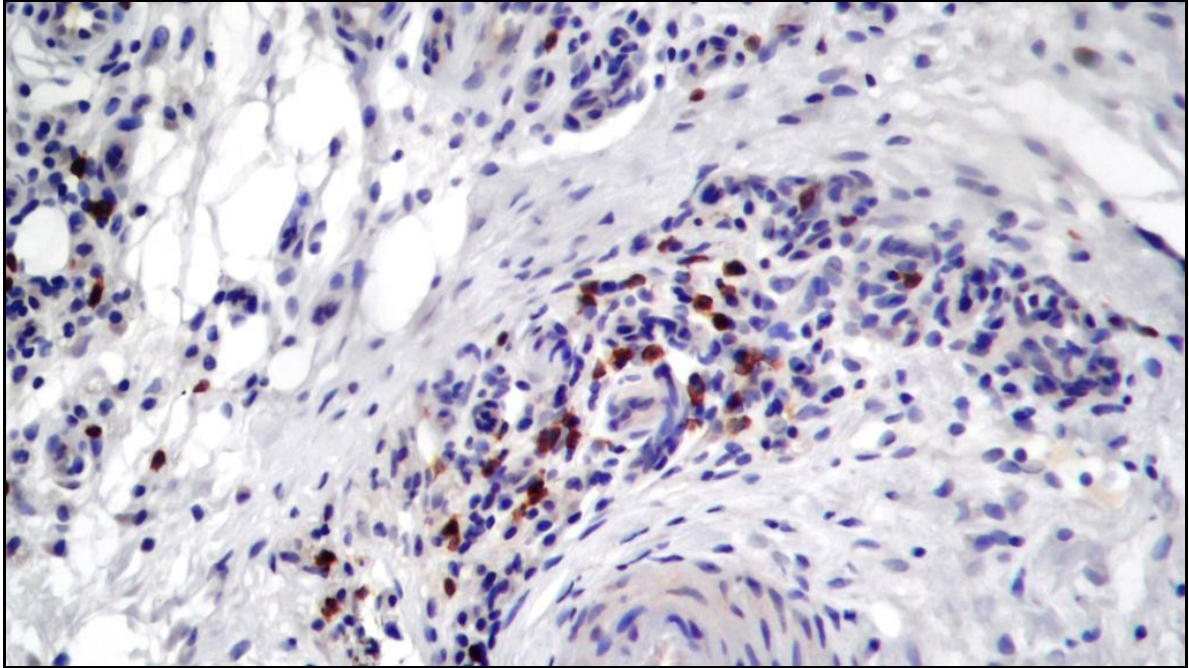


Figura 18 - Imunoexpressão de linfócitos FoxP3+ em MHT com aumento de 400X.

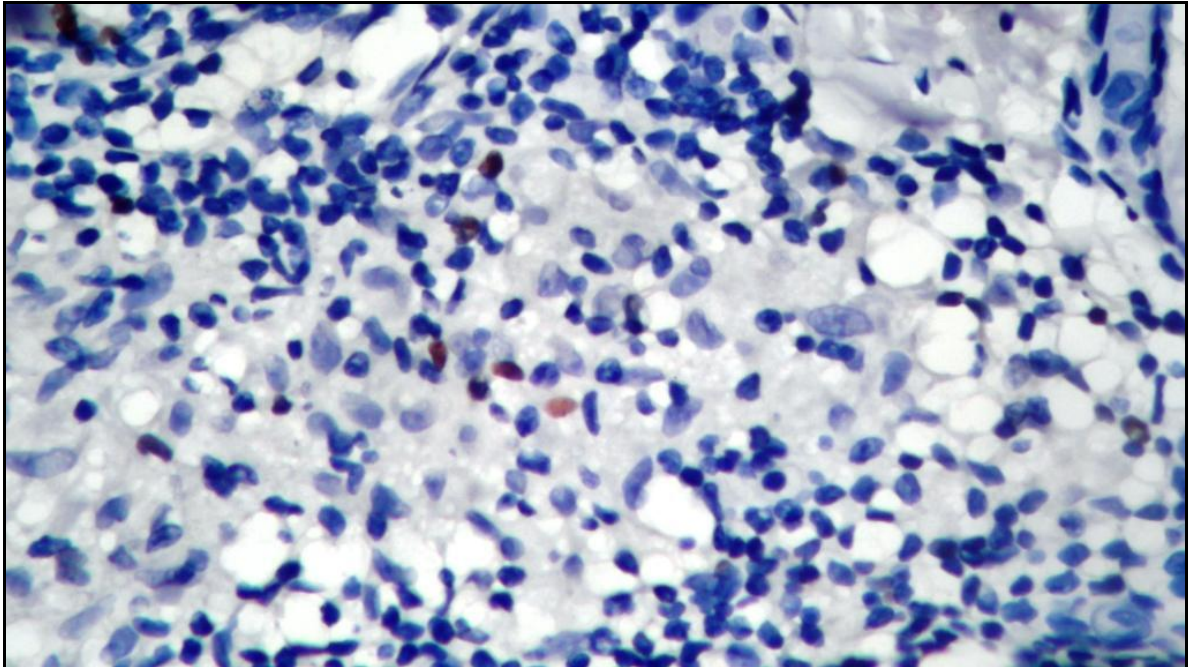
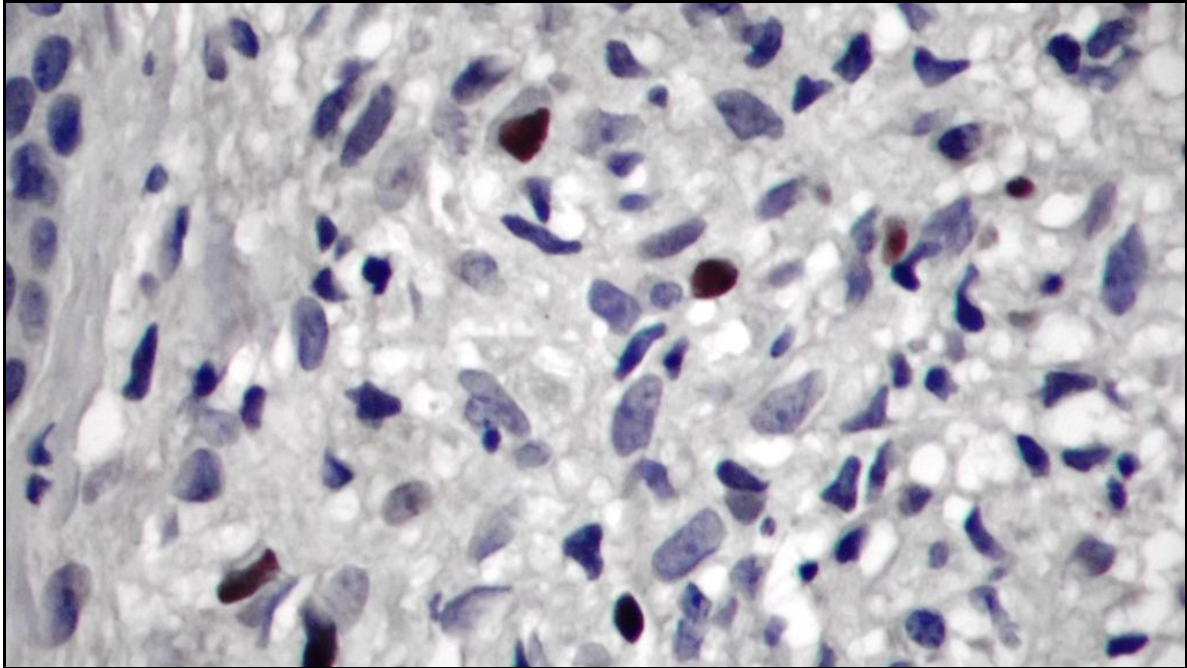


