UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

CARLOS GUSTAVO WAMBIER

**Papel da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-*kappa* B) na expressão
cutânea da hanseníase**

RIBEIRÃO PRETO

2012

CARLOS GUSTAVO WAMBIER

**Papel da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-*kappa* B) na expressão
cutânea da hanseníase**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

**Área de concentração: Clínica Médica
Opção: Investigação Clínica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Norma
Tiraboschi Foss**

RIBEIRÃO PRETO

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

WAMBIER, Carlos Gustavo.

Papel da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-*kappa* B) na expressão cutânea da hanseníase. Ribeirão Preto, 2012.

82p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Foss, Norma Tiraboschi.

1. Hanseníase. 2. Fatores de Transcrição. 3. NF-*kappa* B. 4. Imunomodulação. 5. TNF-alfa.

Wambier CG. **Papel da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-*kappa* B) na expressão cutânea da hanseníase.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Clínica Médica.

Aprovado em: 17 de Fevereiro de 2012.

Profª. Dra. Norma Tiraboschi Foss Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Dra. Lucia Martins Diniz Instituição: UFES

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado Instituição: UFPA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha esposa, **Sarah**, com muita admiração e gratidão pelo seu amor, apoio e compreensão imensuráveis.

Aos meus pais, **Luís Fernando e Maria Clarícia**, pelo amor e exemplos de médicos dedicados e íntegros.

Aos meus avós, **Darcyr (*in memoriam*) e Áurea**, pelo exemplo de união, força e família.

MINHA HOMENAGEM

À Profa. Dra. Norma T. Foss

Professora da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
Por nortear-me e pela imensa capacidade de liderança e cooperação. Por todos estes anos de ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Marco Andrey C. Frade

Professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
Pelo incentivo, disposição e atitude científica.

Ao Prof. Dr. Luiz Marino Bechelli (*in memoriam*)

Professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
Pelo legado no conhecimento da hanseníase e nos seus discípulos.

Ao Dr. Marco Antônio Vilhena (*in memoriam*)

Dermatologista e Cirurgião Dermatológico do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
Pelas lições de vida.

AGRADECIMENTOS:

À Profa. Dra. Leandra Naira Z. Ramalho

Professora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Pela colaboração, imensa dedicação e visão para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Bellissimo-Rodrigues

Professor do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Pelo incentivo, lições em medicina e amizade.

Ao Dr. Fernando Crivelenti Vilar, pelas lições em infectologia e por ter me ensinado a colher baciloscopias durante a residência médica.

Ao Dr. João Carlos Simão, pelas lições na prática dermatológica e colaboração científica.

Ao Dr. Wayne Carey e Dr. Denis Sasseville, Royal Victoria Hospital, Divisão de Dermatologia, Universidade de McGill, Canadá, pelo incentivo em investir na minha carreira dermatológica.

Ao Dr. Mark Aaron Cappel, Divisão de Dermatologia, Mayo Clinic, Florida, pela amizade, lições em dermatologia e colaboração.

À Maria Aparecida Nunes, Auristella de Melo Martins e Mário Ignácio Neto pelo excelente apoio técnico na execução deste trabalho.

RESUMO

Wambier CG. Papel da ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-*kappa* B) na expressão cutânea da hanseníase [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012. 82f.

O perfil de ativação do NF- κ B foi avaliado em biópsias de 47 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de hanseníase, seguidos no Ambulatório de Hanseníase do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Tropical com Ênfase em Hanseníase do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. O índice de ativação NF- κ B foi calculado de acordo com a porcentagem de positividade na histoquímica Southwestern. Índice de ativação NF- κ B >1 foi considerado representativo de ativação. Trinta e seis por cento dos pacientes apresentaram NF- κ B ativado na biópsia, o que foi mais frequente em multibacilares (54,6%) que em paucibacilares (20%), $p=0,018$. Hanseníase tuberculóide esteve associada com ausência de NF- κ B ativado ($p=0,039$). Forma dimorfa e neural pura estiveram associadas com ativação de NF- κ B, com *odds ratio* de 44 ($p=0,014$) e 30 ($p=0,029$), respectivamente. A ativação correlacionou-se com detecção *in situ* de fator de necrose tumoral por imuno-histoquímica ($p=0,0064$). Observou-se grande variação da ativação do NF- κ B nas formas clínicas de hanseníase. Ativação foi nula em granulomas de hanseníase tuberculóide, que representa a reação inflamatória mais efetiva contra o *M. leprae*. A ativação do NF- κ B ocorreu predominantemente em formas clínicas com maior suscetibilidade (multibacilares) e instabilidade imunológica (dimorfa), indicando condição favorável à infecção pela ativação do NF- κ B, por seus efeitos antiapoptóticos, visto que o bacilo depende das funções celulares para sobreviver.

Palavras-chave: hanseníase; fatores de transcrição; NF-*kappa* B; imunomodulação; TNF- α .

ABSTRACT

Wambier CG. The role of nuclear factor *kappa* B (NF-*kappa* B) activation in the cutaneous expression of leprosy [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012. 82f.

NF- κ B activation profile was evaluated in cutaneous biopsies from 47 patients with clinical and laboratorial diagnosis of leprosy followed at a referral center for treatment of leprosy, the leprosy outpatient clinic of the Hospital of Clinics of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo. NF- κ B activation index (ranging from 0 to 4) was calculated according to the percentage of positivity in Southwestern histochemistry. Activation index >1 was considered representative of activation. Thirty-six percent of patients presented activated NF- κ B, which was more frequent in multibacillary (54,6%) than in paucibacillary (20%), $p=.018$. Tuberculoid leprosy was associated with absence of activated NF- κ B ($p=.039$). Borderline and pure neural leprosy clinical forms were associated with NF- κ B activation, with odds ratio of 44 ($p=.014$) and 30 ($p=.029$), respectively. NF- κ B activation was correlated with *in situ* detection of tumor necrosis factor- α by immunohistochemistry ($p=.0064$). Great variation of NF- κ B activation was found in clinical forms of leprosy. Activation was absent in tuberculoid leprosy's granulomas, which represent effective inflammatory reaction pattern against *M. leprae*. NF- κ B activation was present in clinical forms with increased susceptibility (multibacillary) and immunological instability (borderline), which suggests favorable conditions towards infection, probably due to the anti-apoptotic effects of NF- κ B, since bacillary survival is dependent of cellular functions.

Keywords: leprosy; transcription factors; NF-*kappa* B; immunomodulation; TNF-alpha.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BAAR:	Bacilo álcool-ácido resistente
c-IAP:	Proteína inibidora de apoptose celular
DD:	Hanseníase dimorfa
DO:	Densidade óptica
DT:	Hanseníase dimorfa-tuberculóide
DV:	Hanseníase dimorfa-virchoviana
ELISA:	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HI:	Hanseníase indeterminada
IC:	Intervalo de confiança
IE:	Índice de ELISA
IFN- γ :	Interferon-gama
IkB:	Inibidores do <i>kappa</i> B
IRI:	Índice de imunorreatividade
MB:	Hanseníase multibacilar
MHC:	Complexo de histocompatibilidade maior
NF- κ B:	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NP:	Hanseníase neural pura
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PB:	Hanseníase paucibacilar
PBMC:	Células mononucleares do sangue periférico
PQT:	Poliquimioterapia
TGF- β :	Fator transformador do crescimento-beta
TLR:	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF- α :	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAF:	Fator associado ao receptor TNF
TT:	Hanseníase tuberculóide
VV:	Hanseníase virchoviana

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Padrões clínico-imunopatológicos da hanseníase. TT: hanseníase tuberculóide, DT: dimorfa-tuberculóide, DD: dimorfa, DV: dimorfa-virchoviana, VV: virchoviana, IL: interleucina, IFN- γ : interferon-gama, ENH: eritema nodoso hansênico. Adaptado de: Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. Lancet. 2004; 363(9416):1209-19. 18
- Figura 2 – Estimativa de taxas de prevalência de hanseníase. Adaptado de: Global Leprosy Situation. Leprosy prevalence rates 2011 [internet] World Health Organization; c2011 [citado 20 nov. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf. 22
- Figura 3 – Fotomicrografia de *Mycobacterium leprae* isolados de hansenoma após digestão enzimática. Coloração Ziehl-Neelsen, magnificação original 400x. (concedida pelo Prof. Dr. Marco Andrey C. Frade – FMRP-USP). 24
- Figura 4 – Linhagens de células T CD4: citocinas e funções. (Adaptado de: Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008; 112:1557-69.) 28
- Figura 5 – Citocinas na hanseníase. IFN γ : Interferon-gama, IL: interleucina, LT α : linfotóxina-alfa, TGF β : fator transformador do crescimento-beta, TNF α : fator de necrose tumoral-alfa, M Φ : macrófago, Th1, Th2, Th17, Treg: subpopulações de linfócitos T- CD4+, Treg: linfócito T regulatório. 30
- Figura 6 – Esquema de subfamílias das subunidades NF- κ B: Rel (RelA, RelB, c-Rel, Dorsal e Dif) com domínio de ativação transcripcional e NF- κ B (p105, p100 e Relish), com seu respectivo domínio inibitório. Domínio de homologia Rel permite dimerização e ligação ao DNA. 32
- Figura 7 – Mecanismo de ativação e ação do NF- κ B. Ativação do heterodímero NF- κ B composto pelas proteínas Rel e p50 pela via clássica, a partir da ligação ao receptor de membrana, tais como o receptor de TNF- α ou receptor *Toll-like*. No citosol o NF- κ B está em seu estado inativo quando está formando um complexo com a proteína inibitória I κ B α . Sinalizadores extracelulares (ex: TNF- α) ativam a enzima I κ B quinase (IKK) que fosforila a proteína I κ B α , resultando em ubiquitinação e dissociação do complexo I κ B α /NF- κ B, e degradação da I κ B α .

pelo proteossomo. O NF- κ B ativado é translocado ao núcleo, onde se liga aos sítios específicos de DNA. O complexo DNA/NF- κ B recruta outras proteínas como ativadores e a RNA polimerase que transcreve o DNA em mRNA que é traduzido em uma proteína que resulta em mudança da função celular.....33

Figura 8 – Hanseníase. Fotomicrografias representativas da detecção de NF- κ B ativado por histoquímica *Southwestern*. (Magnificação original 200x). As setas apontam núcleos corados em roxo-azulado onde ocorreu ativação e translocação nuclear de NF- κ B. **A- Índice de ativação “0”**, não se observou núcleos corados, controle negativo. **B- Índice de ativação “1”**, observou-se menos de 10% dos núcleos corados, em células esparsas, provavelmente linfócitos de lesão da forma tuberculóide. **C- Índice de ativação “2”**, observou-se 11-25% de núcleos corados, em células relativamente próximas, em infiltrado dérmico superficial, provavelmente linfo-histiocitário, além de fibroblastos (setas) de lesão da forma dimorfa-tuberculóide. **D- Índice de ativação “3”**, observou-se 26-50% de núcleos corados, em células agrupadas em derme superficial e média, tanto perivascular quanto perineural. Houve marcação de células do endotélio vascular (ponta de seta), fibroblastos, histiócitos e linfócitos de lesão da forma virchoviana. **E- Índice de ativação “4”**, observou-se >50% de núcleos corados, em células agrupadas em derme superficial, média e profunda, difusamente, com marcação mais intensa perivascular e perineural. Observou-se marcação de fibroblastos, células endoteliais, histiócitos e linfócitos de lesão da forma dimorfa.41

Figura 9 – Hanseníase. Fotomicrografias representativas da detecção de TNF- α por imuno-histoquímica. (Magnificação original 200x). Detecção quantificada por índice de imunorreatividade (IRI), que variou de 0-3, apresentado nos painéis A-D respectivamente. Setas apontam detecção de áreas de marcação em marrom. **A- IRI=“0”**, ausência de marcação em infiltrado linfo-histiocitário perineural de lesão da forma indeterminada. **B- IRI=“1”**, marcação de até 10% de pontos positivos na derme média, em infiltrado linfo-histiocitário ao redor de esboço de infiltrado granulomatoso perineural de lesão da forma dimorfa-virchoviana. **C- IRI=“2”**, marcação de 11-25% de pontos positivos circundando denso infiltrado linfo-histiocitário ao redor de granuloma de lesão da forma dimorfa-tuberculóide.

D- IRI="3" , marcação de 26-50% de pontos positivos em infiltrado histiocitário de lesão da forma virchoviana. Não houve IRI="4" na amostra.....	44
Figura 10 – Hanseníase. Fotomicrografias representativas da detecção de colágeno tipo 1 por imuno-histoquímica. (Magnificação original 200x). Detecção quantificada por índice de imunorreatividade (IRI), que variou de 0-3, apresentado nos painéis A-D respectivamente. Setas apontam detecção de áreas de marcação em marrom. A- IRI="0" , ausência de marcação em lesão da forma dimorfa-tuberculóide. B- IRI="1" , marcação de até 10% de pontos positivos no infiltrado histiocitário de lesão da forma virchoviana. C- IRI="2" , marcação de 11-25% de pontos positivos, em infiltrado linfo-histiocitário de lesão da forma indeterminada. D- IRI="3" , marcação de 26-50% de pontos positivos ao redor de granulomas epitelióides de lesão da forma tuberculóide. Não houve IRI="4" na amostra.	46
Figura 11 – Índice de ativação do NF-κB por forma clínica da hanseníase: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV). DD apresentou maiores índices de ativação e maior porcentagem de NF-κB ativado. As formas paucibacilares apresentaram baixos índices de ativação: HI, TT e DT; exceto NP.	52
Figura 12 – Índice de imunoreatividade (IRI) ao fator de necrose tumoral (TNF-α) detectado e quantificado <i>in situ</i> por forma clínica da hanseníase: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV). Observaram-se maiores IRI em formas multibacilares: DD, DV e VV que em paucibacilares: NP, HI, TT e DT ($p=0,005$). IRI=3 esteve associado a formas multibacilares ($p=0,007$).	58
Figura 13 – Predição quadrática do índice de imunorreatividade ao fator de necrose tumoral (TNF-α) pelo índice de ativação NF-κB.	59
Figura 14 – <i>Box plot</i> do índice de ativação do NF-κB e índice de imunorreatividade (IRI) ao TNF-α quantificados a partir de biópsias de pacientes com hanseníase, pelo espectro clínico da hanseníase: hanseníase neural pura (NP), hanseníase indeterminada (HI), hanseníase tuberculóide (TT), hanseníase dimorfa-tuberculóide (DT), hanseníase dimorfa (DD), hanseníase dimorfa-virchoviana (DV) e hanseníase virchoviana (VV).	59