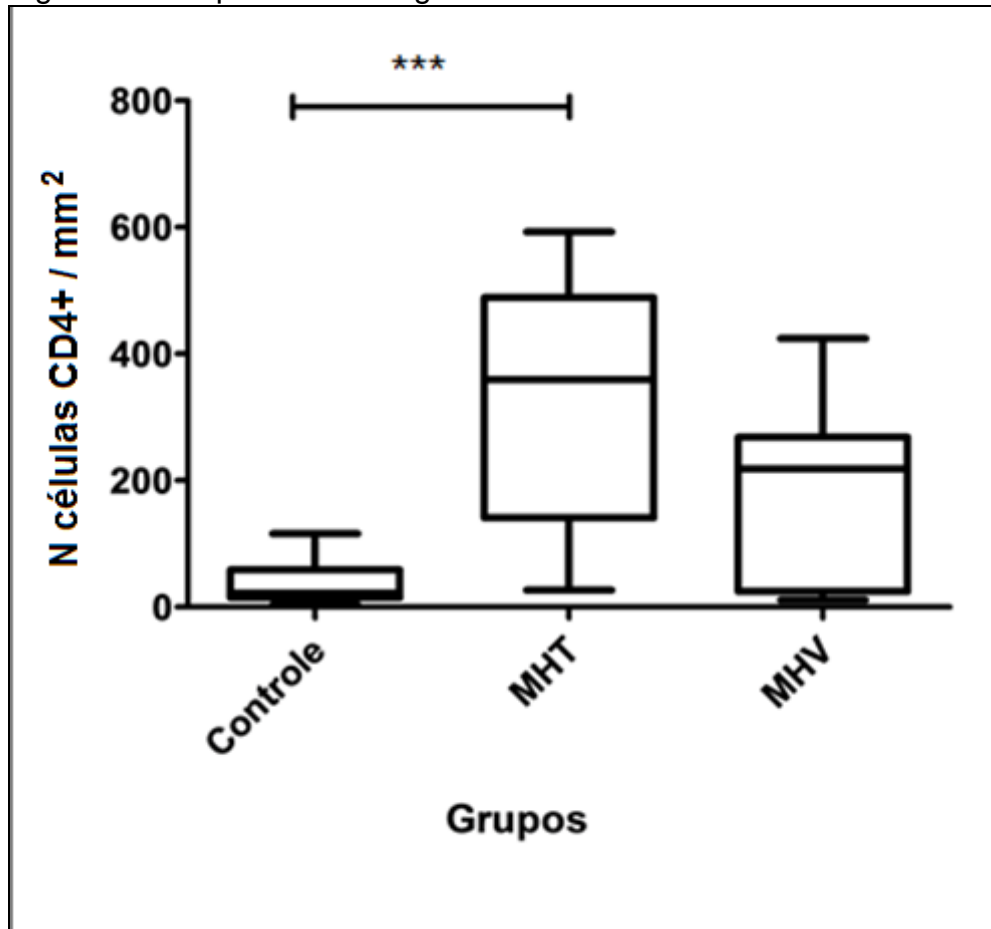
Figura 19 - Imunoexpressão de linfócitos FoxP3+ em MHV com aumento de 400X.



5.2.1 Detecção da população de células CD4+

Para a análise da quantidade de células expressando CD4, testes estatísticos não paramétricos foram aplicados apenas nos grupos MHT, MHV e controle, devido ao número de casos reduzido dos outros grupos, impossibilitando a inclusão destes. A quantificação automática evidenciou que no grupo MHT o número de células marcadas por mm^2 ($n^\circ \text{ cel}/\text{mm}^2$) variou de 27,0 a 592,6 cel/mm^2 , com a mediana de 358,9 e média de 326,2. No grupo MHV a variação foi de 11,5 a 424,1, com a mediana de 218,5 e média de 176,0. A variação no grupo controle foi de 3,5 a 89,6 cel/mm^2 , com mediana de 16,7 e média de 29,7. A diferença do número de células marcadas entre os grupos MHV e MHT e entre os grupos MHV e controle não foi estatisticamente significativa. Entretanto, houve significância estatística quando comparados os grupos MHT e controle com valor de $p= 0,0004$ (Figura 20).

Figura 20 – Expressão citológica de CD4 em casos de hanseníase.