Figura 15 – <i>Box plot</i> do índice de ativação do NF- κ B e índice de imunoreatividade (IRI) ao TNF- α quantificados a partir de biópsias de pacientes com hanseníase, pela classificação operacional: paucibacilares (PB) e multibacilares (MB).....	60
Figura 16 – Índice de imunoreatividade (IRI) ao colágeno tipo 1 detectado e quantificado <i>in situ</i> por forma clínica da hanseníase: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV). Observou-se que os quatro pacientes TT apresentaram IRI=3, portanto IRI=3 esteve associado a forma TT ($p=0,017$).	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da hanseníase. Adaptada da 10 ^a revisão da classificação estatística internacional de doenças e de problemas relacionados à saúde* contendo correções terminológicas sugeridas por Opromolla, 2005**.....	19
Tabela 2 – Índices de ativação do NF-κB por forma clínica e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).....	51
Tabela 3 – Dados epidemiológicos dos 47 pacientes com diagnóstico de hanseníase cujas biópsias foram avaliadas quanto à ativação do NF-κB.	54
Tabela 4 – Análise por regressão logística da ativação do NF-κB de acordo com a classificação clínica, ajustado pela faixa etária, sexo, resultado da pesquisa de bacilos na biópsia e resultado da sorologia.	55
Tabela 5 – Análise por regressão logística da ativação do NF-κB de acordo com a classificação operacional, ajustado pela faixa etária e sexo.	56
Tabela 6 – Comparação da porcentagem de NF-κB ativado e da positividade de indicadores de multibacilares: baciloscopias, pesquisa de bacilos álcool-ácidos pelo método de Fite-Faraco (FF) e sorologia anti-PGL-1 IgM, dentre os 47 pacientes com diagnóstico de hanseníase classificados quanto à forma clínica: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV), e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS): Hanseníase multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) cujas biópsias foram avaliadas quanto à ativação de NF-κB.....	56
Tabela 7 – Índice de imunorreatividade (IRI) ao TNF-α avaliado <i>in situ</i> nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com diagnóstico de hanseníase classificados pela forma clínica e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).....	57
Tabela 8 – Índice de imunorreatividade (IRI) ao colágeno tipo 1 avaliado <i>in situ</i> em biópsias de lesões cutâneas de pacientes com diagnóstico de hanseníase classificados pela forma clínica e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Classificação clínica.....	16
1.2	Terminologia	19
1.3	Tratamento	20
1.4	Classificação operacional OMS	20
1.5	Situação epidemiológica	20
1.6	Agente causal	22
1.7	Transmissão.....	24
1.8	Invasão neural	25
1.9	Imunidade na hanseníase.....	26
1.9.1	Resposta imunológica celular e teste de Mitsuda.....	26
1.9.2	Resposta humoral e anti-PGL-1	27
1.9.3	Espectro de citocinas.....	28
1.10	NF-κB e resposta imunológica.....	31
1.11	NF-κB e hanseníase.....	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Geral	36
2.2	Específicos	36
3	MÉTODOS.....	37
3.1	Critérios de inclusão.....	37
3.2	Critérios de exclusão	38
3.3	Revisão de prontuário.....	38
3.4	Biópsias	39
3.5	Histoquímica <i>Southwestern</i>	39
3.6	Imuno-histoquímica	43
3.7	ELISA anti-PGL-1 (IgM).....	47

3.8	Baciloscopia	48
3.9	Análise estatística	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Ativação do NF- κ B	50
4.2.	Detecção e quantificação <i>in situ</i> de TNF- α	57
4.3	Detecção e quantificação <i>in situ</i> de colágeno tipo 1	61
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

Hanseníase é uma micobacteriose crônica que tem atormentado a humanidade há milênios.¹ É causada pela transmissão do *Mycobacterium leprae* por indivíduos bacilíferos, podendo ocasionar infecção na pele, cavidade nasal e nervos periféricos,² eventualmente levando a deformidade, dor, disfunção e até morte. Resulta em agravamento dos problemas socioeconômicos de diversos países em desenvolvimento.³⁻⁵

1.1 Classificação clínica

O espectro de manifestações da hanseníase é complexo e sua classificação em formas clínicas é baseada na imunorreatividade do hospedeiro contra o bacilo.⁶ As formas polares: tuberculóide (TT) e virchoviana (VV) são bem caracterizadas e estáveis, com diferenças clínicas e imunopatológicas marcantes.⁶

A forma TT é caracterizada por plena imunidade celular, com consequente destruição bacilar. Contém a infecção pelo *M. leprae* de forma rigorosa. Manifesta-se com lesões cutâneas e neurais únicas ou em pequeno número, placas bem delimitadas, eritemato-edematosas com bordas elevadas e mononeurite. Histologicamente há presença de infiltrado tuberculóide caracterizado por granulomas de células epitelióides e escassez ou ausência de bacilos. Os granulomas epitelióides são geralmente alongados, acompanhando o trajeto do filete neural. Podem apresentar necrose central, onde é possível encontrar filetes nervosos destruídos.^{7,8}

Na forma VV ocorre o extremo oposto. É caracterizada por deficiência de imunidade celular, sendo altamente suscetível à infecção pelo *M. leprae*. Além do tegumento e nervos, pode acometer órgãos internos. Apresenta lesões cutâneas difusas, mal delimitadas e simétricas, caracterizadas por infiltração dérmica, tornando-se edematosas, ou formando nódulos (hansenomas) e alterações tróficas, secundárias à perda crônica de anexos e denervação, tais como a descamação e rarefação de pelos, a anidrose e xerose cutânea, devido ao acometimento de glândulas sudoríparas e unidades pilo-sebáceas, respectivamente. Há polineuropatia simétrica. As lesões têm predileção por áreas mais frias do corpo (extremidades) e são ricas em bacilos. Histologicamente há infiltrado histiocitário difuso dérmico que atinge subcutâneo, apresentando faixa de colágeno normal entre a derme e a epiderme, denominada faixa de Unna, que representa a zona de Grenz poupada. A epiderme

está achatada e a derme papilar geralmente encontra-se retificada. Nesse infiltrado, predominam macrófagos com citoplasma espumoso, contendo lipídeos e abundância de bacilos, denominados células de Virchow. Observam-se numerosos bacilos, formando grupamentos variados e em arranjo denominado globia, peculiar do *M. leprae*, resultante da sólida união entre bacilos por substância conhecida como gléia.⁸⁻¹⁰

Nas formas interpolares, denominadas dimorfas, as manifestações clínicas contemplam características incompletas das formas polares, apresentando-se em geral como lesões eritêmato-edematosas, de limites internos precisos e externos indefinidos, com centro hipocrômico e anestésico.^{11,12} A hanseníase dimorfa (DD) é caracterizada por instabilidade imunológica e lesões polimórficas das duas formas polares. Alguns indivíduos apresentam mais elementos de uma forma polar sobre a outra: a hanseníase dimorfa-tuberculóide (DT) tende a apresentar menor número de lesões, formação de granulomas e baciloscopias negativas, enquanto que a hanseníase dimorfa-virchoviana (DV) tende a apresentar lesões disseminadas e simétricas, baciloscopias positivas e menor delimitação das lesões (**Figura 1**). As alterações histológicas dependem do quadro clínico e podem ser constituídas de granulomas menos densos e presença de escassas células espumosas. Como essas formas da doença não são sempre estáveis, o paciente pode apresentar variações espontâneas de reatividade contra o bacilo no curso natural ou durante o tratamento. Nestas variações de imunidade podem ocorrer quadros inflamatórios denominados reações hansênicas agudas, classificadas como tipo I ou reação reversa (RR) e tipo II ou eritema nodoso (ENH).^{6,13,14}

A RR envolve principalmente mecanismos da imunidade celular, caracterizados histologicamente pela exacerbação de resposta granulomatosa que se torna edematosa, podendo acometer inclusive a epiderme.^{3,15} Na reação tipo ENH ocorre a formação de imunocomplexos, ativação do sistema complemento, com desenvolvimento de processo inflamatório sistêmico que pode comprometer diferentes órgãos. Ocorre principalmente entre os pacientes multibacilares e é caracterizada histologicamente por infiltrado neutrofílico geralmente acompanhado de vasculite leucocitoclástica.^{15,16}

Figura 1 – Padrões clínico-imunopatológicos da hanseníase. TT: hanseníase tuberculóide, DT: dimorfa-tuberculóide, DD: dimorfa, DV: dimorfa-virchoviana, VV: virchoviana, IL: interleucina, IFN- γ : interferon-gama, ENH: eritema nodoso hansênico. Adaptado de: Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. Lancet. 2004; 363(9416):1209-19.

Fora deste espectro, uma ou poucas manchas hipocrômicas, iniciais, com perda de sensibilidade caracteriza a hanseníase indeterminada (HI) e o acometimento neural, com espessamento, desmielinização e perda da função, mononeurite múltipla sem a detecção de lesões cutâneas concomitantes ocorre especificamente na hanseníase neural pura (NP).^{17,18} Existem quadros totalmente anérgicos, onde há disseminação do parasita por todo o tegumento, causando uma infiltração difusa na pele, chamada forma virchoviana difusa, hanseníase de Lúcio ou “lepra bonita”.^{19,20} Nestes casos, o paciente pode evoluir para um grave quadro de lesão vascular por invasão do bacilo no endotélio vascular, determinando tromboembolismo e vasculite, denominado fenômeno de Lúcio ou eritema necrotizante.^{19,21–23}

1.2 Terminologia

A 10ª Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – CID-10²⁴ é empregada pelo Ministério da Saúde em publicações oficiais relacionadas às doenças.²⁵ Adaptando o CID-10 ao contexto do Brasil, onde o vocábulo "lepra" foi abolido dos textos oficiais por uma lei federal,^{26,27} obteve-se a classificação clínica da **Tabela 1**.

Tabela 1 – Classificação da hanseníase. Adaptada da 10ª revisão da classificação estatística internacional de doenças e de problemas relacionados à saúde* contendo correções terminológicas sugeridas por Opromolla, 2005**.

A30 Hanseníase

Inclui: infecção causada pelo *Mycobacterium leprae*

Exclui: sequelas de hanseníase (B92)

A30.0 Hanseníase Indeterminada / Hanseníase I

A30.1 Hanseníase Tuberculóide / Hanseníase TT

A30.2 Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide / Hanseníase DT

A30.3 Hanseníase Dimorfa / Hanseníase DD

A30.4 Hanseníase Dimorfa-Virchoviana / Hanseníase DV

A30.5 Hanseníase Virchoviana / Hanseníase VV

A30.8 Outras formas de hanseníase

A30.9 Hanseníase, não classificada

* Organização Mundial da Saúde. Classificação estatística internacional de doenças e de problemas relacionados à saúde. 10ª revisão. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 1992.

**Opromolla PA, Martelli AC. A terminologia relativa à hanseníase. An Bras Dermatol. 2005;80(3):293-294.

1.3 Tratamento

Até o início da década de 1940 não havia tratamento farmacológico eficaz. O isolamento compulsório em leprosário era o método de controle da endemia. Com o advento da dapsona houve importante revolução no tratamento, com controle parcial da doença, redução de sequelas, melhora na qualidade de vida dos pacientes e reintegração à sociedade. Os pacientes passaram a ser tratados em regime ambulatorial, evitando o isolamento estigmatizante.²⁸ Como o tratamento era prolongado e a adesão irregular ocorreu resistência medicamentosa.

Na década de 80, com a introdução da poliquimioterapia (PQT), recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), houve interrupção na cadeia de transmissão do bacilo. Com sua erradicação no hospedeiro, a cura se tornou possível.²⁹

Apesar do otimismo sobre o controle da moléstia com a PQT, dados recentes demonstraram que tal procedimento contribuiu apenas para uma acentuada diminuição na taxa de prevalência, entretanto, sem apresentar uma redução importante na incidência em áreas endêmicas, indicando que a PQT não bloqueia o ciclo de transmissão da doença e que os casos multibacilares não diagnosticados podem representar possíveis fontes de infecção.^{30,31}

1.4 Classificação operacional OMS

Para padronização terapêutica, a OMS introduziu e atualmente recomenda a classificação em hanseníase paucibacilar (PB) quando houver até cinco lesões cutâneas e em multibacilar (MB) quando houver mais de cinco lesões.³² Anteriormente eram levadas em consideração as formas clínicas e os índices baciloscópicos para esta classificação operacional.²⁹

1.5 Situação epidemiológica

Apesar do emprego mundial da poliquimioterapia (PQT) desde 1982²⁹ ter reduzido drasticamente a prevalência da hanseníase, esta doença milenar continua sendo problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, tanto pela dificuldade no controle endêmico quanto pelas incapacidades sequelares.

A prevalência mundial é de 192 mil casos, com incidência de 3,93 casos novos por 100 mil habitantes em 2010.³³ Em 1991 a Assembléia de Saúde Mundial da OMS adotou uma resolução para estabelecer prioridade na eliminação da hanseníase, com uma meta de eliminação de coeficiente de prevalência menor de um caso para 10.000 habitantes.³⁴

Na Europa foi virtualmente erradicada, mas continua endêmica na África, Ásia e América Latina. O Brasil ocupa posição de destaque entre os países que não atingiram a meta de eliminação. Em 2010 apresentou prevalência de 30 mil casos e coeficiente de prevalência de 1,6 casos por 10.000 habitantes,^{33,35} sendo detectados 35 mil casos novos dentre os 228.474 casos novos diagnosticados no mundo da doença em 2010, segundo a OMS.³³ Nesse contexto, o Brasil ocupa a segunda posição em número de casos novos de hanseníase, com 15,2% e a Índia a primeira, com 126.800 casos novos, o que corresponde a 55,5%.³³ Em 2011 pelos dados reportados à OMS, o Brasil apresentou coeficiente de prevalência mais alto que a Índia³⁶ (**Figura 2**). Dados preliminares apontaram para uma notificação de 30.298 novos casos em 2011, com coeficiente de detecção de 1,59 casos novos por 10.000 habitantes, com índice de prevalência geral de 1,24 casos por 10.000 habitantes.^{37,38}

O Ministério da Saúde (MS) declarou que a hanseníase era endêmica em todo o território brasileiro, com coeficientes de prevalência bastante variáveis, oscilando entre 0,52/10.000 no Sul a 4,27/10.000 na região Norte no ano de 2010.³⁵

Figura 2 – Estimativa de taxas de prevalência de hanseníase. Adaptado de: Global Leprosy Situation. Leprosy prevalence rates 2011 [internet] World Health Organization; c2011 [citado 20 nov. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf.