*** P < 0,001.

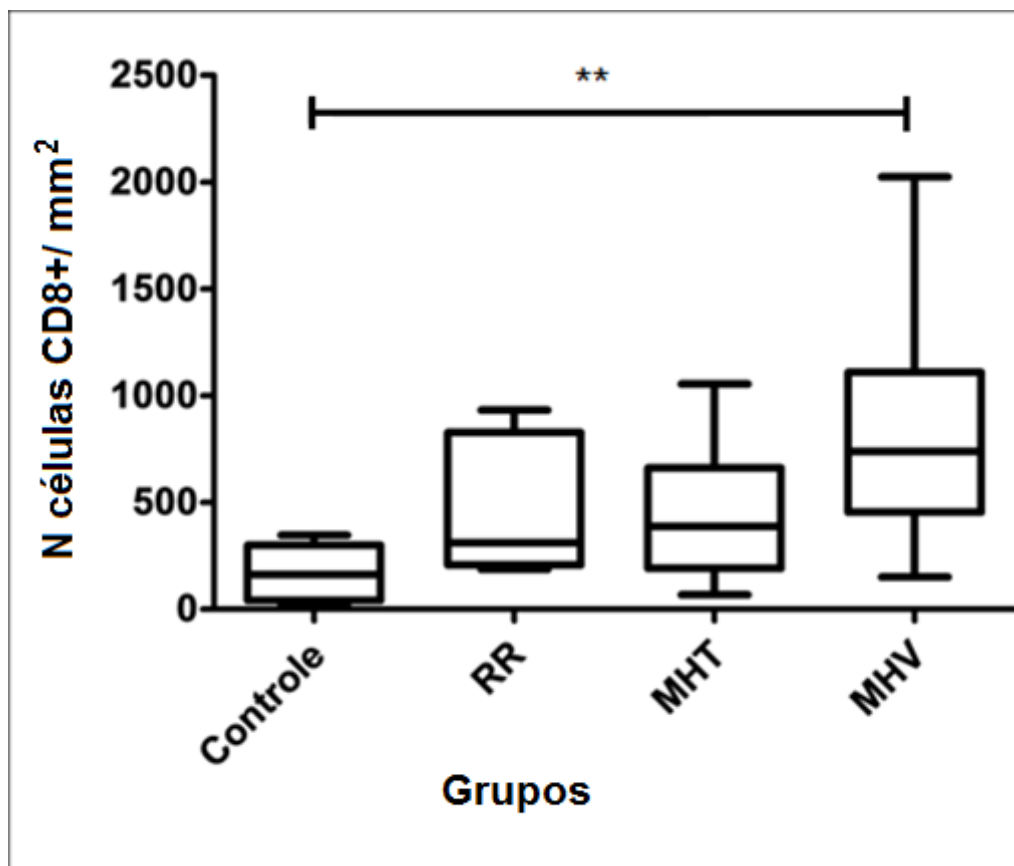
Um caso do grupo RR apresentou 31,3 cel/mm² e o outro 888,7 cel/mm². O único caso do grupo ENH apresentou 349,9 cel/mm², valor aproximadamente 21 vezes maior que o valor da mediana e 12 vezes maior que a média do grupo controle, valor semelhante à mediana e à média do grupo MHT e valor 1,6 vezes maior que o valor da mediana e aproximadamente 02 vezes maior que a média do grupo MHV.

5.2.2 Detecção da população de células CD8+

Para a análise da quantidade de células expressando CD8, os testes estatísticos não paramétricos foram aplicados apenas nos grupos MHT, MHV, RR e controle, devido à existência de apenas 01 caso no grupo ENH, impossibilitando a inclusão deste. No grupo MHT o número de células marcadas por mm² variou de 67,4 a 1.055,4 cel/mm², com a mediana de 388,1 e média de 427,3 No grupo MHV a

variação foi de 150,5 a 2.024,1, com a mediana de 738,8 e média de 800,1. A variação no grupo RR foi de 186,6 a 932,1 cel/mm² com mediana de 311,1 e média de 476,5. A variação no grupo controle foi de 24,5 a 346,8 cel/mm² com mediana de 161,8 e média de 172,3. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos MHV e controle, com $p= 0,0038$. Contudo, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos (Figura 21).

Figura 21 – Expressão citológica de CD8 em casos de hanseníase.



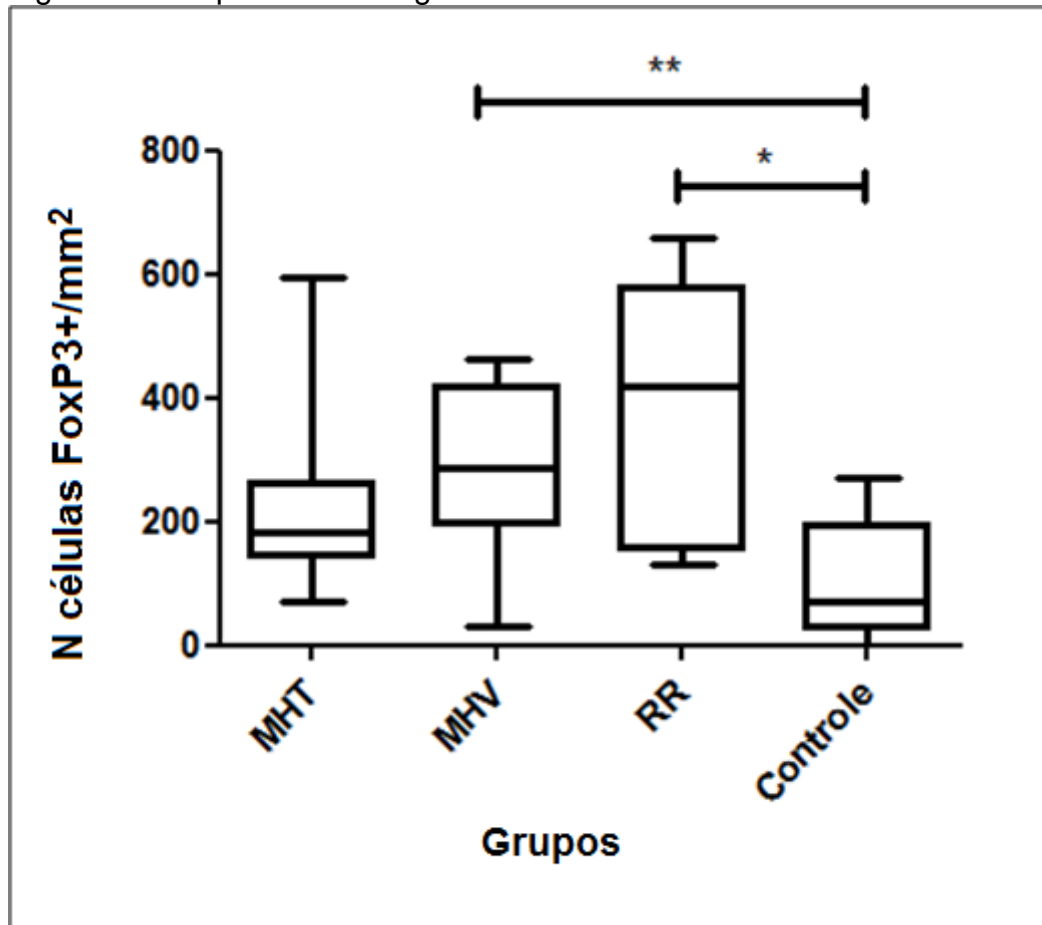
** $P < 0,01$.

O único caso do grupo ENH apresentou 333,75 cel/mm² valor aproximadamente 2 vezes maior que o valor da mediana e da média do grupo controle, valor semelhante à mediana e à média do grupo MHT, valor aproximadamente 02 vezes menor que o valor da mediana e 2,4 vezes menor que a média do grupo MHV. ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$ *** $P < 0,001$

5.2.3 Detecção da população de células FoxP3+

Para o anticorpo anti-FoxP3, testes estatísticos paramétricos foram aplicados apenas nos grupos MHT, MHV, RR e controle. No grupo MHT, o número de células marcadas por mm^2 ($n^\circ \text{ cel}/\text{mm}^2$) variou de 72,1 a 592,8 cel/mm^2 , com média de 216,5 e mediana de 184,6. No grupo MHV a variação foi de 29,7 a 463,3 com média de 282,4 e mediana de 286,2. A variação no grupo RR foi de 130,1 a 658,9 cel/mm^2 com média de 378,3 e mediana de 420,2. A variação no grupo controle foi de 0 a 270 cel/mm^2 com média de 110,9 e mediana de 72,4. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos MHV e controle e entre os grupos RR e controle (Figura 22).

Figura 22 – Expressão citológica de FoxP3 em casos de hanseníase.



* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

O único caso do grupo ENH apresentou 28 cel/mm² valor aproximadamente 4 vezes menor que a média do grupo controle, 7,7 vezes menor que a média do grupo MHT e aproximadamente 10 vezes menor que o valor da média do grupo MHV.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos a expressão de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ nas lesões cutâneas de diferentes formas clínicas de hanseníase e reações hansênicas. As células T CD4+ exercem um papel essencial na proteção contra patógenos intracelulares, incluindo o *M. leprae*. Essas células são responsáveis pela produção de IFN- γ e TNF- α , que irão ativar os mecanismos efetores microbicidas dos macrófagos. Dessa forma, há um predomínio de células T CD4+ nas lesões de pacientes com formas paucibacilares (MHT e MHBT) da hanseníase e uma redução dessas células nas lesões dos pacientes multibacilares (MHV e MHBV) (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Na quantificação dos linfócitos T CD4+, apesar da mediana do grupo MHT (358,9 cel/mm²) ter sido maior que a mediana do grupo MHV (218,15 cel/mm²), esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa, talvez pelo reduzido número de pacientes estudados. Entretanto, houve significância estatística quando comparados os grupos MHT (358,9 cel/mm²) e controle (16,7 cel/mm²) demonstrando um aumento desses linfócitos nas lesões dos pacientes portadores da forma tuberculoide da hanseníase em relação aos pacientes saudáveis. Esses achados estão de acordo com os dados da literatura. Sabe-se que as lesões cutâneas dos pacientes portadores de MHT são caracterizadas histologicamente por infiltrado inflamatório contendo granulomas bem formados com macrófagos diferenciados, células epitelioides e gigantes, com predomínio de células T CD4+ e ausência de bacilos. Já as lesões cutâneas dos pacientes portadores de MHV apresentam, na análise histopatológica, predomínio de células T CD8+, ausência de formação de granulomas e grande quantidade de bacilos (BHAT; PRAKASH, 2012).

A expressão do CD4 nas lesões cutâneas dos pacientes portadores de reações hansênicas (RR e ENH) não pôde ser avaliada quanto à significância devido ao reduzido número de casos em cada grupo.

Em relação aos linfócitos T CD8+, apesar da mediana do grupo MHV (738,8 cel/mm²) ter sido maior que as medianas dos grupos MHT (388,1 cel/mm²) e RR (311,1 cel/mm²), esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa. Entretanto, esta diferença foi significativa quando comparados os grupos MHV (738,8 cel/mm²) e controle (161,8 cel/mm²), evidenciando um aumento desses linfócitos nas lesões dos pacientes portadores da forma virchowiana da hanseníase

em relação aos pacientes saudáveis. Evidências sugerem que uma população distinta de células T CD8+ geradas durante infecções virais humanas como infecções por HIV, HCV e herpes vírus, possa contribuir para a supressão da resposta imunológica, favorecendo a persistência viral. Essas células se assemelhariam aos linfócitos Treg CD4+ (BILLERBECK; THIMME, 2008). Mediante técnicas imunohistoquímicas, demonstrou-se que as lesões virchowianas exibem uma relação CD4+/CD8+ de 0,6:1, e que enquanto as células CD4+ presentes eram primariamente do fenótipo virgem, as células CD8+ eram de fenótipo T supressor, podendo atuar na supressão da resposta imunológica mediada por células (MENDONÇA *et al.*, 2008). Uma possível explicação para esse aumento da população de células T CD8 no polo virchowiano da hanseníase, poderia ser a presença desses linfócitos supressores no sítio da lesão, fato que justificaria a disseminação do bacilo nessa forma da doença. Entretanto, estudos nesse sentido precisam ser realizados para melhor identificar essa subpopulação de células CD8+.

A polarização entre as respostas Th1 e Th2 tem sido questionada com a descoberta das células T regulatórias. Essas células podem estar relacionadas à hiporresponsividade da célula T observada nos pacientes lepromatosos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Alguns estudos já demonstraram diferenças nos linfócitos Treg no sangue periférico de pacientes portadores de diferentes formas de hanseníase, porém com resultados divergentes. Attia *et al.* em 2010 quantificaram as células Treg no sangue periférico de 38 pacientes portadores de hanseníase, antes da introdução do tratamento poliquimioterápico, através de citometria de fluxo. Desses pacientes 09 eram MHT, 13 pertencentes aos grupos borderlines, 08 MHV e 06 ENH. Esse estudo evidenciou um aumento desses linfócitos no polo MHT em relação aos pacientes saudáveis. Esses autores então sugeriram que os Treg, apesar de se mostrarem prejudiciais à resposta imunológica, poderiam ter um papel benéfico na hanseníase. Entretanto, Palermo *et al.* em 2012 quantificaram os linfócitos Treg no sangue periférico, também utilizando a técnica de citometria de fluxo, em 28 pacientes portadores de hanseníase antes da introdução do tratamento. Desses 28 pacientes, 16 eram portadores de formas multibacilares MHV (13) e MHBV (03) e 12 de formas paucibacilares MHT (02) e MHBT (10). Esse estudo encontrou um aumento dos linfócitos Treg CD4+CD25+FoxP3+ nos pacientes multibacilares em relação aos paucibacilares e contactantes saudáveis. Esses autores,

então, sugeriram que os linfócitos Treg possam exercer um papel patogênico na forma virchowiana da hanseníase levando a proliferação bacilar incontrolada.