1.6 Agente causal

O bacilo de Hansen (*Mycobacterium leprae*) foi descoberto há 139 anos.³⁹ Apresenta-se sob a forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado. Pelo fato de corar-se em vermelho pela fucsina e não se descorar por álcool e ácidos, durante o processo clássico de coloração, descrito por Ziehl-Neelsen, o bacilo é conhecido como álcool-ácido resistente - BAAR (**Figura 3**), é aeróbio, intracelular obrigatório, não cultivável *in vitro*.³ O *M. leprae* é exemplo extremo de evolução redutiva, com seu genoma que comporta um contingente massivo de pseudogenes, ocasionando dependência de inúmeros genes e fatores da célula hospedeira para sua multiplicação e sobrevivência.⁴⁰ É a bactéria com o mais longo período de duplicação conhecido, de aproximadamente 14 dias.⁴¹ Recentemente foi descrita outra espécie de micobactéria (agente FJ924, ou *Mycobacterium lepromatosis*), geneticamente

distinta do *Mycobacterium leprae*, como agente causal de hanseníase virchoviana difusa em indivíduos procedentes do México que desenvolveram fenômeno de Lúcio fatal.⁴²⁻⁴⁴ Contudo, tais evidências foram questionadas por falta de estudos sobre sua patogenicidade (inoculação em cobaias) e falta de tentativas de cultura em diferentes meios para micobactérias.⁴⁵

O *Mycobacterium leprae* apresenta na composição de sua parede celular um glicopeptídeo, específico dessa micobactéria, denominado glicolípide fenólico fração 1: PGL1 que tem características antigênicas e induz a formação do anticorpo anti-PGL1.

Figura 3 – Fotomicrografia de *Mycobacterium leprae* isolados de hansenoma após digestão enzimática. Coloração Ziehl-Neelsen, magnificação original 400x. (concedida pelo Prof. Dr. Marco Andrey C. Frade – FMRP-USP).

1.7 Transmissão

Admite-se que a hanseníase seja transmitida de pessoa a pessoa, através das vias respiratórias, mas não há provas conclusivas de que essa seja a única via, podendo também ocorrer por via cutânea, quando há solução de continuidade na pele. A principal fonte de infecção é o homem, portador das formas multibacilares dimorfa e virchoviana.⁴⁶ De acordo com os conhecimentos atuais, o *Mycobacterium leprae* pode infectar, além do homem, outros animais tais como tatu, macaco, chimpanzé e camundongo, porém não representam importância na cadeia epidemiológica de transmissão, até o momento.⁸

Acredita-se que a patogênese da doença esteja relacionada à entrada do bacilo pelas vias aéreas superiores, disseminação hematogênica seguida do reconhecimento e fagocitose pelas células de Schwann, responsável pela produção do revestimento do axônio, resultando na desmielinização do local acometido e proliferação do patógeno.⁴⁷

1.8 Invasão neural

A infecção do nervo periférico ocorre via vaso sanguíneo, após colonização dos vasos (sanguíneo e linfático) do epineuro e endoneuro, tornando-se viável à fagocitose pela célula de Schwann, gerando lesão progressiva do nervo periférico.⁴⁷ A célula de Schwann, responsável pela produção da mielina que envolve o axônio de nervo periférico, é considerada o principal suporte celular do sistema nervoso periférico. Para ser efetuado o processo de fagocitose do patógeno por essa célula há necessidade do “reconhecimento” do *M. leprae*. Acredita-se que a fração glicolípido fenólica - PGL1 esteja envolvida com o comprometimento do nervo periférico devido ao tropismo e à interação do *M. leprae* com o sítio α_2 -laminina da célula de Schwann do nervo periférico.^{48,49} Após o contato do bacilo de Hansen com a célula de Schwann, ela se torna um local ideal para a multiplicação do parasita, liberação de bacilos e consequente infecção das células adjacentes. A infecção de células de Schwann por *M. leprae* viáveis aparentemente favorece a sobrevivência das células de Schwann ao invés de sua apoptose, e a proliferação de seu fenótipo desmelienizado,⁵⁰ resultando na anestesia e hipocromia da região da inervação comprometida. Entretanto, existem situações em que esse processo se acompanha de acentuada reação inflamatória, sendo a manifestação de neurite.

Células de Schwann também expressam receptor Toll-like (TLR)-2 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e sua interação com lipoproteínas derivadas de *M. leprae* desencadeia a apoptose.⁵¹ Neste sentido, foi descrito que uma mutação no domínio intracelular do TLR-2 (Arg₆₇₇Trp) está associada o desenvolvimento da forma VV,⁵² apesar disto, foi descrito que esta mutação está associada à ausência de ativação *in vitro* de NF- κ B mediante à exposição a antígenos de *M. leprae* e *M. tuberculosis*.⁵³ Portanto, seria importante avaliar a ativação NF- κ B em biópsias dos pacientes das diversas formas clínicas, inclusive em nervo periférico na forma neural pura.

1.9 Imunidade na hanseníase

1.9.1 Resposta imunológica celular e teste de Mitsuda

Na hanseníase a imunidade celular dirigida contra o patógeno intracelular pode ser avaliada através da intradermorreação de Mitsuda, que consiste na inoculação intradérmica de 0,1 ml de suspensão de bacilos de Hansen inativados por calor na autoclave, obtidos a partir de hansenomas humanos (lepromas), portanto denominada lepromina,⁵⁴ ou exclusivamente a partir de organismos obtidos a partir da inoculação em tatus, desde 1970 distribuídos pela OMS.⁴⁷ A reação é positiva se após quatro semanas resultar em pápula infiltrada acima de cinco milímetros (imunidade celular preservada) ou é negativa se não houver pápula. A reação positiva não é específica para a exposição ao bacilo, uma vez que a maioria dos indivíduos procedentes de áreas não endêmicas apresentam o teste positivo.⁵⁵ É um indicador da capacidade individual de formar reação granulomatosa contra o bacilo e portanto é um indicador de resistência contra o *M. leprae*. O ideal seria a sua avaliação por biópsia e exame histopatológico.⁴⁷ A intradermorreação de Mitsuda é a única reação intradérmica cujo período para a leitura é de quatro semanas, o que contempla todos os passos para a ativação da imunidade celular contra a micobactéria.⁴⁷ Isto inclui a fagocitose por células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), digestão lisossomal, formação do complexo proteína / complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe II e exposição na superfície celular para apresentação às células T virgens e às células T de memória.⁵⁶ A apresentação do antígeno no linfonodo regional para as células T virgens ocorre principalmente por células dendríticas (células de Langerhans).⁵⁷ A apresentação às células T de memória / efetoras ocorre principalmente na derme por macrófagos (histiócitos). Ocorre a expansão clonal de células T de memória, estimulada por células T CD4+ Helper 1 (Th1) e seu perfil de citocinas (vide **1.9.3. Espectro de citocinas**), que estimulam os macrófagos a aumentarem sua capacidade de opsonização e formarem granulomas. Este processo testa a capacidade do indivíduo a expressar imunidade celular tardia contra antígenos do *M. leprae*.

Portanto, os pacientes podem ser classificados em suscetíveis ou resistentes à doença pelo resultado da reação de Mitsuda, pois a reação é negativa em VV e positiva em TT.⁵⁸ Uma exceção é a ocorrência de reação intensa, aguda (quatro a seis horas após a inoculação da lepromina) e necrotizante, denominada reação de Medina ou Medina-Ramirez, que ocorre tipicamente em pacientes anérgicos (forma VV difusa) durante o fenômeno de Lúcio.^{22,23} A

falta de resposta ao Mitsuda parece ser altamente específica para o antígeno do *M. leprae*, uma vez que os portadores da doença respondem bem a outros antígenos e não apresentam suscetibilidade aumentada às demais infecções.⁵⁹

1.9.2 Resposta humoral e anti-PGL-1

A parede celular do *M. leprae* contém o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), que estimula uma potente resposta de anticorpos IgM (Anti-PGL-1) específicos contra o *M. leprae*, que é proporcional à carga bacilar dos pacientes e apresenta redução com o tratamento.^{3,60}

Pacientes suscetíveis à doença apresentam depressão de sua imunidade celular e durante a sua evolução desenvolvem elevadas concentrações de anti-PGL-1 (IgM) no soro, porém a resposta imunológica humoral é pouco efetiva na hanseníase.⁵⁸ Já os doentes da forma TT apresentam títulos baixos do anticorpo específico, em semelhança aos controles normais.¹⁰ Sorologia anti-PGL1 tem aplicação clínica para seguimento da terapêutica dos pacientes das formas ricas em bacilos, apresentando queda dos níveis de anticorpos com a diminuição da carga bacilar. Entretanto, durante os episódios reacionais, especialmente o eritema nodoso pode ocorrer aumento da produção desses anticorpos com exacerbação do quadro clínico.

A polarização da resposta imune em ativação de imunidade celular (Th1) ou ativação da imunidade humoral (Th2) é um ponto crucial do desenvolvimento de resistência ou suscetibilidade, respectivamente. A indução da polarização sofre influência da predisposição genética e do perfil de citocinas liberadas durante interação da célula T CD4⁺ virgem com a célula apresentadora de antígeno.⁵⁶ Nas formas multibacilares da hanseníase ocorre o desencadeamento da resposta imune polarizada para o tipo Th2, desde a fagocitose do bacilo até a manutenção do processo pelas células efectoras-linfócitos T, resultando na multiplicação bacilar e disseminação da doença, devido à ineficiência e bloqueio da atividade Th1, associada à reação inflamatória periférica.

1.9.3 Espectro de citocinas

A regulação da resposta imunológica às infecções pode ser avaliada pelo resultado do padrão de citocinas produzidas por diferentes subpopulações de células T CD4 (**Figura 4**). Na hanseníase estas interações são complexas e não foram totalmente elucidadas (**Figura 5**).

Figura 4 – Linhagens de células T CD4: citocinas e funções. (Adaptado de: Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008; 112:1557-69.)

As principais citocinas produzidas pela linhagem Th1 são: interferon- γ (IFN- γ), linfotoxina-alfa (LT α) e interleucina (IL)-2.⁶¹ Tais citocinas são mais intensamente detectadas na forma TT.⁶² IFN- γ é fundamental na ativação de macrófagos para aumentarem sua atividade microbicida e sua expressão de MHC classe I e II. LT α estimula o desenvolvimento e manutenção do granuloma.⁶³ IL-2 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da memória imunológica das células T, estimulando a expansão numérica e funcional de clones de células T selecionadas por determinado antígeno. O perfil de citocinas Th1 ocasiona destruição bacilar e contenção da infecção, resultando em doença localizada.^{58,64,65} A ativação do NF- κ B está envolvido tanto na sinalização intracelular da ativação de macrófagos quanto na ativação das células T CD4+ efectoras.⁶⁶

As principais citocinas produzidas pela linhagem Th2 são: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 e anfiiregulina.⁶¹ Este perfil de citocinas aumenta a atividade da resposta imunológica mediada por anticorpos, estimulando linfócitos B. IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 são detectados mais intensamente na forma VV e devem contribuir para a ineficácia da resposta imune celular inibindo a ativação dos macrófagos, impedindo a destruição bacilar.⁶² O perfil de citocinas Th2 resulta em progressão da infecção.^{58,65} O NF- κ B está envolvido na sinalização intracelular da ativação de linfócitos B.⁶⁶ Fatores que contribuem para aumento destas citocinas como alergias ou infestações intestinais, que possuem aumento de citocinas Th2 podem contribuir para a suscetibilidade às formas MB da hanseníase, por favorecerem esta polarização.^{67,68}

As principais citocinas produzidas pela linhagem Treg são: IL-10, IL-35 e fator transformador de crescimento (TGF- β 1).⁶¹ Tais citocinas estimulam a tolerância imunológica e a supressão da resposta inflamatória. TGF- β 1 é detectado nas formas multibacilares, mais intensamente na forma VV.^{69,70} TGF- β 1 é um potente estimulador da colagênese (colágeno tipo 1), está envolvido diretamente na ativação de fibroblastos durante a formação de queloides.⁷¹ A presença de IL-10 em lesões de VV sugere possível papel na deficiência da resposta imunológica específica contra o *M. leprae*. IL-10 atua predominantemente em linfócitos T, inibindo a produção de citocinas de IL-2 e IFN- γ .⁷² Outras células T CD4 além da Th2 e Treg também produzem IL-10. A produção de IL-10 por células Th1 e Th17 pode exercer papel importante em limitarem suas próprias funções efectoras.⁶¹

As principais citocinas produzidas pela linhagem Th17 são: IL-17a, IL-17f, IL-21 e IL-22.⁶¹ Tais citocinas recrutam e ativam neutrófilos durante resposta imunológica contra bactérias extracelulares e fungos⁶¹ e estão sendo estudadas na reação hansênica tipo 2 (ENH), que envolve reação inflamatória aguda rica em neutrófilos.

A produção local de TNF- α pelo macrófago favorece a ação sinérgica autócrina para manter o macrófago ativado na formação do granuloma, além de induzir vasodilatação e favorecer adesão e migração celular, está presente na fase aguda das reações hansênicas tipo 1 (reação reversa) e tipo 2 (eritema nodoso hansênico), induzindo lesão tecidual e neural^{63,73–76} juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6.⁷² Tais citocinas podem favorecer a diferenciação de células Th17 na presença de TGF- β .⁶¹ A interleucina-12 (IL-12), importante fator estimulador da síntese de IFN- γ pelas células NK, encontra-se mais elevada nas lesões TT, quando comparadas às VV.⁷⁷ Citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α quando se ligam aos seus receptores, induzem ativação do NF- κ B. A ativação do NF- κ B

também induz a transcrição de genes de IL-1 β e TNF- α .⁷⁸ Portanto a correlação entre a ativação de NF- κ B e a presença *in situ* de TNF- α na hanseníase necessita investigação. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória chave nos mecanismos imunológicos relacionados às lesões hansênicas e suas morbidades clínicas como dor, deformidade e disfunção.

O TNF- α também atua como um importante mediador de apoptose, que é uma função celular essencial para manutenção de homeostase em organismos multicelulares. Ao interagir com seus receptores de membrana, sinaliza duas respostas distintas, a ativação de apoptose via Caspase-8 e a inibição da apoptose e consequente estímulo à sobrevivência e proliferação celular via NF- κ B.⁶⁶

Figura 5 – Citocinas na hanseníase. IFN γ : Interferon-gama, IL: interleucina, LT α : linfotóxina-alfa, TGF β : fator transformador do crescimento-beta, TNF α : fator de necrose tumoral-alfa, MΦ: macrófago, Th1, Th2, Th17, Treg: subpopulações de linfócitos T- CD4+, Treg: linfócito T regulatório.