A primeira vez que o FoxP3 foi demonstrado nas lesões cutâneas de pacientes portadores de hanseníase foi em 2010, quando Massone *et al.* avaliaram a expressão imunohistoquímica deste marcador em biópsias de pele de 20 casos de hanseníase, incluindo diferentes formas clínicas e reações hansênicas: 01 MHT; 03 MHBT; 05 MHBV; 05 MHV; 03 RR; 03 ENH. Entretanto, esse estudo, além de utilizar grupos muito pequenos, não utilizou nenhum método digital para a quantificação da imunoexpressão, realizando a contagem apenas de forma manual. Esses autores demonstraram a presença de células FoxP3 positivas em 19 dos 20 casos (95%) estudados. Apesar do pequeno número de casos, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo da expressão do FoxP3 nos 03 pacientes portadores do grupo RR em comparação com os 03 pacientes do grupo ENH. Esse aumento também se mostrou significativo quando comparado o grupo RR com todos os pacientes portadores de formas clínicas de hanseníase sem episódio reacional (14 pacientes). Não foi demonstrada, entretanto, diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas distintas de hanseníase sem episódio reacional. As células FoxP3+ nos grupos MHT e MHBT foram observadas tanto dentro quanto na periferia dos granulomas. Nos grupos MHBV, MHV e ENH, as células FoxP3+ estavam distribuídas aleatoriamente no infiltrado difuso de macrófagos. Esse estudo não utilizou grupo controle para comparação com os grupos de estudo. No presente estudo, também utilizando o anticorpo anti-FoxP3, quantificamos por imunohistoquímica essas células nas biópsias cutâneas de 46 pacientes, sendo 14 pacientes MHT, 11 pacientes MHV, 05 pacientes RR, 01 paciente ENH, além de 09 indivíduos saudáveis. De forma semelhante aos resultados encontrados por Massone e colaboradores, também encontramos um aumento de células FoxP3+ no grupo RR. A média do grupo RR (378,3 cels/mm²) mostrou-se maior em relação aos grupos MHT (216,5 cels/mm²), MHV (282,4 cels/mm²) e controle (110,9 cels/mm²). No entanto, essa diferença apresentou significância estatística apenas quando comparado o grupo RR com o grupo controle. A reação tipo 1 (RR) é considerada uma resposta de hipersensibilidade tardia ao *M. leprae* com exacerbação da resposta mediada por células, na qual ocorre infiltrado inflamatório com predomínio de células T CD4+ e macrófagos diferenciados com produção de IFN- γ e TNF- α . (BHAT; PRAKASH 2012). Os Treg, além de responsáveis pela manutenção da

autotolerância, também desempenham um papel essencial no equilíbrio da imunidade efetora mediada por células em resposta a infecções. A depender da intensidade da regulação imunológica exercida pelos Treg, estes podem facilitar a propagação do microorganismo, mas também podem apenas reduzir o dano tecidual local (BELKAID, 2008). O dano neural que ocorre na RR, responsável pelas incapacidades físicas e funcionais da hanseníase, decorre da produção de citocinas Th1 (IL2 e IFN- γ) e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (MENDONÇA *et al.*, 2008). Acreditamos que o aumento das células FoxP3+ no grupo RR possa decorrer da tentativa de proteção tissular num contexto de um processo inflamatório exacerbado. Nesse estudo, encontramos também diferença estatisticamente significativa entre os grupos MHV e controle, mostrando um aumento das células FoxP3+ no polo virchowiano da hanseníase. Esse achado está de acordo com o encontrado por Palermo e colaboradores em 2012, apesar desses autores não terem distinguido os pacientes com formas polares da hanseníase dos portadores de formas borderlines da hanseníase. Esses autores além de avaliar os linfócitos Treg CD4+CD25+FoxP3+ no sangue periférico de pacientes portadores de hanseníase, também analisaram a presença dessas células nas biópsias cutâneas de 09 pacientes paucibacilares (MHT e MHBT) e 11 pacientes multibacilares (MHV e MHBV), utilizando uma dupla marcação imunohistoquímica para identificar a coexpressão dos anticorpos anti-CD25 e anti-FoxP3. Os resultados encontrados identificaram um maior número dessas células nas lesões dos pacientes multibacilares em relação aos paucibacilares. Existem evidências na literatura de que a forma virchowiana da hanseníase esteja associada a uma reduzida expressão de genes tanto Th1 como Th2 e a um aumento na expressão de TGF- β e CTLA-4, moléculas expressas por células T regulatórias. Dessa forma, um aumento dessas células do polo virchowiano da hanseníase é esperado (KUMAR *et al.*, 2011). Nossos resultados juntamente com os de Palermo *et al.*, evidenciam uma maior expressão de células FoxP3+ no polo virchowiano da hanseníase corroborando essa hipótese. Esses achados também eram esperados no polo da doença com disseminação bacilar, considerando-se a conhecida associação dos Treg à ausência de uma resposta imunológica efetiva associada a certas infecções crônicas em seres humanos (BELKAID; TARBELL, 2009). Chen e colaboradores em 2007 demonstraram que o número de Treg aumenta no sangue e nos sítios de infecção em pacientes com tuberculose ativa e que a frequência de células FoxP3+ é

inversamente proporcional à imunidade específica local ao *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Estas descobertas sugerem que a infecção por Mtb possa induzir a expansão de células T CD4+CD25+FoxP3+ circulantes, relacionando-se com a progressão da infecção, e que o equilíbrio entre as respostas imunológicas efetora e supressora seja essencial para o controle da doença (HE *et al.*, 2009). Altos níveis de Treg circulantes também foram encontrados por Marin *et al.* em 2010 em pacientes com tuberculose pulmonar ativa, em comparação com indivíduos com infecção latente. Outro achado interessante desse estudo, é que a depleção de Treg aumentou a frequência de células produtoras de IFN- γ , sugerindo que, durante a tuberculose ativa os Treg podem inibir a resposta Th1, facilitando a replicação de micobactérias e danos teciduais.

O único caso estudado do grupo ENH apresentou uma expressão de células CD4+ (349,9 cel/mm²) aproximadamente 12 vezes maior que a média do grupo controle, com valor semelhante à média do grupo MHT e aproximadamente 02 vezes maior que a média do grupo MHV. Apesar do ENH, ser classicamente conhecido como um fenômeno mediado por imunocomplexos, estudos recentes sugerem também a participação da resposta imunológica mediada por células, tendo como principal subtipo celular o linfócito T CD4+, em contraste com a hanseníase virchowiana na qual as células T CD8 + predominam (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008). Quanto à expressão de células T CD8+ (333,75 cel/mm²), o número de células marcadas foi aproximadamente 2 vezes maior que o valor da média do grupo controle, semelhante à média do grupo MHT e 2,4 vezes menor que a média do grupo MHV. Esses achados demonstram a participação da resposta imunológica celular nesse estado reacional hanseníaco. Como já mencionado anteriormente, existem evidências do envolvimento não apenas da resposta humoral Th2, como também resposta celular Th1 nas lesões cutâneas e no soro de pacientes portadores de ENH, com produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008; BHAT; PRAKASH, 2012).