1.10 NF- κ B e resposta imunológica

A família de fatores de transcrição denominados NF- κ B, também conhecidos como: “*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*” controla os processos imunológicos por desempenhar papel fundamental na modulação da resposta inflamatória e proliferação celular. Geralmente está inativado no citosol devido a uma ligação às proteínas inibitórias denominadas inibidores do *kappa* B (I κ B).⁷⁹ A ativação do NF- κ B é iniciada devido a sinalização desencadeada por citocinas, TLR, radicais livres de oxigênio e radiação ultravioleta.⁸⁰ Sua ativação é essencial tanto na imunidade inata quanto na adquirida, sendo fundamental na inflamação, ativação de linfócitos, sobrevivência celular e na formação de órgãos linfoides secundários.⁶⁶

Os membros da família NF- κ B exibem homologia estrutural à oncoproteína retroviral v-Rel, resultando na sua classificação como proteínas NF- κ B/Rel. Compostas em duas subfamílias: proteínas ‘NF- κ B’ e as proteínas ‘Rel’. Todas estas proteínas apresentam um mesmo domínio de ligação ao DNA e dimerização, chamado de “domínio da homologia Rel”⁸¹ (**Figura 6**). Os dímeros de NF- κ B se ligam a sítios de DNA de 9-10 pares de bases que têm uma grande variabilidade (sítios κ B), (5'-GGGRNWYYCC-3', sendo que R=A ou G; N=qualquer nucleotídeo; W=A ou T; Y=C ou T).⁸¹

A subfamília Rel é composta por: RelA (também conhecida como p65), RelB, c-Rel e proteínas de *Drosophila*: Dorsal e Dif. Contém domínios transativadores (ativadores de transcrição). Membros da subfamília NF- κ B (p105, p100 e a proteína da *Drosophila*: Relish) são distintas por apresentarem múltiplas repetições de anquirinas que atuam inibindo estas proteínas, não permitindo transcrição (transrepressoras). Porém, tais proteínas podem tornar-se mais curtas e ativas através de proteólise (p105 torna-se p50 e p100 torna-se p52). Quando mais curtas, não ativam transcrição diretamente por não possuírem domínios de transativação, mas podem formar dímeros com membros da subfamília Rel (heterodímeros) e tornarem-se ativadoras da transcrição.⁸¹

Figura 6 – Esquema de subfamílias das subunidades NF-κB: Rel (RelA, RelB, c-Rel, Dorsal e Dif) com domínio de ativação transcripcional e NF-κB (p105, p100 e Relish), com seu respectivo domínio inibitório. Domínio de homologia Rel permite dimerização e ligação ao DNA.

O NF-κB apresenta-se prioritariamente em sua forma inativada, ligada a inibidores presentes no citoplasma, denominados inibidores-κB (IκB), formando um complexo inativo no citoplasma. Existem vias que levam à ativação do NF-κB. A via clássica da ativação do NF-κB (**Figura 7**) envolve a rápida degradação do IκB pelo proteossomo e a liberação das subunidades NF-κB ativadas que se translocam para o núcleo onde ocorre ligação específica com as sequências de DNA nas regiões promotoras de inúmeros genes que resultará em ativação ou repressão da transcrição.⁸¹

NF-κB também atua como um importante fator de sobrevivência para células humanas, prevenindo apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF-α), irradiação e alguns agentes quimioterápicos. Este efeito antiapoptótico é mediado através do aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas dependentes de NF-κB, tais como o fator associado ao receptor TNF-1 (TRAF-1), TRAF-2 e proteína inibidora da apoptose celular 1 (c-IAP1) e c-IAP2.⁸²

Figura 7 – Mecanismo de ativação e ação do NF- κ B. Ativação do heterodímero NF- κ B composto pelas proteínas Rel e p50 pela via clássica, a partir da ligação ao receptor de membrana, tais como o receptor de TNF- α ou receptor *Toll-like*. No citosol o NF- κ B está em seu estado inativo quando está formando um complexo com a proteína inibitória I κ B α . Sinalizadores extracelulares (ex: TNF- α) ativam a enzima I κ B quinase (IKK) que fosforila a proteína I κ B α , resultando em ubiquitinação e dissociação do complexo I κ B α /NF- κ B, e degradação da I κ B α pelo proteossomo. O NF- κ B ativado é translocado ao núcleo, onde se liga aos sítios específicos de DNA. O complexo DNA/NF- κ B recruta outras proteínas como ativadores e a RNA polimerase que transcreve o DNA em mRNA que é traduzido em uma proteína que resulta em mudança da função celular.

1.11 NF-κB e hanseníase

Foi previamente demonstrado que ocorreu repressão da transcrição dependente de NF-κB em células de schwannoma expostas *in vitro* ao *M. leprae* inativado⁸³ e que a exposição *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), obtidas de pacientes MB em tratamento e, de doadores de sangue, saudáveis, cultivadas na presença do *M. leprae* inativado (irradiado) induziu translocação nuclear de NF-κB sobretudo de dímeros p65 (RelA)/p50 e p50/p50 nos dois grupos, sem evidências de presença de proteínas p52 e c-Rel. Tal ativação foi considerada essencial para a produção de TNF-α pelas PBMC de pacientes e controles sadios, cultivadas *in vitro*.⁸⁴ Células mononucleares aderentes de doadores saudáveis cultivadas *in vitro* (PBMC) na presença de *M. leprae* apresentaram menor ativação de NF-κB (p65) que as culturas desenvolvidas com *Mycobacterium bovis*, *bacillus Calmette-Guérin* (BCG), indicando um provável déficit de sinalização por NF-κB em resposta ao *M. leprae*.⁸⁵

Portanto, como o fator de transcrição NF-κB apresenta atividades características como o controle dos processos imunológicos devido à modulação da resposta inflamatória e da proliferação celular e representa um importante fator de sobrevivência para células humanas por prevenir a apoptose, seria interessante investigar seu papel na manifestação clínica espectral da hanseníase, reconhecida como diretamente associada à resposta imunológica. Por outro lado, as investigações sobre esse importante fator modulador da resposta inflamatória na hanseníase, têm sido direcionadas para modelos em culturas de células “*in vitro*” (schwannoma e PBMC) na presença do bacilo, no entanto, sem avaliar se a presença do bacilo na pele ou no nervo poderia atuar como um dos elementos potencializadores da polarização da resposta inflamatória na hanseníase.

Adicionalmente, poderia ser proposto que a multiplicação do *M. leprae* no interior das células fagocitárias, tornando-as células espumosas (célula de Virchow) na hanseníase virchoviana, seria associada à ativação do fator de transcrição NF-κB que tem capacidade de controlar a atividade inflamatória e proteger a célula dos mecanismos de apoptose. Enquanto que no polo tuberculóide a destruição bacilar estaria relacionada ao desenvolvimento de mecanismos opostos de reatividade imunológica.

Diante da abrangência de atividades apresentadas pelo fator de transcrição NF-κB na reação inflamatória e da multiplicação intracelular do bacilo nas formas de maior suscetibilidade ao processo infeccioso na hanseníase, seria de interesse avaliar se há

associação entre a ativação de NF- κ B e os valores da sorologia anti-PGL1, índice baciloscópico e formas clínicas da doença.

Assim, foi avaliado o papel da ativação do NF- κ B em lesões cutâneas do espectro clínico da hanseníase e também das formas indeterminada e neural pura.

2 OBJETIVOS

Considerando a atividade do NF- κ B na resposta inflamatória e a relação entre sua ativação e a presença de TNF- α pretende-se avaliar o papel da ativação do NF- κ B no espectro clínico da hanseníase correlacionando esses resultados com a expressão da citocina TNF- α *in situ*, nas lesões cutâneas dentro do espectro clínico e nas formas indeterminada e neural pura da doença, para avaliar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento dessas lesões.

2.1 Geral

Avaliar a ativação do NF- κ B no espectro clínico-histopatológico e nas formas inicial e neural da hanseníase.

2.2 Específicos

Nas formas clínicas TT, DT, I, NP (PB), DD, DV, VV (MB):

- Verificar se existe diferença na ativação do NF- κ B;
- Avaliar as características da ativação do NF- κ B no infiltrado inflamatório;
- Quantificar as células que ativaram NF- κ B em biópsias cutâneas;
- Avaliar expressão *in situ* de TNF- α ;
- Correlacionar os resultados com os seguintes dados clínicos e laboratoriais: níveis de anticorpos específicos (anti-PGL-1), índice baciloscópico, resultado da pesquisa de bacilos pelo método de Fite-Faraco nas biópsias, forma clínica e classificação operacional.

3 MÉTODOS

Estudo transversal envolvendo avaliação de ativação de NF- κ B, detecção de TNF- α e colágeno tipo 1 em biópsias de pele e nervos de pacientes seguidos no Ambulatório de Hanseníase do Centro de Referência Nacional de Dermatologia Sanitária com Ênfase em Hanseníase do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram incluídos todos os pacientes em seguimento no Ambulatório de Hanseníase submetidos a biópsias no período de 2006-10 que preenchiam os critérios de inclusão e que não apresentavam critérios de exclusão. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa institucional (processo nº 7735/2011) e foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki (revistas em Edimburgo em 2000). Um total de 47 pacientes foram incluídos no estudo.

3.1 Critérios de inclusão

- Diagnóstico clínico de hanseníase.
- Adequada correlação anatomopatológica.

Pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de hanseníase foram incluídos a partir do banco de dados do Ambulatório de Hanseníase, onde os pacientes são rotineiramente classificados clínica e patologicamente de acordo com os critérios de Ridley-Jopling nas formas TT, DT, DD, DV e VV e em formas fora do espectro, tais como HI, NP, hanseníase virchoviana difusa.

3.2 Critérios de exclusão

- Uso recente (14 dias) de medicações em doses que interfissem significativamente na resposta inflamatória aguda.
- Reação hansênica em regressão ou recém-controlada.
- Doses elevadas (maiores que o padrão da poliquimioterapia) de dapsona ou clofazimina;
- Comorbidade que tenha ameaçado a vida nos últimos seis meses (ex.: angina instável, infarto de miocárdio, trauma, neoplasias).
- Pacientes grávidas ou lactando.
- Pacientes com achados clínicos físicos ou laboratoriais que possam ocasionar viés na interpretação dos dados do estudo (ex.: imunossupressão, doenças autoimunes, insuficiência renal crônica dialítica, doenças inflamatórias crônicas como psoríase ou artrite reumatoide, dermatite de contato ou atópica, farmacodermia, linfedema de membros inferiores, uso de anticoagulação oral, história de trombose no membro acometido, pouca higiene, abuso de álcool, drogas ou tabagismo de mais de um maço por dia, desnutrição).

3.3 Revisão de prontuário

Realizou-se coleta de dados epidemiológicos: idade, sexo, ano do diagnóstico de hanseníase, classificação operacional, mês e ano do início e término do tratamento, terapêutica prévia, e dados laboratoriais: Índice baciloscópico, anticorpo Anti-PGL1 IgM, resultado da pesquisa de bacilos álcool-ácidos resistentes na biópsia pelo método de Fite-Faraco na época do diagnóstico. Dados clínicos: uso de medicações, tabaco, álcool, diagnóstico de episódio reacional e presença de comorbidades.

3.4 Biópsias

Foram utilizadas biópsias arquivadas de pele ou de nervos periféricos (nas formas NP) previamente realizadas e fixadas em formalina e embebidas em parafina, realizadas durante o diagnóstico ou os primeiros seis meses de PQT. As biópsias utilizadas foram realizadas por procedimento padrão da Divisão de Dermatologia HCFMRP-USP: por trépano (“punch”) descartável de quatro milímetros ou biópsia incisional em elipse, após infiltração local de solução anestésica contendo cloridrato de lidocaína 2% com bitartarato de epinefrina 1:200.000 UI (Xylestesin® Cristália, SP, Brasil). Os fragmentos obtidos foram inseridos em frascos identificados, contendo solução de formalina a 10% (3,7% de formaldeído) e enviados ao Serviço de Patologia do HCFMRP-USP para fixação em parafina e posterior exame histopatológico dos cortes corados por hematoxilina-eosina e por técnica de Fite-Faraco, que é uma modificação do método de Ziehl-Neelsen, com maior preservação de lipídeos micobacterianos por remover dos passos de hidratação e desidratação o álcool, e utilizando solução aquosa de ácido sulfúrico como descolorante ao invés de solução alcoólica de ácido. Além disto, uma mistura de óleo de parafina em xileno foi usada durante a desparafinização para proteger os cortes, a qual foi removida com papel filtro cuidadosamente até opacidade, antes de ser corada com fucsina fenicada.⁸⁶ Biópsias de nervos periféricos foram realizadas cirurgicamente pelos departamentos de Ortopedia ou Neurologia.

3.5 Histoquímica *Southwestern*

Biópsias de 47 pacientes foram submetidas à histoquímica *Southwestern* para detecção *in situ* da distribuição e atividade de ligação ao DNA pelo NF- κ B. A detecção *in situ* não-radioativa em biópsias fixadas em parafina foi realizada por método previamente descrito,⁸⁷ utilizando marcação por digoxigenina e kits de detecção (Roche Applied Science, Indianapolis, EUA). Foram utilizadas sondas de DNAs sense sintético (Imprint Genetics Corporation, Hialeah, EUA) com sequência ligadora de NF- κ B 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' marcadas com digoxigenina. Os cortes histológicos foram incubados com as sondas marcadas por 12 horas a 37°C. As lâminas foram incubadas com um anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina e detectado usando uma solução de 4-nitro-azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. As lâminas foram montadas com glicerol. Uma forma mutante da sonda marcada com

digoxigenina foi usada como controle negativo **5'-AGTTGAGGCTCCTTTCCCAGGC-3'**. Apenas as células cujos núcleos foram corados de roxo-azulado de forma homogênea foram consideradas positivas. A quantidade de núcleos corados foi estimada em porcentagem em 10 campos de grande aumento (400x) em cada amostra, dos quais valores médios foram calculados. O Índice de ativação do NF-κB, variando de zero a quatro, foi calculado de acordo com a porcentagem final da positividade: “0” quando 0% dos núcleos foi positiva, “1” quando 1-10%, “2” quando 11-25%, “3” quando 26-50%, e “4” quando >50%, como representado na **Figura 8**. Somente as biópsias com índice >1 foram consideradas representativas da ativação do NF-κB (índices de ativação do NF-κB de dois a quatro).

Figura 8 – Hanseníase. Fotomicrografias representativas da detecção de NF- κ B ativado por histoquímica *Southwestern*. (Magnificação original

200x). As setas apontam núcleos corados em roxo-azulado onde ocorreu ativação e translocação nuclear de NF- κ B. **A- Índice de ativação “0”**, não se observou núcleos corados, controle negativo. **B- Índice de ativação “1”**, observou-se menos de 10% dos núcleos corados, em células esparsas, provavelmente linfócitos de lesão da forma tuberculóide. **C- Índice de ativação “2”**, observou-se 11-25% de núcleos corados, em células relativamente próximas, em infiltrado dérmico superficial, provavelmente linfocitário, além de fibroblastos (setas) de lesão da forma dimorfa-tuberculóide. **D- Índice de ativação “3”**, observou-se 26-50% de núcleos corados, em células agrupadas em derme superficial e média, tanto perivascular quanto perineural. Houve marcação de células do endotélio vascular (ponta de seta), fibroblastos, histiócitos e linfócitos de lesão da forma virchoviana. **E- Índice de ativação “4”**, observou-se >50% de núcleos corados, em células agrupadas em derme superficial, média e profunda, difusamente, com marcação mais intensa perivascular e perineural. Observou-se marcação de fibroblastos, células endoteliais, histiócitos e linfócitos de lesão da forma dimorfa.

3.6 Imuno-histoquímica

Estudo imuno-histoquímico foi realizado para a detecção *in situ* de TNF- α em 23 pacientes e colágeno tipo 1 em 22 pacientes diferentes devido a espécime insuficiente nas demais biópsias. Os cortes histológicos montados em lâminas recobertas por poli-L-lisina foram desparafinados pelo calor a 50°C por cinco minutos, seguido por três incubações em xilol por cinco minutos cada, reidratados em graduação de alcoóis e imersos em solução de 10mmol/L de tampão citrato a pH 6,0 e submetidas à recuperação de epítomos induzidas pelo calor utilizando-se estufa por 45 minutos. Após aquecimento, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e após foram lavadas brevemente com solução salina Tris-tamponada e tratados com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por cinco minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Soro normal (Novostain Super ABC kit, Novocastra Laboratories, Newcastle em Tyne, UK) foi utilizado por 30 minutos para bloqueio de reações inespecíficas. Coloração imuno-histoquímica foi realizada usando o método avidina-biotina-peroxidase (Novocastra). Os cortes foram incubados por uma hora a temperatura ambiente (~25° C) em câmara úmida com 0,2 ml de solução 1:200 de anti-TNF- α (H-156: sc-8301, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) ou 0,2 ml da solução 1:100 de *Monoclonal Anti-Collagen, Type I antibody* (C2456, clone COL-1, Sigma, Chemical, St. Louis, MO, USA). Após múltiplas lavagens com salina tamponada com fosfato, anticorpo secundário universal marcado com biotina (Novocastra) foi aplicado por 30 minutos. Os cortes foram incubados com o reagente do complexo avidina-biotina por 30 minutos e salina tamponada com fosfato, pH 7,5; contendo 0,036% de peróxido de hidrogênio por cinco minutos e após foram submetidas à contra-coloração com hematoxilina de Mayer. As laminas foram desidratadas em série de etanol e montada em Permount (Fischer Scientific. Pittsburgh. USA). Como controle negativo, todos os espécimes foram incubados com um anticorpo controle pareados por isótopo em condições idênticas. Coloração foi considerada positiva quando a coloração marrom distinta estava presente de forma homogênea. Nos cortes para cada marcador foram avaliadas, aleatoriamente, em pelo menos 10 campos de grande aumento (40x) por um patologista experiente. Imunorreatividade ao TNF- α e ao Colágeno tipo 1 foi quantificada pelo índice de imunorreatividade (IRI) estimado de acordo com a porcentagem final de pontos positivos por campo de grande aumento, (variando de 0 a 4): “0” quando 0%, “1” quando 1-10%, “2” quando 11-25%, “3” quando 26-50% e “4” quando >50%, conforme representado nas **Figuras 9 e 10** respectivamente.

Figura 9 – Hanseníase. Fotomicrografias representativas da detecção de TNF- α por imuno-histoquímica. (Magnificação original 200x). Detecção quantificada por índice de imunorreatividade (IRI), que variou de 0-3, apresentado nos painéis A-D respectivamente. Setas apontam

detecção de áreas de marcação em marrom. **A- IRI="0"**, ausência de marcação em infiltrado linfo-histiocitário perineural de lesão da forma indeterminada. **B- IRI="1"**, marcação de até 10% de pontos positivos na derme média, em infiltrado linfo-histiocitário ao redor de esboço de infiltrado granulomatoso perineural de lesão da forma dimorfa-virchoviana. **C- IRI="2"**, marcação de 11-25% de pontos positivos circundando denso infiltrado linfo-histiocitário ao redor de granuloma de lesão da forma dimorfa-tuberculóide. **D- IRI="3"**, marcação de 26-50% de pontos positivos em infiltrado histiocitário de lesão da forma virchoviana. Não houve **IRI="4"** na amostra.

Figura 10 – Hanseníase. Fotomicrografias representativas da detecção de colágeno tipo 1 por imuno-histoquímica. (Magnificação original 200x). Detecção quantificada por índice de imunorreatividade (IRI), que variou de 0-3, apresentado nos painéis A-D

respectivamente. Setas apontam detecção de áreas de marcação em marrom. **A- IRI="0"**, ausência de marcação em lesão da forma dimorfa-tuberculóide. **B- IRI="1"**, marcação de até 10% de pontos positivos no infiltrado histiocitário de lesão da forma virchoviana. **C- IRI="2"**, marcação de 11-25% de pontos positivos, em infiltrado linfo-histiocitário de lesão da forma indeterminada. **D- IRI="3"**, marcação de 26-50% de pontos positivos ao redor de granulomas epitelióides de lesão da forma tuberculóide. Não houve **IRI="4"** na amostra.

3.7 ELISA anti-PGL-1 (IgM)

Como rotina no ambulatório de hanseníase, durante o diagnóstico foram colhidos cinco mililitros de sangue periférico em tubos não heparinizados. Após centrifugação a 3500 RPM o soro foi separado e congelado a -20°C. A detecção e quantificação de anticorpos Anti-PGL-1 foi realizada por ELISA para a detecção de anticorpos IgM anti-humanos (cadeia μ). Placas de poliestireno com 96 poços (Costar, Cambridge, USA) foram recobertas com antígeno (PGL-1, glicoproteína ND-O-BSA "*natural disaccharide-octyl-bovine serum albumin*", Colorado State University, USA) em tampão de carbonato de sódio (2 μ g/ml), pH 9,6, e armazenados a 4°C até o uso. O soro de cada paciente foi diluído a 1:100 em tampão Tris-Tween a 15 mM contendo 5% soro de carneiro, 10 μ l foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por uma hora a 37°C em câmara úmida. No final deste período, as amostras eram lavadas com tampão Tris-Tween 15 mM e adicionado o conjugado beta-galactosidase IgM anti-humano (Sigma, USA) diluído a 1:600 em tampão Tris-Tween 15 mM contendo 5% soro de carneiro. As placas foram incubadas por uma hora a 37°C. Um substrato fluorogênico (10 μ l de 4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosídeo) foi adicionado às amostras e o material foi incubado por 30 minutos a 37°C. Cada soro era testado em duplicata e quatro controles negativos eram incluídos em cada placa. A leitura da densidade óptica (DO) dos poços da placa foi realizada com leitor ELISA Multiskan a 450nm. Os títulos de anticorpos eram expressos como Índice ELISA (IE), calculado pela fórmula: $IE = DO_{amostra} / DO_{cut-off}$, no qual o *cut-off* foi determinado pela DO média dos quatro controles negativos somados a três desvios padrões. $IE > 1.0$ foi considerado positivo.

3.8 Baciloscopia

A avaliação da carga bacilar foi realizada na rotina do ambulatório de hanseníase a partir de esfregaços dérmicos e linfáticos obtidos de sete pontos em cada paciente: lóbulos auriculares, cotovelos, joelhos e lesão ativa. Após efetuar pressão na área de coleta para minimizar presença de sangue no esfregaço, lâminas #22 estéreis eram usadas para realizar mínima incisão da qual um lado da derme era raspada. Um esfregaço de cada área colhida era feito sobre lâmina de vidro. Deixava-se secar e, em seguida, o esfregaço era fixado pelo calor de chama de lamparina. Posteriormente, as lâminas eram coradas com a técnica de Ziehl-Neelsen. Abordando os procedimentos de maneira resumida, a lâmina era recoberta com fucsina fenicada, aquecida até a emissão de vapor, lavada rapidamente em água corrente para remover o excesso de corante, tratada com solução álcool-ácido clorídrico, lavada novamente em água corrente e contra-corada pelo azul de metileno durante cinco minutos. Finalmente, a lâmina era lavada para remover o excesso do corante e secada ao ar livre. Depois de realizada a coloração, as lâminas eram examinadas com objetiva de imersão para análise qualitativa e quantitativa dos bacilos. O Índice Bacilar (IB) era calculado de acordo com a escala logarítmica de Ridley baseada no número de bacilos detectados pela coloração de Ziehl-Neelsen usando campos de grande aumento de 100X com lente de imersão, IB varia de zero a seis: “0” quando não há bacilos em 100 campos de imersão; “1” quando há média de 1-10 bacilos/100 campos, “2” quando há média de 1-10 bacilos/10 campos, “3” quando há 1-10 bacilos/campo, “4” quando há 10-100 bacilos/campo, “5” quando há 100-1000 bacilos/campo e “6” quando há > 1000 bacilos/campo. IB > 0 eram considerados “baciloscopias positivas”, IB 1-2 eram considerados “baixo IB”, IB 3-4 eram considerados “IB alto” e IB 5-6 eram considerados “IB muito alto”.

3.9 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi usado para examinar a significância de associação entre variáveis categóricas. O teste de Mann-Whitney foi usado para testar diferença estatística entre variáveis quantitativas independentes. Modelos de regressão logística foram usados para avaliar significância de associação e *odds ratio* foi usado para descrever força de associação. Dois modelos de regressão logística foram utilizados. O primeiro modelo foi empregado para determinar a força de associação entre ativação do NF-κB e a classificação da hanseníase em formas clínicas ajustada pela faixa etária, sexo, presença de bacilos nos cortes histológicos e resultados sorológicos. Um segundo modelo foi empregado para avaliar a força de associação entre a ativação do NF-κB e a classificação OMS, ajustada pelas faixas etárias e sexo. Coeficiente de correlação de Spearman foi usado para avaliar o grau de correlação entre variáveis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada através do programa STATA 12 StataCorp LP. Texas, EUA.

4 RESULTADOS

Dos 47 pacientes selecionados, 25 (53,2%) foram classificados como PB: HI=6, TT=7, DT=9 e NP=3. Vinte e dois (46,8%) foram classificados como MB: VV=9, DV=8 e DD=5. Vinte e sete (57,5%) eram do sexo masculino, 28 (59,6%) eram adultos (18-60 anos). Quatorze pacientes (30%) apresentaram baciloscopia positiva (seis com IB baixo, oito com IB alto), enquanto que 33 pacientes (70%) apresentaram bacilos na biópsia, pela coloração de Fite-Faraco, examinado pelo Serviço de Patologia e 30 pacientes (64%) apresentaram sorologia positiva, com IE (Anti-PGL-1 IgM) médio de 1,3 (0,2 – 13,3).

4.1 Ativação do NF- κ B

A mediana do índice de ativação NF- κ B foi 1 (0-4). Trinta pacientes (64%) não apresentaram NF- κ B ativado, sendo um NP, seis HI, sete TT, seis DT, um DD, quatro DV e cinco VV (20 PB e 10 MB). Dezesete pacientes (36%) apresentaram NF- κ B ativado, sendo dois NP, três DT, quatro DD, quatro DV e quatro VV (5 PB e 12 MB). A distribuição do índice de ativação do NF- κ B pela classificação clínica e OMS está disposta na **Tabela 2**. Controles negativos apresentaram índice de ativação “0” (**Figura 8A**). A ativação do NF- κ B por categorias epidemiológicas e clínicas é demonstrada na **Tabela 3**.

Foi observada associação entre ativação de NF- κ B e classificação clínica da hanseníase (contemplando todas as formas), $p=0,02$.

Tabela 2 – Índices de ativação do NF- κ B por forma clínica e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Variáveis	n	Índices de Ativação do NF-κB n (%)				
		0	1	2	3	4
Classificação Clínica						
Neural Pura	3	0 (0%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Indeterminada	6	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tuberculóide	7	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Dimorfa-Tuberculóide	9	4 (44,4%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)
Dimorfa	5	0 (0%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)
Dimorfa-Virchoviana	8	0 (0%)	4 (50%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)
Virchoviana	9	1 (11,1%)	4 (44,4%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	0 (0%)
Classificação OMS						
Paucibacilar	25	6 (24%)	14 (56%)	4 (16%)	1 (4%)	0 (0%)
Multibacilar	22	1 (4,5%)	9 (40,9%)	6 (27,3%)	5 (22,7%)	1 (4,5%)

4.1.1 Ativação do NF- κ B no infiltrado inflamatório

Quando detectado NF- κ B ativado nos cortes estudados, foi observada intensa marcação nuclear de células do infiltrado inflamatório difuso associado às formas multibacilares e em especial nos infiltrados inflamatórios em feixes vasculonervosos das formas VV e DD (**Figuras 8D e 8E** respectivamente). A técnica de histoquímica *Southwestern* não permitiu identificação celular precisa devido aos passos técnicos para a coloração, contudo, pela localização, morfologia e disposição dos núcleos marcados, pode-se inferir que a marcação ocorreu em histiócitos, linfócitos, fibroblastos, células de Schwann e células endoteliais (**Figuras 8C-8E**). Não foi observada ativação significativa de NF- κ B nas células que compõe o infiltrado granulomatoso da forma TT (**Figura 8B**). Ocorreu frequentemente uma marcação intensa de núcleos de fibroblastos, dispostos de forma alongada tanto na derme superficial, média e profunda (**Figura 8D e 8E**). Devido a tal fato,

prosseguiu-se a investigação para marcação de colágeno tipo 1, que pode ser ativado por fatores de crescimento e citocinas imunomodulatórias, como TGF- β 1.