Analisando-se também a expressão do FoxP3, no único caso pertencente ao grupo ENH, verificamos que este apresentou um valor (28 cel/mm²) muito menor em relação aos outros grupos. Sendo aproximadamente 4 vezes menor que a média do grupo controle, 7,7 vezes menor que a média do grupo MHT e aproximadamente 10 vezes menor que a média do grupo MHV. Esse achado condiz com a intensidade

do processo inflamatório encontrado no ENH, muitas vezes acompanhado de manifestações sistêmicas.

Decidimos estudar os linfócitos Treg *in situ* nas lesões cutâneas de hanseníase na tentativa de entender melhor o que ocorre no sítio da lesão, já que estas células regulatórias exercem suas funções supressoras nos tecidos periféricos e não sistemicamente (BAECHER-ALLAN; HAFLER, 2012; WOOD; SAKAGUCHI, 2003). Apesar de não termos conseguido demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre as formas polares da hanseníase (MHT e MHV), identificamos um aumento significativo dessa população de células FoxP3+ nos grupos RR e MHV em relação aos indivíduos saudáveis. Assim como os outros dois trabalhos semelhantes a este, nós não conseguimos atingir o número de pacientes desejado. Acreditamos que essa dificuldade decorra do fato de a maioria dos pacientes diagnosticados com hanseníase pertencerem aos grupos borderlines da doença. (BRITTON; LOCKWOOD, 2004) Dessa forma, torna-se difícil selecionar apenas pacientes com diagnóstico recente de formas polares da hanseníase e que ainda não tenham iniciado o tratamento poliquimioterápico. Os dois estudos que analisaram os linfócitos Treg em biópsias cutâneas de hanseníase também apresentaram dificuldades em montar grupos formados exclusivamente por pacientes MHT e MHV, tendo sido necessária a inserção de pacientes borderlines. Neste trabalho, apesar de não termos encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos polares, este foi o único trabalho que conseguiu formar grupos exclusivamente compostos por pacientes MHT e MHV, sem tratamento prévio e com biópsias de lesões cutâneas. A decisão de não utilizar pacientes dos grupos borderlines foi tomada no intuito de evitar possíveis influências da conhecida instabilidade imunológica característica desse grupo de pacientes.

Houve também dificuldades na seleção de pacientes portadores de reações hansênicas, antes da introdução do tratamento específico imunossupressor, para a composição dos grupos RR e ENH. Acreditamos que tal evento possa decorrer do fato de que, na prática clínica rotineira, o diagnóstico desses episódios reacionais é realizado clinicamente, sem maiores dificuldades, dispensando a realização de estudos histopatológicos (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008). Além do que, uma vez diagnosticado um estado hansênico reacional, o tratamento deve ser introduzido o mais precocemente possível. Sendo assim, a maioria dos pacientes que participaram da seleção para o estudo encontrava-se em uso de medicação

imunossupressora, não obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão estipulados.

Da mesma forma que tentamos demonstrar a participação de células FoxP3+ na imunopatologia da hanseníase, Carneiro *et al.* em 2009, também utilizando o marcador FoxP3, analisaram biópsias de lesões cutâneas de 95 pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana. Desses 95 pacientes, 68 eram portadores da forma localizada, 16 da forma cutânea mucosa, 07 da forma cutânea difusa e 03 da forma disseminada. Esses autores encontraram um maior número de células FoxP3+ nas lesões da forma difusa da leishmaniose em comparação com a forma localizada, sugerindo que essas células possam estar associadas à hiporresponsividade observada nessa forma clínica.

Acreditamos que estudos com maior número de pacientes são necessários para melhor elucidar o papel das células FoxP3+ nas diferentes formas clínicas da hanseníase, bem como em seus episódios reacionais, já que a participação destas já foi demonstrada nesta doença. Os mecanismos pelos quais os linfócitos Treg exercem sua função supressora, bem como um melhor entendimento de sua participação na hanseníase e em outras doenças infecciosas crônicas, podem fornecer novos alvos terapêuticos para o controle da infecção pelo *M. leprae*. Nesta linha, vêm sendo desenvolvidos novos agentes farmacológicos cujos alvos são moléculas expressas pelo Treg. Dentre eles temos o Tremelimumab, modulador do CTLA-4, utilizado em melanomas avançados e o Daclizumab, modulador de CD25, utilizado na esclerose múltipla e em câncer de mama avançado (PETERSON, 2012).

A realização de estudos sobre a participação dos Treg, bem como de outras células e citocinas ainda não muito bem conhecidas, inicia uma nova era no que diz respeito ao conhecimento da imunopatogênese da hanseníase, enfraquecendo a visão dicotômica reducionista do paradigma Th1/Th2 até então utilizado nesta doença. Dessa forma, esforços nesse sentido poderão contribuir para a otimização do tratamento da hanseníase e de seus estados reacionais, prevenindo a ocorrência das tão temidas sequelas mutilantes características desta doença.

7 CONCLUSÕES

- A imunexpressão de linfócitos FoxP3+ foi identificada nas biópsias cutâneas tanto dos pacientes portadores de hanseníase quanto dos indivíduos sadios, mostrando-se estatisticamente maior nos portadores da forma virchowiana da hanseníase e da reação hansênica tipo 1 em relação aos indivíduos sadios.

- A imunexpressão de linfócitos T CD4+ mostrou-se estatisticamente maior nas lesões dos pacientes portadores da forma tuberculoide da hanseníase em relação aos indivíduos sadios, enquanto a imunexpressão de linfócitos T CD8+ mostrou-se estatisticamente maior nas lesões dos pacientes portadores da forma virchowiana da hanseníase em relação aos indivíduos sadios.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M. H.; SAUVAGE, F. J.; GURNEY, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1910-1914, 2003.

ANDRADE, V. P.; CUNHA, I. W.; SILVA, E. M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 4, p. 55-60, 2007.

ASANO, M.; TODA, M.; SAKAGUSHI, N.; SAKAGUSHI, S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 387-396, 1996.

ATTIA, E. A.; ABDALLAH, M.; SAAD, A. A.; AFIFI, A.; EL TABBAKH, A.; EL-SHENNAWY, D.; ALI, H. B. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 10, p. 1152-1158, 2010.

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.

BALA, K. K.; MOUDGIL, K. D. Induction and maintenance of self-tolerance: the role of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 54, n. 5, p. 307-321, 2006.

BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D. A. Suppressor T cells in human diseases. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 3, p. 273-276, 2004.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 353-360, 2005.

BELKAID Y. Regulatory T cells in infection and autoimmunity: role of FoxP3-positive regulatory T cells during infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 901-937, 2008.

BELKAID Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of Host Microorganism Interactions. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 551-589, 2009.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, 2008.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, 2012: 181089.