4.1.2 Ativação do NF- κ B foi maior em pacientes DD e NP.

As formas clínicas que apresentaram maior frequência de NF- κ B ativado foram DD em quatro pacientes (80%, $p=0,051$) e NP em dois pacientes (66,7%, $p=0,54$). Dos cinco pacientes PB que apresentaram NF- κ B ativado, três eram DT e dois apresentavam NP (**Figura 11**). Formas clínicas DD e NP foram fatores de risco independentes para ativação de NF- κ B na biópsia cutânea da lesão da hanseníase, com *odds ratio* de 44 e 30, $p=0,014$ e $0,029$ respectivamente, cujos dados encontram-se na **Tabela 4** e **Figura 11**.

4.1.3 Ativação do NF- κ B foi nula em TT e HI

Nenhum paciente com TT ou HI apresentou NF- κ B ativado. TT apresentou associação com a ausência de ativação do NF- κ B, $p=0,039$ (**Tabela 3** e **Figura 11**).

Figura 11 – Índice de ativação do NF- κ B por forma clínica da hanseníase: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV). DD apresentou maiores índices de ativação e maior porcentagem de NF- κ B ativado. As formas paucibacilares apresentaram baixos índices de ativação: HI, TT e DT; exceto NP.

4.1.4 Ativação do NF-κB esteve associada à classificação MB

A ativação de NF-κB esteve associada à classificação MB (54,6%, $p=0,018$), sendo a ativação muito mais frequente que em PB (20%). Com valores de índice de ativação mais elevados nos MB que PB, $p=0,004$, vide **Tabela 4**.

Ao analisar os valores da ativação do NF-κB verificou-se que ocorreu com maior frequência nos pacientes MB e a percentagem de pacientes MB elevou-se proporcionalmente ao índice de ativação do NF-κB. No entanto, quando se procedeu a análise do conjunto desses resultados se observou que as formas de hanseníase DD, DV e VV, classificadas como MB, comportaram-se como fator de risco para ativação de NF-κB nas lesões biopsiadas, *odds ratio* 4,75, $p=0,025$, como mostram a **Tabela 5** e a **Figura 11**.

Entretanto, ao ser investigada a relação entre essa ativação com marcadores das formas de hanseníase multibacilar não houve associação com: positividade sorológica ao PGL-1 (40%, $p=0,54$), detecção de BAAR pela coloração de Fite-Faraco nos cortes examinados (42,4%, $p=0,204$), valores de baciloscopia positivos (50%, $p=0,877$). Não se observou também, associação entre valores altos de índice baciloscópico IB (50%, $p=0,435$) ou baixos (50%, $p=0,653$). Tanto a forma clínica quanto a classificação operacional apresentam íntima relação com os marcadores de forma multibacilar (**Tabela 6**). A ativação do NF-κB, apresentou-se de forma paralela à estes marcadores, com similaridades de percentagem de ativação com o índice bacilar, coloração de Fite-Faraco e positividade sorológica ao PGL-1 (**Tabela 6**).

Na Figura 11 observa-se que foi encontrada ativação de NF-κB em gradação crescente dentro do espectro de manifestações clínicas da doença, sendo nula e ausente entre as formas HI, TT, porém com marcação discreta nas lesões dos DT (Índice de Ativação: 2). Ao avaliar as formas ricas em bacilos encontrou-se maior intensidade de ativação de NF-κB nas lesões dos DD (Índice de Ativação: 2, 3 e 4) em relação aos resultados de lesões de pacientes DV e VV.

Resultados interessantes foram observados em lesões da forma NP, pois, embora se comporte clinicamente como hanseníase paucibacilar, foi considerável a marcação para NF-κB ativado em lesão de nervo infectado com o bacilo, ao contrario do encontrado nas lesões da forma TT (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Dados epidemiológicos dos 47 pacientes com diagnóstico de hanseníase cujas biópsias foram avaliadas quanto à ativação do NF-κB.

Variáveis		n (%)	Índice NF-κB mediana [variação]	NF-κB ativado n (%)	Exato de Fisher (p)
Faixa etária	<18 anos	4 (8,5%)	1 [0-2]	1 (25%)	1,0
	18-60 anos	28 (59,6%)	1 [0-3]	8 (28,6%)	0,227
	>60 anos	15 (31,9%)	2 [0-4]	8 (53,3%)	0,114
Sexo	Masculino	27 (57,5%)	1 [0-3]	12 (44,4%)	0,226
	Feminino	20 (42,5%)	1 [0-4]	5 (25%)	
Classificação Clínica					0,02
	Neural Pura	3 (6,4%)	2 [1-3]	2 (66,7%)	0,544
	Indeterminada	6 (12,8%)	1 [0-1]	0 (0%)	0,074
	Tuberculóide	7 (14,9%)	1 [0-1]	0 (0%)	0,039
	Dimorfa-Tuberculóide	9 (19,1%)	1 [0-2]	3 (33,3%)	1,0
	Dimorfa	5 (10,6%)	2 [1-4]	4 (80%)	0,051
	Dimorfa-Virchoviana	8 (17,0%)	1,5 [1-3]	4 (50%)	0,435
	Virchoviana	9 (19,1%)	1 [0-3]	4 (44,4%)	0,704
Classificação OMS					
	Multibacilar	22 (46,8%)	2 [0-4]	12 (54,6%)	0,018
	Paucibacilar	25 (53,2%)	1 [0-3]	5 (20%)	
Pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes na Biópsia (Fite-Faraco)					
	Presente	33 (70,2%)	1 [0-4]	14 (42,4%)	0,204
	Ausente	14 (29,8%)	1 [0-3]	3 (21,4%)	
Baciloscopia (Ziehl-Neelsen)					
	Positiva	14 (29,8%)	1,5 [0-3]	7 (50%)	0,320
	Negativa	33 (70,2%)	1 [0-4]	10 (30,3%)	
Sorologia Anti-PGL1 (IgM)					
	Positiva	30 (63,8%)	1 [0-3]	12 (40%)	0,54
	Negativa	17(36,2%)	1 [0-4]	5 (29,4%)	
Total		47 (100,0%)	1 [0-4]	17 (36,2%)	

Tabela 4 – Análise por regressão logística da ativação do NF-κB de acordo com a classificação clínica, ajustado pela faixa etária, sexo, resultado da pesquisa de bacilos na biópsia e resultado da sorologia.

Variáveis	NF-κB ativado n (%)	Odds Ratio	[I.C. 95%]	<i>p</i>
Faixa Etária	<18 anos 1 (25%)	1	-	-
	18-60 anos 8 (28,6%)	0,16	[0,01 – 3,51]	0,247
	>60 anos 8 (53,3%)	0,89	[0,042 – 18,58]	0,938
Sexo	Masculino 12 (44,4%)	2,53	[0,43 – 14,99]	0,306
	Feminino 5 (25%)	1	-	-
Classificação Clínica	Neural Pura 2 (66,7%)	30,44	[1,43 – 646,86]	0,029
	Indeterminada, Tuberculóide e Dimorfa-Tuberculóide 3 (33,3%)	1	-	-
	Dimorfa 4 (80%)	44,77	[2,16 – 929,71]	0,014
	Dimorfa-Virchoviana 4 (50%)	7,17	[0,41 – 123,99]	0,176
	Virchoviana 4 (44,4%)	3,22	[0,22 – 47,39]	0,395
Pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes na Biópsia	Presente 14 (42,4%)	1,20	[0,12 – 12,52]	0,877
	Ausente 3 (21,4%)	1	-	-
Sorologia Anti-PGL1 (IgM)	Positiva 12 (40%)	1,15	[0,14 – 9,79]	0,896
	Negativa 5 (29,4%)	1	-	-

Tabela 5 – Análise por regressão logística da ativação do NF-κB de acordo com a classificação operacional, ajustado pela faixa etária e sexo.

Variáveis	NF-κB Ativado n (%)	Odds Ratio	[I.C. 95%]	<i>p</i>
Faixa Etária				
<18 anos	1 (25%)	1	-	-
18-60 anos	8 (28,6%)	0,52	[0,03 – 8,05]	0,639
>60 anos	8 (53,3%)	1,13	[0,06 – 20,48]	0,934
Sexo				
Masculino	12 (44,4%)	2,49	[0,56 – 11,11]	0,232
Feminino	5 (25%)	1	-	-
Classificação OMS				
Multibacilar	12 (54,6%)	4,75	[1,22 – 18,53]	0,025
Paucibacilar	5 (20%)	1	-	-

Tabela 6 – Comparação da porcentagem de NF-κB ativado e da positividade de indicadores de multibacilares: baciloscopias, pesquisa de bacilos álcool-ácidos pelo método de Fite-Faraco (FF) e sorologia anti-PGL-1 IgM, dentre os 47 pacientes com diagnóstico de hanseníase classificados quanto à forma clínica: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV), e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS): Hanseníase multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) cujas biópsias foram avaliadas quanto à ativação de NF-κB.

Variáveis	n	% baciloscopia (+)	% FF (+)	% anti-PGL1 (+)	% NF-κB ativado
Forma Clínica					
NP	3	0%	33,3%	66,7%	66,7%
HI	6	0%	50%	16,7%	0%
TT	7	0%	42,9%	28,6%	0%
DT	9	0%	44,4%	66,7%	33,3%
DD	5	40%	100%	40%	80%
DV	8	37,5%	100%	100%	50%
VV	9	100%	100%	100%	44,4%
Classificação OMS					
PB	25	0%	44%	44%	20%
MB	22	63,6%	100%	86,4%	54,6%

4.2. Detecção e quantificação *in situ* de TNF- α

4.2.1 TNF- α mais intensamente detectado nas formas MB que nas formas PB

Nas 23 biópsias avaliadas quanto à detecção e quantificação de TNF- α *in situ*, sendo dois NP, três HI, três TT, cinco DT, dois DD, quatro DV e quatro VV (13 PB e 10 MB), os índices de imunorreatividade (IRI) para TNF- α pelas formas clínicas e classificação OMS estão representados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Índice de imunorreatividade (IRI) ao TNF- α avaliado *in situ* nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com diagnóstico de hanseníase classificados pela forma clínica e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Variáveis	n	IRI=0 n (%)	IRI=1 n (%)	IRI=2 n (%)	IRI=3 n (%)
Forma Clínica					
NP	2	1 (50%)	1 (50%)	-	-
HI	3	1 (33,3%)	-	2 (66,6%)	-
TT	3	1 (33,3%)	2 (66,6%)	-	-
DT	5	-	4 (80%)	1 (20%)	-
DD	2	-	1 (50%)	-	1 (50%)
DV	4	-	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
VV	4	-	-	1 (25%)	3 (75%)
Classificação OMS					
PB	13	3 (23%)	7 (54%)	3 (23%)	0 (0%)
MB	10	0 (0%)	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)
Total	23	3 (13%)	10 (43%)	5 (22%)	5 (22%)

Resultados dos IRI=3 em lesões cutâneas de hanseníase apresentaram associação significativa com classificação MB ($p=0,007$) e entre esses pacientes, especialmente nas lesões da forma VV ($p=0,021$). Nenhum paciente apresentou IRI=4. TNF- α apresentou IRI mais elevados em MB que em PB ($p=0,005$). Quanto mais elevado o IRI, mais elevada foi a percentagem de pacientes MB.

Figura 12 – Índice de imunoreatividade (IRI) ao fator de necrose tumoral (TNF- α) detectado e quantificado *in situ* por forma clínica da hanseníase: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV). Observaram-se maiores IRI em formas multibacilares: DD, DV e VV que em paucibacilares: NP, HI, TT e DT ($p=0,005$). IRI=3 esteve associado a formas multibacilares ($p=0,007$).

4.2.2 TNF- α esteve correlacionado à ativação do NF- κ B

IRI para TNF- α apresentou correlação com o índice de ativação NF- κ B, $\rho=0,5514$, $p=0,0064$. (**Figura 13**). Observou-se que quando:

- IRI=0, nenhum apresentou NF- κ B ativado (0%);
- IRI=1, três pacientes apresentaram NF- κ B ativado (30%);
- IRI=2, dois pacientes apresentaram NF- κ B ativado (40%);
- IRI=3, quatro pacientes apresentaram NF- κ B ativado (80%, $p=0,051$).

Figura 13 – Predição quadrática do índice de imunorreatividade ao fator de necrose tumoral (TNF- α) pelo índice de ativação NF- κ B.

Figura 14 – *Box plot* do índice de ativação do NF- κ B e índice de imunorreatividade (IRI) ao TNF- α quantificados a partir de biópsias de pacientes com hanseníase, pelo espectro clínico da hanseníase: hanseníase neural pura (NP), hanseníase indeterminada (HI), hanseníase tuberculóide (TT), hanseníase dimorfa-tuberculóide (DT), hanseníase dimorfa (DD), hanseníase dimorfa-virchoviana (DV) e hanseníase virchoviana (VV).

Observou-se que tanto IRI para TNF- α quanto de índices de ativação de NF- κ B ocorreram de forma mais elevada em MB que em PB (**Figura 15**).

Figura 15 – *Box plot* do índice de ativação do NF- κ B e índice de imunorreatividade (IRI) ao TNF- α quantificados a partir de biópsias de pacientes com hanseníase, pela classificação operacional: paucibacilares (PB) e multibacilares (MB).

4.2.3 TNF- α pouco expresso na forma NP apesar de grande ativação de NF- κ B

Apesar da ativação do NF- κ B em dois dos três pacientes que apresentam forma NP, ocorreu baixa marcação para TNF- α nos dois pacientes testados, com IRI=0 e 1, **Figuras 12 e 14**.

4.3 Detecção e quantificação *in situ* de colágeno tipo 1

Devido a intensa marcação de núcleos de fibroblastos nos cortes com NF- κ B ativo, como pode ser verificado nas **Figuras 8D e 8E**, foi investigada a presença de colágeno tipo 1 nas lesões cutâneas, considerando que fibroblastos são as células responsáveis pela neocolagênese. Foram avaliados 22 cortes histológicos de biópsias de lesões cutâneas de 11 pacientes PB, dentre estes, um era da forma NP, três HI, quatro TT e três DT e 11 de pacientes MB, três DD, quatro DV e quatro VV, das quais os IRI para colágeno tipo 1 estão listados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Índice de imunorreatividade (IRI) ao colágeno tipo 1 avaliado *in situ* em biópsias de lesões cutâneas de pacientes com diagnóstico de hanseníase classificados pela forma clínica e classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Variáveis	n	IRI=0 n (%)	IRI=1 n (%)	IRI=2 n (%)	IRI=3 n (%)
Forma Clínica					
Neural Pura	1	-	1 (100%)	-	-
Indeterminada	3	-	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)
Tuberculóide	4	-	-	-	4 (100%)
Dimorfa-tuberculóide	3	1 (33,3%)	2 (66,6%)	-	-
Dimorfa	3	-	-	1 (25%)	2 (75%)
Dimorfa-Virchoviana	4	-	3 (75%)	-	1 (25%)
Virchoviana	4	-	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
Classificação OMS					
Paucibacilar	11	1 (9,1%)	4 (33,4%)	1 (9,1%)	5 (45,5%)
Multibacilar	11	0 (0%)	4 (33,4%)	3 (27,3%)	4 (33,4%)
Total	22	1 (4,5%)	8 (36,4%)	4 (18,2%)	9 (40,9%)

Figura 16 – Índice de imunoreatividade (IRI) ao colágeno tipo 1 detectado e quantificado *in situ* por forma clínica da hanseníase: Neural pura (NP), indeterminada (HI), tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa (DD), dimorfa-virchoviana (DV) e virchoviana (VV). Observou-se que os quatro pacientes TT apresentaram IRI=3, portanto IRI=3 esteve associado a forma TT ($p=0,017$).

Todas as colorações de cortes de biópsias de pacientes TT apresentaram grande expressão de colágeno tipo 1, com IRI=3 em 100% das quatro amostras analisadas (**Figura 10D**), desta forma, houve associação estatisticamente significante entre TT e IRI=3, $p=0,017$, entretanto as demais formas clínicas (NP, HI, DT, DD, DV e VV) ou operacionais (PB ou MB) não apresentaram associação significativa com IRI para colágeno tipo 1. Faixas etárias (<18 anos, 18-60 anos e >60 anos) não apresentaram associação com IRI para colágeno tipo 1. Não foi possível avaliar associação de TNF- α , pois as amostras foram de blocos diferentes pela escassez de material (foi realizada aleatorização).

Não houve correlação entre índice de ativação de NF- κ B e IRI para colágeno tipo 1 nas biópsias avaliadas. Observou-se que quando:

- IRI=0, nenhum apresentou NF- κ B ativado (0%);
- IRI=1, três pacientes apresentaram NF- κ B ativado (38%);
- IRI=2, um paciente apresentou NF- κ B ativado (25%);
- IRI=3, três pacientes apresentaram NF- κ B ativado (33%).

5 DISCUSSÃO

NF- κ B apresenta atividades reconhecidas no controle dos processos imunológicos devido à modulação da resposta inflamatória e da proliferação celular e, ainda, é importante para a sobrevivência de células humanas por prevenir a apoptose. A investigação “*in situ*” de seu papel na manifestação clínica espectral da hanseníase contribuiu com resultados interessantes sobre os mecanismos fisiopatológicos no desenvolvimento das manifestações cutâneas.

Tem sido descrito e intensamente estudado o espectro de manifestações clínicas da hanseníase, com ênfase na resposta imunológica celular, relacionada à polarização da doença em pólos de alta suscetibilidade ao desenvolvimento da infecção (VV) e de exacerbada resistência à multiplicação do bacilo (TT), mas pouco se conhece sobre fatores que poderiam atuar como moduladores da reação inflamatória, permitindo que diante de um único patógeno o hospedeiro apresente respostas imunológicas contrastantes.

A multiplicação do *M. leprae* no interior das células fagocitárias, tornando-as células espumosas (células de Virchow) na hanseníase virchoviana, pode ser associada à ativação do fator de transcrição NF- κ B que tem capacidade de controlar a atividade inflamatória e proteger a célula dos mecanismos de apoptose. Enquanto que no pólo tuberculóide a destruição bacilar estaria relacionada ao desenvolvimento de mecanismos opostos de reatividade imunológica.

Com base nos resultados apresentados, pode ser verificado que lesões cutâneas de pacientes com hanseníase paucibacilar apresentaram menor ativação do fator NF- κ B, sendo verificado 0% de NF- κ B ativado na forma TT. Esse resultado é muito interessante, pois mostra que lesões cutâneas oriundas de intensa reação inflamatória com destruição efetiva do bacilo, associadas à estabilidade imunológica consolidada por reação granulomatosa crônica, que leva à eliminação dos antígenos micobacterianos, estão dissociadas da ativação do NF- κ B e refletem a resolução do processo infeccioso.

Analisando a marcação para a citocina TNF- α em cortes histológicos de lesão cutânea de pacientes TT observaram-se IRI variando de discretos a ausentes (**Figura 12**), com a menor ativação do fator de transcrição NF- κ B, reforçando a hipótese de que lesões cutâneas não reacionais do pólo (TT) são manifestações da fase tardia da reação inflamatória granulomatosa, ocorrendo menor inflamação aguda local. Foi observado também, que o maior depósito de colágeno tipo 1 ocorreu nessa forma clínica (**Figura 16**), achado que favorece a

hipótese de que a lesão cutânea da hanseníase tuberculóide resulta de reação inflamatória crônica bem organizada, com formação de granuloma e fibrose, como pode ser visualizado ao exame histopatológico e imuno-histoquímico, no qual se encontra um anel de linfócitos CD4⁺ circundando a reação granulomatosa,¹⁴ sugerindo que a regulação da ativação de NF-κB seja, provavelmente, um dos mecanismos envolvidos na polarização da resposta do hospedeiro para a resistência a progressão da infecção na forma TT.

Ainda entre as formas PB, foi encontrado que a HI não apresentou ativação do fator de transcrição NF-κB (0% de NF-κB ativado), correlacionando com o IRI do TNF-α, sugerindo que a lesão cutânea da forma inicial da doença representa a consequência do comprometimento pelo bacilo do nervo periférico e anexos da pele, como glândulas sudoríparas e pelos, sendo, portanto, uma reação inflamatória localizada responsável pelos sintomas de anestesia, hipocromia e anidrose, alterações clínicas específicas da HI. Embora tenham sido encontrados IRI para TNF-α intensos em duas lesões de HI (**Figura 12**), pode ser sugerido que esses valores estejam relacionados à intensidade da reação inflamatória perianexial, mediada pelo TNF-α. Da mesma forma que a TT, a HI apresenta poucas lesões cutâneas e baciloscopias negativas, logo o resultado de não ativação de NF-κB na lesão da HI é compatível com pouca reação imunológica no local. Na hanseníase dimorfa tuberculóide, no entanto, as lesões cutâneas apresentaram moderada ativação do fator de transcrição NF-κB, correspondendo a 33,3% dos cortes histológicos analisados, apesar da forma DT ser inserida entre os pacientes PB. São resultados relevantes se for considerado que a hanseníase dimorfa tuberculóide representa uma forma interpolar, de resposta imunológica instável, cujas manifestações: cutânea e histopatológica adquirem características da hanseníase tuberculóide, permanecendo, contudo, a instabilidade de resposta imunológica da hanseníase dimorfa. Assim, poderia ser explicado o achado de que 33,3% dos cortes analisados apresentaram NF-κB ativado, índice de ativação=2 (**Figura 11**), corroborado também, pelo IRI para TNF-α em lesões de DT, com marcação em nível médio a intenso (**Figura 12**). Portanto as lesões cutâneas dos pacientes DT apresentam variabilidade da manifestação clínica que está diretamente relacionada à intensidade da reação inflamatória e consequentemente à ativação do fator NF-κB, dado que reflete atividade imunológica local na tentativa de controlar a presença de bacilos nessas lesões, confirmando o quadro clínico da hanseníase dimorfa tuberculóide. Apesar da proximidade com a forma TT, as lesões cutâneas da forma DT foram as que apresentaram menores IRI para colágeno tipo 1, seguidas pelas lesões neurais da forma NP (**Figura 16**). Percorrendo o espectro de manifestações clínicas da hanseníase em direção ao pólo de suscetibilidade à infecção observou-se que as formas clínicas com acentuada

instabilidade imunológica e que cursaram com bacilos no interior da lesão, como a DD e a DV, apresentaram o fator de transcrição NF- κ B ativado na maioria dos cortes histológicos. Na forma interpolar DD, foi acentuada (80%) a detecção do fator de transcrição NF- κ B ativado (**Figura 11**) em lesões cutâneas de pacientes DD, única lesão dentro do espectro que apresentou elevado grau de ativação, índice de ativação de NF- κ B=4 (**Figura 11**), e ainda, com IRI para TNF- α variando de leve a intenso (**Figura 12**). Essa associação entre a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a detecção de TNF- α na lesão poderia ser um dos fatores para explicar a acentuada instabilidade imunológica da hanseníase dimorfa, ao considerar que a citocina TNF- α , ao interagir com seus receptores de membrana, sinaliza duas respostas distintas: a ativação de apoptose via Caspase-8 e a inibição da apoptose, e consequente estímulo à sobrevivência e proliferação celular via NF- κ B,⁶⁶ sendo mais provável que esse mecanismo inibitório prevaleça nessa forma da doença. Para reforçar essa hipótese sabe-se ainda, que em mecanismo sinérgico a ativação do NF- κ B também induz a transcrição de genes de IL-1 β e TNF- α ,⁷⁸ com manutenção do processo inflamatório.

O conjunto de alterações detectadas nas lesões DD revelou que ocorreu predomínio de processo imunológico em contínuo desenvolvimento, compatível com a presença de marcação para neocolagênese nas lesões (**Figura 16**), resultados que refletem o grau de atividade imunológico no ambiente intracelular da célula fagocitária (macrófago) nessas lesões.

Lesões cutâneas das formas DV apresentaram índices de ativação de NF- κ B em grau intermediário, 50% (**Figura 11**), tanto em proporção de ativação quanto na intensidade da reação “*in situ*”, a maioria apresentou índice de ativação de NF- κ B=2 (**Figura 11**), achados que se correlacionaram com a detecção de TNF- α nas lesões de pacientes com hanseníase DV, sendo observados IRI em nível discreto em 50%, nível intenso em 25% e muito intenso (25%) (**Figura 12**), apresentando também IRI discreta para colágeno tipo 1 na maioria das lesões avaliadas (**Figura 16**).

Tais resultados podem sugerir que os mecanismos imunológicos envolvidos na hanseníase DV são regulados de forma a controlar, parcialmente, o sinergismo entre ativação de NF- κ B e TNF- α com capacidade de conduzir à instabilidade imunológica da forma dimorfa, tendendo para as características do pólo virchowiano, induzindo o equilíbrio entre mecanismos de resistência e suscetibilidade, porém com moderada reação inflamatória para contenção da multiplicação do bacilo e controle da infecção, resultando em proliferação do processo infeccioso.

Esses resultados são muito interessantes e podem ser associados com os aspectos histopatológicos da lesão DV, que se apresenta centralizada por intenso infiltrado

inflamatório, rico em células mononucleares, coexistindo com infiltração de menor celularidade na periferia da lesão. Adicionalmente, são observadas células de Virchow contendo bacilos em seu interior. A manifestação clínica resultante destes aspectos aproxima a forma DV das características do pólo virchowiano.

As lesões cutâneas da forma polar VV apresentaram, também, ativação intermediária (44,4%) do fator de transcrição de NF- κ B (**Figura 11**) em níveis médios (índice de ativação de NF- κ B=2 e 3), porém associados à detecção de TNF- α , pois na maioria das lesões foi moderada a avaliação do IRI para essa citocina (**Figura 12**). A marcação para colágeno tipo 1 foi variável, de leve a intensa (**Figura 16**), o que pode ser correlacionado com a variada apresentação clínica dos pacientes VV, por vezes com lesões nodulares, endurecidas, hansenomas queloidianos, e por vezes com alterações tróficas e atróficas da pele. Esses resultados podem ser interpretados como o reflexo das alterações cutâneas induzidas pela reação inflamatória, desenvolvida segundo a liberação de citocinas e outros mediadores da inflamação, em lesões bem estabelecidas desse pólo da doença.

Como descrito anteriormente,⁶⁹ predomina na hanseníase virchoviana os mecanismos reguladores da resposta inflamatória modulado, principalmente pelo fator de crescimento TGF- β_1 , bloqueando a ativação de mecanismos bactericidas e facilitando a multiplicação do *M. leprae* no interior do macrófago. Paralelamente, são induzidos os mecanismos reguladores que favorecem o desenvolvimento de tolerância imunológica. TGF- β_1 é um potente mediador da neocolagênese.

A moderada ativação do fator de transcrição NF- κ B poderia estar relacionada à regulação imunológica, predominante na hanseníase virchoviana, associada à intensa multiplicação do bacilo, desenvolvida em ambiente intracelular especial, induzindo a transformação em célula vacuolizada (célula de Virchow) hospedeira das globias da micobactéria. NF- κ B ativado está envolvido na sinalização intracelular da ativação de linfócitos B⁶⁶ e, conseqüentemente, conduz a maior produção do anticorpo anti-PGL1, manifestações características do pólo VV.

NF- κ B ativado, embora em quantidade moderada, induz a produção de TNF- α que possui funções fundamentais de inibição da apoptose e conseqüente estímulo à sobrevivência e proliferação celular via NF- κ B.⁶⁶ Lesões de pacientes VV cursam com produção de TNF- α níveis relevantes, induzidos por ação sinérgica do NF- κ B, que por atividade autócrina mantém a sobrevivência do macrófago rico em parasitas. Adicionalmente, foi verificado que a classificação MB apresentou associação com ativação do NF- κ B ($p=0,018$), sugerindo possível papel de antígenos micobacterianos em processos modulatórios através da ativação

do NF- κ B via TLR, por modulação via citocinas como TGF- β , TNF- α ou produtos intracelulares do parasita. NF- κ B ativado inibe vias de apoptose e também mantém proliferação celular, permitindo sobrevivência de células que hospedam a atividade parasítica intracelular obrigatória destas micobactérias. A ativação do NF- κ B (via TNF- α e TLR) pode representar um dos vários mecanismos ancilares da adaptação do bacilo de Hansen para iniciar e manter sua infecção crônica, induzindo imunidade ineficaz. Resultados que corroboram com observações prévias de ativação de NF- κ B em macrófagos na presença de antígenos do *M. leprae*, levando ao aumento de produção de TNF- α .⁸⁴ Notou-se que a expressão tecidual de TNF- α foi mais elevada nas formas MB, correlacionando-se com níveis de ativação de NF- κ B, sugerindo um estado pró-inflamatório mediado pela ativação de NF- κ B ineficaz para debelar o bacilo e talvez favoreça a fagocitose e a infecção intracelular pelos produtos solúveis sintetizados por macrófagos, de forma similar ao relatado com o *Trypanosoma cruzi*, que apresenta invasão e sobrevivência favorecidos pela ativação do NF- κ B por TNF- α .⁸⁸

A relevância da inclusão de pacientes com a forma NP deve-se ao fato de que a lesão do nervo é realmente a forma inicial da infecção, fato que torna fundamental o estudo do nervo periférico. Considerando os resultados da ativação de NF- κ B em lesões de nervo periférico da forma NP foi observado considerável (66,7%) o índice de ativação de NF- κ B, (**Figura 11**) relacionado à discreta IRI para TNF- α (**Figuras 12 e 14**). São achados interessantes em lesões da forma NP que, embora se comporte clinicamente como hanseníase paucibacilar, apresenta ativação considerável de NF- κ B, provavelmente pela infecção do nervo pelo bacilo, sugerindo atividade da célula fagocitária na tentativa de resistência ao parasita, mas com baixa detecção de TNF- α , como observado na **Figura 14**. Isto pode ser explicado pela biópsia de nervo periférico no caso da NP, que pode apresentar diferente expressão de TNF- α que os filetes nervosos cutâneos, ou outro perfil de citocinas e fatores de crescimento local, tais como o fator de crescimento neural (NGF) ou expressão de outra classe de NF- κ B, de forma independente da presença do TNF- α . Dependendo da classe do NF- κ B que é ativado, pode mediar ativação ou repressão da transcrição.⁸⁹ NP é uma forma peculiar de hanseníase que pode ser interpretada como uma forte resposta imune contra o bacilo ou diagnóstico precoce, a ponto de não apresentar manifestações cutâneas. Em qualquer das circunstâncias, a alta detecção da ativação do NF- κ B pode representar uma mudança na resposta imunológica. A ativação do NF- κ B também regula a fisiologia neural

modulando a plasticidade sináptica e mediando a regulação do crescimento dos dendritos, sugerindo mecanismos reparatórios ou adaptativos.⁹⁰

Como a atividade excessiva do NF- κ B tem sido associada a estados autoimunes, inflamatórios, arterioscleróticos e perda mineral óssea⁹¹ os resultados devem lembrar os dermatologistas de manterem triagem e prevenção da osteoporose em todos os pacientes com hanseníase que por ventura necessitem de corticosteróides sistêmicos, especialmente quando o paciente tratado for MB.

As principais limitações durante este estudo foram que o método histoquímico *Southwestern* não permitiu identificação precisa das células que exibiram NF- κ B ativado. Apesar disto, a morfologia e localização sugeriram que esta detecção ocorreu em macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e, possivelmente, em células de Schwann (**Figura 8B-E**). Os resultados mostraram menor positividade das baciloscopias (30%) que detecção de bacilos na biópsia pela coloração de Fite-Faraco (70%). Esta discrepância técnica é condizente com a literatura e provavelmente ocorre devido a dificuldades envolvendo a coleta da baciloscopia, o que reduz sua sensibilidade⁹¹. Detecção do *M. leprae* por PCR é mais sensível.⁹²

Apesar de muitos cortes histológicos terem demonstrado ativação de NF- κ B em fibroblastos (**Figura 8D e 8E**), esta ativação não esteve correlacionada com a expressão de colágeno tipo 1. A detecção de quantidade significativa de colágeno tipo 1 (IRI=3) esteve associada à forma TT apenas, em que a ativação do NF- κ B foi nula. Fibrose é esperada nas fases crônicas do infiltrado inflamatório granulomatoso. NF- κ B pode estar ativo, porém atuando de forma inibitória, ou ativando transcrição de outros genes e produção de outras proteínas pelos fibroblastos durante a infecção pelo *M. leprae*.

6 CONCLUSÃO

A investigação *in situ* da atividade de ligação ao DNA do NF- κ B contribuiu para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das manifestações clínicas da hanseníase. A ativação do NF- κ B foi exígua em granulomas da forma TT, que representam a resposta inflamatória mais eficaz contra o *M. leprae*. A ativação do NF- κ B associou-se às formas clínicas com suscetibilidade aumentada ao *M. leprae* (MB) e às formas clínicas com instabilidade imunológica, indicando que a ativação do NF- κ B favorece a atividade bacilar provavelmente devido a efeitos anti-apoptóticos nas células infectadas. As células do infiltrado inflamatório que provavelmente exibiram o NF- κ B ativado foram: macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Também foi observada sua ativação em células endoteliais. Contudo, o estudo não encontrou associação entre a ativação do NF- κ B e marcadores de suscetibilidade, tais como: IB, presença de bacilos no histopatológico e positividade da sorologia Anti-PGL-1.

REFERÊNCIAS

1. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005;308(5724):1040–2.
2. Bechelli LM. Tratado de Leprologia. Rio de Janeiro: 1950.
3. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 2004;363(9416):1209–19.
4. World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organ Tech Rep Ser. 1998;874:1–43.
5. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(3):417–26.
6. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255–73.
7. Bechelli LM, Curban GV. Infestações microbianas da pele. In: *Compêndio de dermatologia*. São Paulo: Atheneu; 1988. p. 131–86.
8. Talhari S, Neves R. *Dermatologia tropical: hanseníase*. 3rd ed. Manaus: Tropical; 1997.
9. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):365–75.

10. Foss NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol.* 1999;74(2):113–9.
11. Fleury RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling - uma análise morfológica. *Hansenol Int.* 1989;14(2):101–6.
12. Ridley DS. Skin biopsy in leprosy: Histological interpretation and clinical application (Documenta Geigy). 3rd ed. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy; 1990.
13. Harboe M. Overview of host-parasite relations. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. New York: Churchill Livingstone; 1994. p. 87–112.
14. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):828–32.
15. Rapini RP. Bacterial Diseases. In: Rapini RP, editor. *Practical Dermatopathology*. New York: Elsevier; 2005. p. 155–74.
16. Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop Geogr Med.* 1994;46(2):80–4.
17. Menicucci LA, Miranda A, Antunes SLG, Jardim MR, da Costa Nery JA, Sales AM, et al. Microscopic leprosy skin lesions in primary neuritic leprosy. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(4):648–52.
18. Souza CS. Hanseníase: Formas Clínicas e Diagnóstico Diferencial. *Medicina.* 1997;30:325–34.
19. Kaur C, Thami GP, Mohan H. Lucio phenomenon and Lucio leprosy. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(5):525–7.

-
20. Lucio R, Alvarado I. Opusculo sobre el mal de San Lazaro o elefanciasis de los Griegos. Imprenta de M. Murguía y Compañía; 1852.
 21. Ang P, Tay Y-K, Ng S-K, Seow C-S. Fatal Lucio's phenomenon in 2 patients with previously undiagnosed leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(6):958–61.
 22. Sehgal VN. Lucio's phenomenon/erythema necroticans. *Int J Dermatol*. 2005;44(7):602–5.
 23. Azulay-Abula L, Spinelli L. Revendo a Hanseníase de Lucio e o Fenômeno de Lucio. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2005;33(3):125–33.
 24. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems, 10th revision. 10th ed. Geneva: World Health Organization; 1992.
 25. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6th ed. Brasília, DF.: Ministério da Saúde; 2005.
 26. Brasil. Lei Ordinária Federal no 9.010 de 29 de março de 1995. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília (1995 mar. 30);Sec.1:4509.
 27. Opromolla PA, Martelli ACC. A terminologia relativa à hanseníase. *An Bras Dermatol*. 2005;80(3):293–4.
 28. Pearson JMH. Essentials of leprosy. 11th ed. German Leprosy Relief Association; 1996.

29. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes.(WHO Technical Report Series No. 675). Geneva: World Health Organization; 1982.
30. Visschedijk J, van de Broek J, Eggens H, Lever P, van Beers S, Klatser P. Mycobacterium leprae--millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. Trop Med Int Health. 2000;5(6):388–99.
31. Geluk A, Ottenhoff THM. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. Hum Immunol. 2006;67(6):439–45.
32. World Health Organization. Leprosy Elimination Advisory Group. Guide to eliminate leprosy as a public health problem: WHO standard multidrug therapy (MDT) cures leprosy, stops transmission and prevents disabilities. Geneva: 2000.
33. World Health Organization. Leprosy update, 2011. Wkly Epidemiol Rec. 2011 Sep 2;86(36):389–99.
34. Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. Bull World Health Organ. 2005;83(3):230–5.
35. Ignotti E, de Paula RC. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados de 2001-2010. In: Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. p. 185–202.
36. Global Leprosy Situation. Leprosy prevalence rates 2011. [Internet]. World Health Organization. 2011 [citado 30 nov. 2011]; Disponível em: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf

-
37. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil 2011 [Internet]. Coordenação geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação - CGHDE. [citado 31 jan. 2012]; Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Jan/26/hanseniasse_2011_final.pdf
 38. Novos casos de hanseníase caem 15% em um ano. [Internet]. Blog da Saúde. [citado 27 jan. 2012]; Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/dia-de-luta-contrahanseniasse-agentes-comunitarios-ensinam-adolescentes-a-fazerem-o-autoexame/>
 39. Hansen G. “Undersøgelser Angående Spedalskhedens Årsager” (Investigations concerning the etiology of leprosy)" (in Norwegian). Norsk Mag. Laegervidenskaben. 1874;4:1–88.
 40. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. Nat Genet. 2009;41(12):1282–9.
 41. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature. 2001 22;409(6823):1007–11.
 42. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. Am J Clin Pathol. 2008;130(6):856–64.
 43. Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. J Bacteriol. 2009;191(19):6067–74.

-
44. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes WG, Gomez-Flores M, Ocampo-Candiani J, Busso P, Singh P, et al. Case of Diffuse Lepromatous Leprosy Associated with “*Mycobacterium lepromatosis*”. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4366–8.
 45. Gillis TP, Scollard DM, Lockwood DNJ. What is the evidence that the putative *Mycobacterium lepromatosis* species causes diffuse lepromatous leprosy? Lepr Rev. 2011;82(3):205–9.
 46. Lombardi C. História natural da hanseníase. In: Hanseníase epidemiologia e controle. São Paulo: IMESP-SASEP; 1990. p. 13–20.
 47. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev. 2006;19(2):338–81.
 48. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Cell. 2000;103(3):511–24.
 49. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Curr Opin Microbiol. 2001;4(1):21–7.
 50. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. Science. 2002;296(5569):927–31.
 51. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. Infect Immun. 2003;71(3):1427–33.

-
52. Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;31(1):53–8.
 53. Bochud P-Y, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol*. 2003;170(7):3451–4.
 54. Rotberg A. Some aspects of immunity in leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis, and classification of forms of the disease; based on 1529 lepromin tested cases. *Rev Bras Leprol*. 1937;(Suppl 5):S45–97.
 55. Shepard CC, Saitz EW. Lepromin and tuberculin reactivity in adults not exposed to leprosy. *J Immunol*. 1967;99(4):637–42.
 56. Abbas AK. Major Histocompatibility Complex Molecules and Antigen Presentation to T Lymphocytes. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Cellular And Molecular Immunology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 109–38.
 57. Miranda A, Amadeu TP, Schueler G, Alvarenga FBF, Duppré N, Ferreira H, et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology*. 2007;51(5):649–56.
 58. Foss NT. Aspectos Imunológicos da Hanseníase. *Medicina*. 1997;30:335–9.
 59. Esquenazi DA, Sampaio EP, Moreira AL, Gallo ME, Almeida SM, Sarno EN. Effect of treatment on immune responsiveness in lepromatous leprosy patients. *Lepr Rev*. 1990;61(3):251–7.

-
60. Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Kapil Dev N, Theuvenet WJ. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993;61(1):35–43.
 61. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557–69.
 62. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 1991;254(5029):277–9.
 63. Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton WJ, et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1379–89.
 64. Modlin RL, Bloom BR. Immune regulation: learning from leprosy. *Hosp Pract (Off Ed).* 1993;28(11):71–4, 77–80, 83–4.
 65. Abulafia J, Vignale R a. Leprosy: pathogenesis updated. *Int J Dermatol.* 1999;38(5):321–34.
 66. Abbas AK. Immune Receptors and Signal Transduction. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 140–70.
 67. Diniz LM, Magalhães EFL, Pereira FEL, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Presence of intestinal helminths decreases T helper type 1 responses in tuberculoid leprosy patients

- and may increase the risk for multi-bacillary leprosy. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(1):142–50.
68. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KHG. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J Immunol.* 2009;183(3):1577–86.
69. Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol.* 1996;148(3):911–7.
70. Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin Exp Immunol.* 2000;122(3):330–4.
71. Wolfram D, Tzankov A, Pülzl P, Piza-Katzer H. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg.* 2009;35(2):171–81.
72. Moubasher a D, Kamel N a, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol.* 1998;37(10):733–40.
73. Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Jain S, Suneetha L, et al. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect Immun.* 2005;73(6):3725–33.
74. Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JA, Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol.* 1999;65(3):364–71.

-
75. Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol.* 1995;99(2):196–202.
 76. Foss NT, de Oliveira EB, Silva CL. Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993;61(2):218–26.
 77. Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol.* 1994;153(8):3639–47.
 78. Abbas AK. Innate Immunity. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 56–86.
 79. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(16):5308–19.
 80. Denk A, Goebeler M, Schmid S, Berberich I, Ritz O, Lindemann D, et al. Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(30):28451–8.
 81. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25(51):6680–4.

-
82. Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. 2005;10(5):927–39.
 83. Pereira RMS, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MCV, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(1):20–6.
 84. Hernandez MO, Fulco TO, Pinheiro RO, Pereira RMS, Redner P, Sarno EN, et al. Thalidomide modulates *Mycobacterium leprae*-induced NF- κ B pathway and lower cytokine response. *Eur J Pharmacol*. 2011; 16;670(1):272–9.
 85. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun*. 2010;78(1):293–300.
 86. Wade HW. Demonstration of acid-fast bacilli in tissue sections. *Am J Pathol*. 1952;28(1):157–70.
 87. Hernández-Presa MA, Gómez-Guerrero C, Egidio J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int*. 1999;55(1):209–14.
 88. Pinto AMT, Sales PCM, Camargos ERS, Silva AM. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 2011;13(10):1518–29.
 89. Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A. NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development*. 2005;132(7):1713–26.

-
90. Weenig RH. Pathogenesis of calciphylaxis: Hans Selye to nuclear factor kappa-B. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(3):458–71.
 91. Ponnighaus JM, Lienhardt C, Lucas S, Fine PE, Sterne JA. Comparison of bacillary indexes in slit-skin smears, skin and nerve biopsies; a study from Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1997;65(2):211–6.
 92. Banerjee S, Biswas N, Kanti Das N, Sil A, Ghosh P, Hasanoor Raja AH, et al. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. *Int J Dermatol*. 2011;50(12):1522–7.

ANEXOS

ANEXO A – Ofício da aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.