BILLERBECK, E.; THIMME, R. CD8+ regulatory T cells in persistent human viral infections. **Human Immunology**, v. 69, p. 771-775, 2008.

BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 3, p. 253-257, 2003.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004.

CAMPBELL, D. J.; ZIEGLER, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 305-310, 2007.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico Hanseníase**, jun. 2012. Disponível em: <http://www.saude.ce.gov.br/site/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=9:boletins&download=86:08&Itemid=244>. Acesso em: 25 set. 2012.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico Hanseníase**, fev. 2013. Disponível em: <http://www.saude.ce.gov.br/site/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=9:boletins&download=86:08&Itemid=244>. Acesso em: 09 mai. 2013.

CHEN, X.; ZHOU, B.; LI, M.; DENG, Q.; WU, X.; LE, X.; WU, C.; LARMONIER, N.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; WANG, H.; KATSANIS, E. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. **Clinical Immunology**, v. 123, p. 50-59, 2007.

CONSTANTINO, C. M.; BAECHER-ALLAN, C. M.; HAFLER, D. A. Human regulatory T cells and autoimmunity. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 901-937, 2008.

GAVIN, M.; RUDENSKY, A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 6, p. 690-696, 2003.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GRAYSON, W.; CALONJE, E.; MCKEE, P. H. Infectious disease of skin. In: McKee, author. **Pathology of the skin: with clinical correlations**. 3. ed. London: Elsevier, 2005. p. 910-918.

HE, X. Y.; XIAO, L.; CHEN, J.; HAO, Y. J.; HE, K.; GAO, Y.; SHI, B. Y. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, p. 643-650, 2010.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.

JOPLING, W. H.; MCDUGALL, A. C. **Manual de Hanseníase**. 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1991.

KAHAWITA, I. P., LOCKWOOD, D. N. J. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 329-337, 2008.

KAHAWITA, I. P.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n.1, p. 75-82, 2008.

KONONEN, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, n.7, p. 844-847, 1998.

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

LOCKWOOD D. N. J. Leprosy. In: BURNS, T.; BREATHNACH, S.; COX, N.; GRIFFITHS, C. (editors). **Rook's textbook of dermatology**. 7. ed. Oxford: Blackwell science, 2004. p. 29.1-29.21.

LYAKH, L.; TRINCHIERI, G.; PROVEZZA, L.; CARRA, G.; GEROSA, F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 112-131, 2008.

MARIN, N. D.; PARÍS, S. C.; VÉLEZ, V. M.; ROJAS, C. A.; ROJAS, M.; GARCÍA, L. F. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 90, p. 252-261, 2010.

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. **The Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n.5, p. 626-630, 2012.

MASSONE, C.; NUNZI, E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, C.; TALHARI, S.; SCHETTINI, A. P. M.; PARENTE, J. N. T.; BRUNASSO, A. M. G.; PUNTONI, M.; CLAPASSON, A.; NOTO, S.; CERRONI, L. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in Hansen disease: a new insight into pathogenesis? **The American Journal of Dermatopathology**, v. 32, n. 3, p. 251-256, 2010.

MENDONÇA, V. A.; MELO, G. E. B. A.; TEIXEIRA, A. L.; COSTA, R. D.; ANTUNES, C. M. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343-350, 2008.

MONOT, M. *et al.* On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, p. 1040-1042, 2005.

MURAKAMI, M.; SAKAMOTO, A.; BENDER, J.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 13, p. 8832-8837, 2002.

OUKKA, M. Th17 cells in immunity and autoimmunity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67(Supl 3), p. 26-29, 2008.

PALERMO, M. L.; PAGLIARI, C.; TRINDADE, M. A. B.; YAMASHITAFUJI, T. M.; DUARTE, A. J. S.; CACERE, C. R.; BENARD, G. Increased expression. Os regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n.5, p. 878-883, 2012.

PETERSON, R. A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. **Toxicologic Pathology**, v. 40, p.186-204, 2012.

RONCAROLO, M.; GREGORI, S. The validity of FoxP3 to define human and mouse regulatory T cells: Is FoxP3 a *bona fide* marker for human regulatory T cells? **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 901-937, 2008.

SAKAGUSHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; CONSTANTINO, C.M.; HAFNER, D.A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Immunology**, v. 10, p. 490-500, 2010.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v. 30, p. 636-645, 2009.

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, n. 2, p. 338-381, 2006.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia Tropical: Hanseníase**. 3. ed. Manaus: Gráfica Tropical, 1997.

THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin-2 production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 2, p. 287-296, 1998.

VIGNALI, D.A.A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nature Immunology**, v. 8, p. 523 - 532, 2008.

WHO. Global leprosy situation, 2012. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 87, n. 34, p. 317-328, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2012/wer8734.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2012.

WOOD, K. J.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 3, p. 199-210, 2003.

YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, S.; KITAWAKI, T.; HORI, S.; MAEDA, M.; ONODERA, M.; UCHIYAMA, T.; FUJII, S.; SAKAGUCHI, S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **International Immunology**, v. 16, n. 11, p. 1643-1656, 2004.

YAMAMURA, M. K.; UYEMURA, R. J.; DEANS, K.; WEINBERG, T. H.; REA, B.R.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277-279, 1991.

APÊNDICES

APENDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Estudo da expressão imunohistoquímica de linfócitos T-reg CD4+CD25+FoxP3+ e do receptor da interleucina 23 em biópsias cutâneas de pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas” que tem por objetivo estudar a expressão imunohistoquímica de linfócitos T-reg CD4+CD25+FoxP3+ e do receptor da interleucina 23 em biópsias cutâneas de pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas.

A Hanseníase é uma doença contagiosa causada por uma bactéria chamada *Mycobacterium Leprae* que é transmitida de uma pessoa para outra pelo ar.

A doença causa manchas na pele, dormência no corpo e sequelas que podem dificultar realização dos movimentos normais. Pode também causar febre e dor no corpo quando ocorrem as reações hansênicas.

As diferentes formas de apresentação da doença dependem do sistema imunológico de cada paciente. Sendo assim, são necessários estudos que avaliem melhor a forma como cada paciente reage à infecção pelo bacilo da hanseníase para tentar prever aqueles que desenvolverão as formas mais graves. Descobertas nesse assunto poderão melhorar o tratamento da hanseníase e prevenir as sequelas da doença.

Após a suspeita do seu diagnóstico de hanseníase, será realizada uma biópsia de pele para realização de testes que permitam avaliar a forma como o sistema imunológico se comporta durante a infecção. A biópsia consiste na retirada de um fragmento pequeno de pele após aplicação de anestesia local. Esse exame é rotineiramente realizado nos pacientes com suspeita de hanseníase e auxilia na confirmação do diagnóstico e na classificação da forma da doença. É um procedimento simples cujos riscos possíveis se restringem ao desenvolvimento de reação alérgica ao anestésico utilizado e aparecimento de pequena cicatriz no local do procedimento.

Você terá acompanhamento regular no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio e receberá o tratamento oferecido pelo Ministério da Saúde gratuitamente, mesmo que não deseje participar desse estudo.

Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Qualquer dúvida, favor entrar em contato através do número (85) 9223 6182 para falar com a pesquisadora responsável (Dra Daniela Ventin).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Fortaleza, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

APENDICE B – Dados referentes a idade, sexo, índice baciloscópico, quantificação das células CD4+, CD8+ e FoxP3+ dos casos estudados.

CASO	SEXO	IDADE	GRUPO	BI	CD4 n cel/mm ²	CD8 n cel/mm ²	FoxP3 n cel/mm ²
Caso 1	M	58	MHT	0	-	213,6	103,8
Caso 2	F	47	MHT	0	261,1	378,8	221,3
Caso 3	F	41	MHT	0	384	397,3	176
Caso 4	F	38	MHT	0	-	662,9	592,8
Caso 5	F	48	MHT	0	333,8	1055,4	329,4
Caso 6	F	18	MHT	0	-	67,4	93,7
Caso 7	F	59	MHT	0	498	516,1	161,7
Caso 8	F	42	MHT	0	100,9	-	291,7
Caso 9	M	64	MHT	0	122,6	241,7	72,1
Caso 10	F	65	MHT	0	530	123,5	-
Caso 11	F	45	MHT	0	461,7	751,4	252,6
Caso 12	M	27	MHT	0	196,3	195,2	157,6
Caso 13	F	30	MHT	0	406,9	661,4	184,5
Caso 14	F	57	MHT	0	592,6	535,2	209,8
Caso 15	M	65	MHT	0	27	182,7	184,7
Caso 16	M	28	MHV	3,8	268,6	1147	422
Caso 17	M	45	MHV	5,2	-	692,4	463,3
Caso 18	M	60	MHV	2,4	116	784,8	193,8
Caso 19	F	59	MHV	0	255,5	1089	292,7
Caso 20	F	53	MHV	1,6	-	-	-
Caso 21	F	39	MHV	1,6	11,5	498,4	29,7
Caso 22	F	45	MHV	2,6	25	2024,1	286,2
Caso 23	M	26	MHV	2,8	20,5	150,5	199,1
Caso 24	M	57	MHV	1,2	424,1	1129,8	-
Caso 25	F	59	MHV	0,6	40,7	716,2	271
Caso 26	F	56	MHV	3,2	264	828,2	420,3
Caso 27	F	73	MHV	3,25	218,5	413,1	-
Caso 28	M	75	MHV	-	292,5	738,8	390,6
Caso 29	F	30	MHV	2	-	200,6	138
Caso 30	F	68	RR	0,2	888,7	932,1	420,2
Caso 31	M	19	RR	1	31,3	723,7	658,9
Caso 32	M	64	RR	0	-	186,6	183,2
Caso 33	M	74	RR	0	-	311,1	499,1
Caso 34	M	48	RR	0	-	229,2	130,1
Caso 35	M	56	ENH	-	349,9	333,8	28
Caso 36	F	70	Controle	-	7,8	236,4	141,7

Caso 37	F	18	Controle	-	3,5	280,8	218,2
Caso 38	F	46	Controle	-	-	-	-
Caso 39	F	34	Controle	-	-	-	55,9
Caso 40	F	26	Controle	-	39	60,3	67,6
Caso 41	F	38	Controle	-	21,8	34,9	0
Caso 42	M	71	Controle	-	16,7	24,5	172,1
Caso 43	M	55	Controle	-	14,6	87,1	0
Caso 44	M	61	Controle	-	59	-	72,4
Caso 45	M	18	Controle	-	89,6	307,4	270
Caso 46	M	36	Controle	-	15,7	346,8	-

APENDICE C – Dados referentes ao total de lâminas coradas, variação, mediana e média da imunexpressão para cada anticorpo, discriminados por grupo de estudo.

GRUPO	MHT	MHV	RR	ENH	CONTROLE
MÉDIA DE IDADE	46,93 (±14,58)	50,35 (±15,53)	54,60 (±22,10)	56	43,00 (±19,19)
N CASOS CD4	12	11	2	1	9
N CASOS CD8	14	13	5	1	8
N CASOS FOXP3	14	11	5	1	9
VARIAÇÃO CD4	27 -592,6	11,5 - 424,1	31,3 - 888,7	349,9	3,5 - 89,6
MEDIANA CD4	358,9	218,5	-	-	16,7
MÉDIA CD4	326,2	176,0	-	-	29,7
VARIAÇÃO CD8	67,4 - 1055,4	150,5- 2024,1	186,6 - 932,1	-	24,5 - 346,8
MEDIANA CD8	388,05	738,8	311,1	-	161,75
MÉDIA CD8	427,3	800,1	476,5	-	172,3
VARIAÇÃO FOXP3	72,1 - 592,8	29,7 - 463,3	130,1 - 658,9	-	0 - 270
MEDIANA FOXP3	184,6	286,2	420,2	-	72,4
MÉDIA FOXP3	216,5	282,4	378,3	-	110,9

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430.370 – Fortaleza-Ce
FONE: (85) 3366-8589/ 3366 8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 079.07.11 (2)

Pesquisador(a) Responsável: Daniela Ventin Prates Rezende

Departamento/ Serviço:

Título do Projeto: **“Estudo da expressão imunohistoquímica de linfócitos T-reg CD4+CD25+FoxP3+ e do receptor da interleucina 23 em biópsias cutâneas de pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas.”**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou o projeto de pesquisa supracitado e em tendo sido atendidas as pendências baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: APROVADO.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 30/08/12).

Fortaleza, 30 de agosto de 2011.

Maria de Fátima de Souza

Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC

ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em relação à utilização de biópsias de pele armazenadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430.370 – Fortaleza-Ce
FONE: (85) 3366-8589/ 3366 8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 079.07.11

Pesquisador(a) Responsável: Daniela Ventin Prates Rezende

Departamento/ Serviço:

Título do Projeto: **“Estudo da expressão imunohistoquímica de linfócitos T-reg CD4+CD25+FoxP3+ e do receptor da interleucina 23 em biópsias cutâneas de pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas.”**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio **aprovou**, na sessão do dia 05/11/2012, os seguintes documentos relativos ao projeto acima epigrafado: Adendo solicitando utilizar biópsias antigas; Novo cronograma e Termo de Fiel Depositário.

Fortaleza, 06 de novembro de 2012.

Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC