JORGE JOÃO CHACHA

Agressão nervosa na hanseníase: uma correlação clínica e
laboratorial por meio da integrina $\beta 1$ e proteína S-100.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Dermatologia.

Orientador: Prof Dr Evandro Ararigboia Rivitti

**São Paulo
2006**

JORGE JOÃO CHACHA

**Agressão nervosa na hanseníase: correlação clínica e laboratorial
por meio da integrina $\beta 1$ e proteína S-100.**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Dermatologia.

Orientador: Prof Dr Evandro Ararigboia Rivitti

**São Paulo
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

@ reprodução autorizada pelo autor

Chacha, Jorge João

Agressão nervosa na hanseníase: correlação clínica e laboratorial por meio da integrina $\beta 1$ e proteína S-100/Jorge João Chacha – São Paulo, 2006.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,
Departamento de Dermatologia,

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Evandro Ararigboia Rivitti

Descritores: 1. Antígenos CD29 2. Proteínas S-100 3. Hanseníase 4. Doenças do sistema nervoso periférico 5. Ensaio clínico

USP/FM/SBD-230/06

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

pelo exemplar profissionalismo, apoio, incentivo e confiança às seguintes pessoas:

Prof. Dr. Evandro Ararigboia Rivitti

Profa. Dra. Sílvia Lourenço

Prof. Me. Lothar Peters

Prof. Dra. Miriam Nacagami Sotto

Profa. Dra. Elenir Rose Jardim Pontes

pelo apoio técnico e administrativo:

Biólogo Cleiton Alber, Dr. Danilo Odashiro, Eli Maria Freitas Ferreira, Gabriella Pellizer, Dr. Gustavo Falcão, Farmacêutica-Bioquímica Jaqueline Biava, Leonardo Kamibeppu, Dra. Luciana Odashiro Mijji, Prof. Me. Luis Carlos Takita, Márcia Costa, Fisioterapeuta Marilena Zulim, Raquel Lima, Rosilda Francisca da Silva, Terapeuta Ocupacional Selma Regina Garcia, Sílvia Luiza Duarte.

pelo carinho:

Neuza, Julia, Isabel, João e Antoniele

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Editors*
(Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

INDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. O SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO - ESTRUTURA MORFOLÓGICA E CELULAR	5
2.2. RELAÇÃO DO <i>Mycobacterium leprae</i> COM OS NERVOS - PRESSUPOSTOS DA SUA AGRESSÃO	16
3. OBJETIVOS	25
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1. Imuno-histoquímica	30
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	69
8. BIBLIOGRAFIA	72
8.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8.2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	80
9. ANEXOS	86
MANUAL PARA O CONTROLE DA HANSENÍASE	87
O teste de Mitsuda	95
Técnica de avaliação da sensibilidade com estesiômetro	97
Anexo 4	102
Anexo 5	102
Planilha da casuística	103

FIGURAS

Figura 2.1. – Esquema da estrutura do sistema nervoso periférico	6
Figura 2.2. – Lâmina basal com seus componentes e moléculas de adesão	8
Figura 2.3. – Estrutura da laminina	9
Figura 2.4. – Estrutura da integrina	10
Figura 2.5. – Ligação do <i>Mycobacterium leprae</i> unidade lâmina basal-célula de Schwann.....	23
Figura 2.6. – Ligação do <i>Mycobacterium leprae</i> aos domínios LG da laminina $\alpha 2$	23
Figura 2.7. – Ligação do <i>Mycobacterium leprae</i> pelas proteínas PGL-1 e ML-LBP2 aos domínios LG da laminina $\alpha 2$	24
Figura 5.1. Exemplos de casos clínicos.....	36
Figura 5.2. Infiltrados histopatológicos I (coloração HE).....	38
Figura 5.3. Infiltrados histopatológicos II (coloração HE).....	40
Figura 5.4. Expressão controle em pele normal.....	42
Figura 5.5. Variações de expressão da proteína S-100 nas terminações nervosas das lesões da pele em pacientes com hanseníase.	44
Figura 5.6. Variações de expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas das lesões da pele em pacientes com hanseníase.	46
Figura A-1 Suporte dos monofilamentos.....	97
Figura A-2 – Uso do monofilamento.....	98
Figura A-3 – Pontos que devem ser testados com estesiômetro.....	100

TABELAS

Tabela 2.1. - Integrinas e seus ligantes	10
Tabela 4.1. – Classificação dos infiltrados histopatológicos.....	29
Tabela 4.2: anticorpos, título, fabricante e detalhes do protocolo de imunohistoquímica	32
Tabela 4.3. – Expressões da integrina.....	33
Tabela 4.4.– Expressões da proteína S-100.....	33
Tabela 5.1. - Número e porcentagem de pacientes segundo quantidade de lesões de pele e variáveis de estudo	48
Tabela 5.2 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença ou não de lesões neurais e variáveis de estudo.....	50
Tabela 5.3. - Número e porcentagem de pacientes segundo a integrina e variáveis de estudo	52
Tabela 5.4. - Valores do teste de Correlação linear de Spearman, segundo as variáveis de estudo.....	53
Tabela 5.5. - Valores do teste de Regressão Linear Simples, segundo a integrina e variáveis de estudo.....	54
Tabela 5.6. - Valores do teste de Regressão Linear Múltipla, segundo a integrina e variáveis de estudo.....	55
Tabela 5.7. – Número de pacientes segundo o exame laboratorial integrina, e o exame S-100.....	55
Tabela 5.8. – Número de pacientes segundo o exame laboratorial S-100, a classificação clínica e incapacidades	56
Tabela 5.9. – Relação Integrina β 1 x Incapacidades.	57

Tabela A-1 Graus de incapacidades.(Anexo 4).....	102
Tabela A-2-. Escala do índice baciloscópico.(Anexo 5)	102

RESUMO

Chacha, Jorge João. Agressão nervosa na hanseníase: correlação clínica e laboratorial por meio da integrina $\beta 1$ e proteína S-100

A hanseníase causada pelo *Mycobacterium leprae* é a infecção que mais gera danos ao sistema nervoso periférico. Este microrganismo tem como alvo a célula de Schwann, o qual se liga à laminina, um dos constituintes da lâmina basal. Através desta ligação o *Mycobacterium leprae* penetra nas células de Schwann onde se multiplica, infectando o sistema nervoso periférico e desse modo comprometendo sua estrutura e funções. Provavelmente tal como ocorre em outras neuropatias degenerativas, inflamatórias ou neoplásicas, no processo de agressão nervosa na hanseníase, participam outras moléculas como a integrina $\beta 1$ e a proteína S-100. O presente trabalho estudou 44 doentes de hanseníase, classificados de acordo com Ridley e Jopling, distribuídos em: 12 doentes indeterminados, 7 doentes tuberculóides, 17 doentes dimorfo-tuberculóides, 2 doentes dimorfo-dimorfos, 2 doentes dimorfo virchowianos e 4 doentes virchowianos. Os propósitos foram estudar o dano nervoso nas terminações nervosas da pele por meio da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S100; e ainda a análise da relação entre as manifestações dermatológica, neurológica, reação de Mitsuda, bacterioscopia e os achados imunohistoquímicos. A alteração da expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele foi variável, precoce e constante em 100% dos doentes. A alteração da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele nos doentes foi de 88,6%. Apesar da significativa correlação entre elas, a sensibilidade da integrina $\beta 1$ foi maior. Encontrou-se correlação entre a clínica dermatológica e neurológica, bem como com a bacterioscopia e a reação intradérmica de Mitsuda. Não houve correlação das reações imunohistoquímicas com os dados clínicos, provavelmente em decorrência das alterações moleculares ocorrerem antes das manifestações clínicas.

Descritores: 1. Antígenos CD29 2. Proteínas S-100 3. Hanseníase 4. Doenças do sistema nervoso periférico 5. Ensaios clínicos

SUMMARY

Chacha, Jorge João. Nerve aggression in leprosy: The correlation between clinical and laboratorial diagnoses by the use of $\beta 1$ integrin and S-100 protein.

Leprosy caused by *Mycobacterium Leprae* is the infection that most causes damage to the peripheral nervous system. This microorganism has its principal target in the Schwann cells, which bind themselves to laminin, one of the constituents of the basic lamina. The *Mycobacterium Leprae*, by way of this link, penetrates the Schwann cells, where they multiply, infecting the peripheral nervous system and thus compromising its structure and functions. Probably, as happens in other degenerative neuropathies, inflammatory or neoplastic, other molecules participate in the process of nervous aggression of leprosy, such as $\beta 1$ integrin and S-100 protein. This paper studied 44 patients with leprosy, classified according to Ridley and Jopling, distributed as: 12 indetermined patients, 7 tuberculoid patients, 17 borderline-tuberculoid patients, 2 mid-borderline patients, 2 borderline-lepromatous patients and 4 lepromatous patients. The aims were to study the damage to the skin nerve endings by way of the levels of $\beta 1$ -integrin and S-100 protein; and also the analysis of relation between dermatological, neurological clinical manifestations, the Mitsuda reactions, bacterioscopic and the immunohistochemical findings. The alterations in the amounts of $\beta 1$ integrin in the skin nerve endings were variable, premature and constant in 100 % of the patients. The alteration in the S-100 level in the skin nerve endings in the patients was 88,6 %. In spite of the correlation between them, the sensibility of the $\beta 1$ integrin was greater. There was found to be correlation between dermatological and neurological clinical manifestations as well as with the bacterioscopy and the Mitsuda intradermal reactions. There was no correlation between immunohistochemical reactions with the clinical data, probably because of the molecular alterations that occur before the clinical manifestations.

Key words: 1. CD29 Antigens. 2. S-100 Proteins 3. Leprosy. 4. Diseases of the peripheral nervous system. 5. Clinical research.

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, das mais remotas que se tem informação, e com certeza uma das doenças mais estigmatizantes da história da medicina.

A característica clínica fundamental desta doença é o seu polimorfismo. Varia desde uma mancha anestésica ou hipoestésica até um infiltrado generalizado na pele conferindo a característica *facies leonina* (Sampaio e Rivitti, 2001).

Aspecto relevante é a destruição dos nervos periféricos, provocando a perda da sensibilidade devido as lesões das fibras sensoriais, perda da sudorese devido a danos nas fibras autônomas e perda da força muscular pela agressão às fibras motoras. Como conseqüências da lesão neural, surgem úlceras, ictiose, contraturas, garras, paralisias e cegueira, estabelecendo-se incapacidades definitivas (Talhari, 1997).

Segundo os dados epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), os casos de incapacidade do tipo 2 - considerados definitivos – estão em torno 7% a 9% (ILEP, 2002) da totalidade dos casos.

Considerando que são detectados anualmente no mundo aproximadamente 530.000 doentes novos, e, no Brasil em torno de 50.0000 novos casos (WHO, 2005), evidencia-se ser a hanseníase uma doença epidemiologicamente importante, particularmente no Brasil.

Estima-se hoje a existência de 3.000.000 de doentes com incapacidade tipo 2, no mundo e 55.000 no Brasil, mesmo após o tratamento poliquimioterápico (PQT) completo (Britton, 2004).

Portanto, o comprometimento nervoso na hanseníase é relevante, pois leva, com freqüência, a incapacidades funcionais que sem dúvida comprometem a qualidade de vida desses doentes, além de segregá-los, econômica e socialmente.

Dessa forma, são extremamente pertinentes investigações que permitam um melhor entendimento da agressão nervosa na hanseníase, o que propiciará diagnósticos mais precisos e medidas terapêuticas precoces e mais adequadas, objetivando a prevenção de seqüelas importantes.

É este o foco do presente trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO - ESTRUTURA MORFOLÓGICA E CELULAR

Graças aos avanços imunohistoquímicos, o arcabouço nervoso da pele tornou-se um modelo atraente para o estudo das terminações nervosas, em condições normais e patológicas. A inervação da pele se faz por ramificações de fibras nervosas que permeiam a derme e epiderme (Moura, 2004) e que fazem parte do sistema nervoso periférico. Este sistema é composto pelas fibras nervosas formadas por um ou mais axônios envoltos pelas células de Schwann, e contidos pelo endoneuro mais material amorfo da matriz extracelular, capilares, fibroblastos e mastócitos. Fazem parte do sistema nervoso periférico, o epineuro, constituído por uma camada fibrosa mais externa de tecido conjuntivo denso que reveste o nervo e preenche os espaços entre os feixes de fibras nervosas e o perineuro que envolve os fascículos dos nervos (Figura 2.1) (Junqueira & Carneiro, 2004).

Figura 2.1. – Esquema da estrutura do sistema nervoso periférico
(Junqueira & Carneiro, 2004)

As fibras nervosas podem ser mielínicas e amielínicas, compondo os nervos motores formados por fibras eferentes, os nervos sensitivos por fibras aferentes e os nervos mistos formados pelos dois tipos de fibras. As fibras nervosas não mielínicas por sua vez compõem os nervos autonômicos que fazem parte do sistema simpático e relacionam-se na pele aos vasos sanguíneos, músculos eretores do pêlo, glândulas écrinas e apócrinas. (Junqueira & Carneiro, 2004).

As fibras sensitivas em locais específicos da pele terminam em organelas várias, os corpúsculos de Meissner, de Vater-Pacini, Krause, Merkel-Ranvier e Ruffini, responsáveis respectivamente pelas: sensibilidade tátil das mãos e pés à pressão, de mucosas, das polpas digitais e pela sensibilidade térmica (Sampaio e Rivitti, 2001)

Dentro da bainha perineural encontram-se os axônios e as células de Schwann, cada uma das quais é completamente envolvida pela lâmina basal, característica única que distingue estas células de macrófagos, fibroblastos e células epiteliais.

A lamina basal representa uma organização especial da matriz extracelular composta por moléculas secretadas por múltiplas células, fibroblastos, queratinócitos basais, células mioepiteliais, células endoteliais e células de Schwann (Alberts, 1997).

A lâmina basal através de interações com receptores da membrana celular interfere no metabolismo celular, na organização das proteínas das membranas plasmáticas adjacentes, na migração celular durante a embriogênese e na diferenciação celular (Alberts, 1997).

A lâmina basal tem importante papel na regeneração axonal servindo de guia das fibras nervosas neste processo (Feltri, 2002) e tem ainda funções estruturais e sinalizadoras.

Apesar da composição da lâmina basal ser variável nos diversos tecidos, estruturalmente é formada pelo colágeno IV, a perlecana e as glicoproteínas: entactinas e lamininas (Alberts, 1997).

A laminina é uma molécula grande e flexível formada por três cadeias longas de políptídeos (α , β e γ), em forma de cruz assimétrica, mantidas unidas por pontes de dissulfetos, conhecendo-se até o momento um total de 15 isoformas de lamininas.

As lamininas contêm vários domínios funcionais que se ligam ao colágeno IV, a perlecana e as entactinas. Possuem ainda, domínios que se ligam a receptores especiais localizados na superfície celular, entre eles as integrinas, que também atuam nas interações entre as células e a matriz extracelular, participando da homeostase, da diferenciação celular e da organização tecidual (De Arcangelis, 2000).

Figura 2.2. – Lâmina basal com seus componentes e moléculas de adesão (adaptado de www.hercules.other.fi e modificado por L.Peters).

No sistema nervoso periférico a lâmina basal e as lamininas que participam da sua composição, são importantes, antes do nascimento para o bom desenvolvimento do sistema neural, e, após o nascimento para garantir a integridade e a interação com os componentes da matriz extracelular, além de sinalizarem a síntese da mielina pelas células de Schwann (Bunge 1983).

Em doentes nos quais ocorre ausência de laminina-2, observam-se distrofias musculares e neuropatias periféricas onde estão presentes; a descontinuidade da lamina basal, desmielinização, diminuição da velocidade de condução dos estímulos nervosos e outras anormalidades. Na falta da laminina-2, as células de Schwann se tornam incapazes de comandar o processo dentro do axônio, diminuindo o seu número e a sua proliferação (Feltri e Wrabetz-2005).

Camundongos e humanos, quando apresentam falhas da laminina-2, apresentam desmielinização na porção motora dos nervos periféricos, sugerindo provável papel das lamininas no processo de mielinização (Miner e Yurchenco-2004).

Figura 2.3. – Estrutura da laminina (Feltri, 2005).

As integrinas são receptores transmembrânicos heterodiméricos formados por duas subunidades α (18) e β (8), que combinam-se entre si, resultando em aproximadamente 24 diferentes integrinas descritas até o presente (Previtali, 2001).

Tabela 2.1. - Integrinas e seus ligantes

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	B8
$\alpha 1$	CoLm							
$\alpha 2$	CoLmTn							
$\alpha 3$	CoFnLm							
$\alpha 4$	FnMCTPVC-1						FnMCVC-1	
$\alpha 5$	FnLI							
$\alpha 6$	Lm			Lm				
$\alpha 7$	Lm							
$\alpha 8$	FnTnVn							
$\alpha 9$	TnOpVC-1							Tn
αv	CoFgFnVnvWf		CoFgFnLIOpTnT PVnvWf FgFnTPVnvWf		FgFnVn	FnVn		Fn
$\alpha 11b$								
αL		IC-1 IC-2 IC-3						
αM		C3FglC-1						
αX		C3Fg						
	Co	Colágeno	Lm		laminina			
	C3	fator Ce do complemento	MC		MAdCAM-1			
	Fg	Fibrinogênio	Op		osteopontina			
	Fn	Fibronectina	Tn		tenascina			
	IC-1	ICAM-1	TP		trombospondina			
	IC-2	ICAM-2	VC-1		VCAM-1			
	IC-3	ICAM-3	Vn		vitronectina			
	L1	L1 molécula de adesão	vWf		fator de von Willebrandt

Figura 2.4. – Estrutura da integrina (Fonte:

www.personalpages.umist.ac.uk)

As integrinas possuem funções gerais e específicas, atuando na manutenção das relações físicas entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, colaborando para a conservação da arquitetura celular e do equilíbrio do meio interno, através de suas múltiplas funções sinalizadoras (Hynes, 1992 e 2004).

As integrinas agrupam-se em sítios denominados “áreas de adesão focal”, onde sua porção intracitoplasmática mantém contato com o citoesqueleto. Desta forma, essas moléculas proporcionam um canal de comunicação entre o meio intracelular e extracelular, ativando vias de sinalização que irão influenciar o comportamento celular (Giancotti, 1999).

No meio extracelular, as integrinas servem primariamente como receptores de colágeno, laminina e fibronectina. Cada integrina reconhece mais de um ligante e, por sua vez, cada ligante pode se unir a diferentes tipos de integrinas. Cada interação é específica e ligantes diferentes irão ativar vias distintas de sinalização para o meio intracelular (Heino, 2000).

No meio intracelular, o domínio citoplasmático das integrinas interage com as proteínas do citoesqueleto (Hemler, 1998), que podem, por sua vez, modificar a afinidade das integrinas pelos receptores extracelulares (Darribère, 2000).

Das integrinas, 12 pertencem ao grupo $\beta 1$, cada uma com diferentes propriedades de ligação aos componentes da matriz extracelular. (Previtali, 2001; Brakebusch, 2005; Feltri, 2005).

No nervo a subunidade $\beta 1$ das integrinas pode formar dímeros com várias subunidades α , formando receptores para muitos componentes da

matriz extracelular, inclusive para a laminina presente na lâmina basal do sistema nervoso periférico. (Previtali, 2001).

Várias integrinas interagem com as lamininas no sistema nervoso periférico (SNP). As lamininas 2 e 4, ligam-se com integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 7\beta 1$ e dextróglicam (DG); as lamininas 10 e 11 ligam-se com as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ e DG e as lamininas 8 e 9 ligam-se com a integrina $\alpha 6\beta 1$ e DG (Feltri, 2005).

Assim como a participação da laminina-2 em doenças do sistema nervoso já está bem descrita na literatura, existem evidências de participação das integrinas na fisiopatologia de doenças do sistema nervoso periférico (Feltri, 2005).

À semelhança da laminina, alterações da expressão das integrinas na célula de Schwann são de tal importância que permitem caracterizar a evolução e a gravidade de neuropatias em humanos e ratos (Previtali-1998).

Estudos analisando a expressão de integrinas na neurite auto-imune experimental em ratos e na Síndrome de Guillain - Barré em humanos evidenciam perda da expressão de várias integrinas, ocorrendo paralelamente às alterações histopatológicas, sugerindo que a análise da expressão das integrinas em biopsias de fibras nervosas, podem ser úteis para melhor estudar e caracterizar o processo inflamatório neural nestas condições. (Previtali-1998).

Esses estudos admitem que a perda da expressão da integrina seja devida à ruptura da lâmina basal influenciada por fenômenos inflamatórios com mecanismos ainda a serem esclarecidos.

Portanto, no sistema nervoso periférico, onde a lâmina basal e as células de Schwann são estruturas fundamentais, a laminina e os seus receptores, como a integrina $\beta 1$, exercem importante papel na manutenção da integridade deste sistema (Feltri, 2002).

Dentre outras moléculas expressas no sistema nervoso periférico, destaca-se a proteína S-100, que compreende 21 diferentes isoformas, presentes em células gliais, células de Schwann, melanócitos, células de Langherans, dendrócitos dérmicos, histiócitos, adipócitos, células mioepiteliais e algumas células epiteliais de glândulas. É um dímero altamente ácido, hidrossolúvel, com 21kDa, com forte afinidade pelo cálcio (Kligman, 1988). Pertence a família das proteínas moduladoras expressadas exclusivamente em vertebrados, e participa de atividades reguladoras intra e extracelulares. Tem atividades neurotróficas, inibe a fosforilação e regula a estabilidade do citoesqueleto (Donato-2003). Interage com proteínas efetoras no interior das células por meio de atividades enzimáticas e interage com a dinâmica do citoesqueleto, com o crescimento e diferenciação celular e com a homeostase do cálcio. Quanto as suas funções extras celulares, exerce influências sobre as células inflamatórias, neurônios, astrócitos, células gliais e células endoteliais e epiteliais. (Marenholz- 2004). Informações estruturais indicam que as proteínas S-100, em sua maioria, apresentam-se na forma heterodimérica, com características multifuncionais e encontram-se envolvidas em várias atividades celulares, sendo porem consenso que a sua principal ação é agir internamente como um sensor de cálcio atuando na regulação na síntese de proteínas efetoras. (Donato, 2003).

Várias doenças como cardiopatias, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e neoplásicas estão associadas a alterações dos níveis séricos da proteína S-100 (Marenholz, 2004), fenômeno este que ocorre inclusive na hanseníase, onde se registra aumento dos seus níveis sanguíneos, relacionando-se este fato ao provável dano nervoso, próprio desta doença. (Narayan, 1997).

A primeira visualização da proteína S-100 em corpúsculos sensoriais foi demonstrada por Iwanaga em 1982. Posteriormente foi demonstrado que as isoformas S-100 α e S-100 β são as principais presentes no tecido nervoso (Haimoto, 1987).

Demonstrou-se em humanos que, quando o nervo é comprimido ou seccionado, a expressão da S-100 nos corpúsculos de Meissner e Paccini é alterada, nestes casos a imunorreatividade apresenta-se irregularmente distribuída, persistindo em alguns corpúsculos, somente níveis residuais de expressão. (De Leon- 1991, Del Valle-1993, Gonzalez-Martinez- 2003)

O estudo da expressão da proteína S-100 tem sido utilizado em trabalhos envolvendo a hanseníase, principalmente com objetivo de melhor diagnosticar a doença, particularmente nas formas indeterminadas e tuberculóides com pesquisa de bacilos negativa.

Fleury em 1987 detectou alteração da expressão da proteína S-100 em 8 casos (88,8%) de 9 casos com granuloma histopatológico sem bacilo, diagnosticados como hanseníase tuberculoide.

Thomas em 1998 empregou o método da expressão da proteína S-100 também em doenças granulomatosas, concluindo pela sua utilidade, na exclusão da hanseníase, exatamente quando as terminações nervosas apresentaram-se íntegras.

Existem, portanto pesquisas aplicando o método da proteína S-100 no diagnóstico da hanseníase, porem não há estudos comparativos na literatura entre este método e, o estudo da expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele.

2.2 RELAÇÃO DO *Mycobacterium leprae* COM OS NERVOS - PRESSUPOSTOS DA SUA AGRESSÃO

A afinidade do *Mycobacterium leprae* pelos nervos periféricos é conhecida desde os primeiros estudos da *Histopatologia da Lepra*, iniciados com Danielssen e Boeck (1848). Na hanseníase, após a invasão neural, as bactérias determinam um processo degenerativo progressivo e freqüentemente irreversível dos nervos periféricos.

Vários experimentos “*in vitro*” com culturas de tecido nervoso (Mukherjee, 1986) e “*in vivo*” em modelos animais (Scollard, 1999) confirmaram o tropismo do *Mycobacterium leprae* pelos nervos periféricos.

Ao longo do tempo, acumularam-se evidências apontando a célula de Schwann nos nervos periféricos como a célula alvo para o *Mycobacterium leprae* (Lumsden, 1959, Job, 1989).

A afinidade do *Mycobacterium leprae* pelas células de Schwann é extremamente útil ao bacilo, pois permite que fuja das respostas imunes do hospedeiro e, pela falta de estruturas destruidoras de bactérias nessa célula, o bacilo pode se replicar continuamente.

As células de Schwann do sistema nervoso periférico apresentam 2 fenótipos, mielinizadas e não-mielinizadas, que apresentam resposta diferente ao *Mycobacterium leprae* (Leivo, 1988).

Embora o *Mycobacterium leprae* ligue-se a ambos fenótipos da célula de Schwann, são as células não-mielinizadas que são mais susceptíveis à invasão pelo *Mycobacterium leprae*, sendo estas células não somente o hospedeiro natural para multiplicação da bactéria como também permitem que o microorganismo se proteja das respostas imunes do hospedeiro. A presença do *Mycobacterium leprae* pode, ainda, nas células desmielinizadas, contribuir para a proliferação das células de Schwann criando mais substrato para a invasão bacilar. Portanto, através da desmielinização e dano axonal das células de Schwann mielinizadas e através do favorecimento da proliferação das células de Schwann não-mielinizadas, o *Mycobacterium leprae* cria um nicho extremamente favorável para a sua multiplicação e sobrevivência no sistema nervoso periférico (Rambukanna, 2001).

Na hanseníase, a neuropatia é desmielinizante e axonal e ambos os fenômenos parecem ocorrer já no início da infecção. Existem estudos que mostram que a ligação do *Mycobacterium leprae* às células de Schwann induz à desmielinização sem apoptose (Edwards, 1998).

Indaga-se quanto aos mecanismos moleculares que participam da relação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann desde as suas ligações até as alterações fisiológicas e metabólicas sofridas por estas células. Quanto à ligação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann

permitindo a entrada da bactéria na célula, existem evidências de que esta ligação ocorre na lâmina basal que circunda a célula de Schwann (Ng, 2000).

Portanto, no caso da hanseníase, a lâmina basal não representa barreira protetora à entrada da micobactéria, pelo contrário, é através de seus componentes estruturais que ocorre a invasão da célula de Schwann. Existem estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” (Rambukkana, 1997) que demonstram que a ligação da *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann se faz através da laminina-2, que é um componente importante da lâmina basal que envolve esta célula.

A integridade da laminina-2 presente na lâmina basal das células de Schwann é importante na mielinização como demonstra a presença de mutações do gene codificador da laminina-2 em camundongos e humanos portadores de distrofia muscular congênita, nos quais ocorrem defeitos na mielinização das células de Schwann (Rambukkana, 1997).

Na ligação do *Mycobacterium leprae* à laminina-2, atua a cadeia α_2 pois, em camundongos distróficos *dy/dy*, nos quais não existe a cadeia α_2 da laminina-2, apenas havendo cadeias β_1 e γ_1 , o *Mycobacterium leprae* não consegue aderir aos nervos periféricos (Rambukkana, 1997).

As cadeias α das lamininas possuem, na porção carboxiterminal, moléculas identificadas como módulos de laminina tipo LG de 1 a 5, que estão envolvidas nas ligações moleculares da laminina. A análise da ligação do *Mycobacterium leprae* com fragmentos recombinantes da cadeia α_2 da laminina-2 demonstra que o bacilo reage fortemente com todos os módulos G,

mas não reage com os módulos G análogos da cadeia α_1 . Graças a estas observações, propõe-se que o tropismo neural do *Mycobacterium leprae* se deve à ligação da bactéria com os módulos LG da cadeia α_2 da laminina-2 (Leivo, 1988; Engvall, 1990; Patton, 1997).

Trabalhos posteriores verificaram qual molécula nos módulos LG da cadeia α_2 da laminina-2 da lâmina basal das células de Schwann é responsável pela ligação com o *Mycobacterium leprae*, tendo-se demonstrado tratar-se do receptor da laminina-2, α -dextróglicana, um componente do complexo glicoprotéico que está envolvido na patogênese das distrofias musculares (Ervasti, 1993; Campbell, 1995; Henry, 1999).

Este complexo é composto de duas subunidades: α dextróglicana e β dextróglicana. A α -dextróglicana interage com os módulos LG da cadeia α_2 da laminina-2, sendo a molécula envolvida na ligação da membrana basal da célula de Schwann com o *Mycobacterium leprae*. A subunidade β -dextróglicana relaciona-se a proteínas do citoesqueleto de músculos e nervos periféricos (Saito, 1999).

Portanto, existem evidências de que a ligação do *Mycobacterium leprae* à célula de Schwann se faz através da ligação de moléculas da parede da bactéria com α -dextróglicana dos módulos LG da cadeia α_2 da laminina-2 da lâmina basal que circunda a célula de Schwann. Além dessa molécula α -dextróglicana, é possível que existam outras moléculas na laminina capazes de atuar como receptores para o *Mycobacterium leprae* (Rambukkana, 2001).

Para que ocorra a ligação do *Mycobacterium leprae* com as moléculas da lâmina basal da célula de Schwann, são necessárias moléculas ligantes da parede da bactéria capazes de se unirem aos receptores.

A parede do *Mycobacterium leprae* distingue-se do *Mycobacterium tuberculosis* pela presença de um complexo de lipídios e carboidratos que a compõem, que provavelmente representam os elementos responsáveis pela capacidade do *Mycobacterium leprae* de atingir o sistema nervoso periférico.

A parede celular do *Mycobacterium leprae* contém uma camada externa eletrão-transparente composta, predominantemente, por ácido fitioceroldimerocerósico e glicolípides relacionados, que compreendem, fundamentalmente, o glicolipídico fenólico 1 (PGL-1), específico da micobactéria. Existem estudos que demonstram a participação do PGL-1 na afinidade pelo sistema nervoso periférico por conter um trissacarídeo específico não encontrado na parede de nenhuma outra micobactéria (Ng, 2000; Rambukkana, 2001).

O PGL-1 purificado liga-se especificamente à cadeia α_2 da laminina-2 da lâmina basal da célula de Schwann em culturas de tecidos e esta ligação é mediada pelo trissacarídeo específico (Hunter, 1981 e 1982).

Aparentemente, o PGL-1 interage com os módulos LG da cadeia α_2 da laminina-2. Esta ligação parece ser específica, pois a ligação do PGL-1 com módulos homólogos da cadeia α_1 é muito mais fraca. A ligação do PGL-1 é mais intensa com os módulos α_2 LG1, α_2 LG4 e α_2 LG5.

Além da molécula PGL-1, outra proteína associada à parede da micobactéria, de 21 kDa, *Mycobacterium leprae* “laminin binding protein” (ML-LBP₂₁) também é capaz de ligar-se à laminina-2, mas esta proteína, diferentemente do PGL-1, é semelhante a outras proteínas encontradas em micobactérias as quais são incapazes de invadir células de Schwann, não parecendo, portanto, ter a mesma importância do PGL-1.

Além disso, as afinidades dos módulos LG da cadeia α_2 da laminina-2 são diferentes. O PGL-1 liga-se à α_2 LG1, α_2 LG4 e α_2 LG5, enquanto o ML-LBP₂₁ liga-se à α_2 LG5, mas sua ligação à α_2 LG1 é muito fraca e não se liga à α_2 LG4, isto é, o PGL-1 interage de modo mais completo com a laminina-2 e parece, portanto, ser um ligante muito mais eficiente do *Mycobacterium leprae* a laminina-2 da lâmina basal da célula de Schwann. (Shimogi, 1999).

Também existem evidências da participação da dextróglicana na mielinização das células de Schwann, pois, camundongos com ausência desta molécula apresentam anormalidades da mielinização e defeitos na condução nervosa. Como esta molécula é importante na adesão do *Mycobacterium leprae* à célula de Schwann, é possível que participe na ação desmielinizante e na depressão axonal da hanseníase.

Portanto, existem avanços sensíveis na interpretação molecular da afinidade do *Mycobacterium leprae* pela célula de Schwann e pelo tecido nervoso. O estudo das interações moleculares do *Mycobacterium leprae*, dextróglicanas, módulos LG da laminina e cadeia α_2 da laminina-2, laminina-2 e matriz extracelular é essencial para o entendimento do acometimento dos nervos na hanseníase.

Alguns autores (Campbell, 1995) demonstram, ainda, o importante papel da integrina β_1 na diferenciação das células de Schwann mielinizadas. Quando o gene codificador desta molécula é eliminado, a mielinização é retardada e, eventualmente, ocorre neuropatia progressiva.

A integrina β_1 é um importante receptor da laminina e a sua ausência causa, em paralelo, as mesmas conseqüências de deficiências da laminina-2. Assim, no sistema nervoso periférico, torna as células de Schwann incapazes de manter contato com a lâmina basal, com conseqüentes danos morfofuncionais ao nervo (Feltri, 2002).

Considerando o grande tropismo do *Mycobacterium leprae* pelas células de Schwann, devido à sua afinidade pela laminina-2, através dos componentes moleculares da cadeia α_2 , pode-se admitir que outros receptores da laminina, como as integrinas, moléculas que se evidenciam, cada vez mais, como importantes participantes de mecanismos fisiológicos e patológicos, possam participar desse processo.

Saliente-se que não existe até o momento, trabalhos que pesquisaram as alterações da expressão da integrina β_1 nas terminações nervosas da pele na hanseníase e este é o principal objetivo do presente trabalho.

Figura 2.5. – Ligação do *Mycobacterium leprae* unidade lâmina basal-célula de Schwann.

Figura 2.6. – Ligação do *Mycobacterium leprae* aos domínios LG da laminina $\alpha 2$. (Rambukkana, 2001)

Figura 2.7. – Ligação do *Mycobacterium leprae* pelas proteínas PGL-1 e ML-LBP2 aos domínios LG da laminina $\alpha 2$. (Rambukkana, 2001)

LG-	domínio da laminina
PGL-1	glicolipideo fenólico
LAM	Lipoarabinomanam
ML-LBP2	<i>Mycobacterium leprae</i> -laminin binding protein
MCA e MA	Adesinas do <i>Mycobacterium leprae</i>
AG	Arabinogalctan
PG	Petidoglicana
MP	Matriz plasmática
PM	Membrana plasmática

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- estudar histologicamente a agressão nervosa nas diversas formas clínicas da hanseníase por meio da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S100, nas terminações nervosas das lesões da pele.
- comparar as alterações da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100 nas terminações nervosas das lesões de pele na hanseníase.
- Correlacionar os dados demográficos, dermatológicos, neurológicos, bacteriológicos e da reação de Mitsuda, entre si e com os achados histológicos da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100 nos nervos da pele.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

A casuística estudada compreende 44 doentes que foram previamente submetidos à rotina para confirmação diagnóstica da doença incluindo biopsia de lesões de pele.

Foram analisados:

- dados clínicos gerais.

- número de lesões cutâneas dos doentes - foram quantificadas, desde uma lesão no mínimo, até o máximo de lesões contáveis. Nos casos onde as lesões foram incontáveis padronizou-se, para fins estatísticos, o número de 50 lesões.

- número de troncos nervosos lesados - diagnosticados clinicamente e pelo método da estesiometria, de acordo com as normas estabelecidas pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil 2001) - Anexo 3

- presença de incapacidades funcionais devidamente identificadas e classificadas com base nos critérios do MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil 2001) –Anexo 4

- forma clínica classificada - de acordo com Ridley e Joplin – Anexo 1.
- baciloscopia quantificada de acordo com os índices estabelecidos pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil 2001) -Anexo 5.
- resposta imune frente ao antígeno de Mitsuda, (fornecido pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná), com o padrão de leitura de 21/30 dias – Anexo 2.
- Os doentes incluídos no estudo foram biopsiados com “punch” de diâmetro de 5mm com finalidade de se confirmar o diagnóstico. O material biopsiado foi processado histologicamente e corado pela hematoxilina e eosina (H/E) e pela técnica histoquímica de Faraco para evidênciação da micobactéria. O material foi então analisado em microscopia de luz por 3 patologistas e classificado de acordo com as seguintes variáveis:

Tabela 4.1. – Classificação dos infiltrados histopatológicos.

I	Infiltrado inflamatório inespecífico
G	Infiltrado predominantemente granulomatoso bem formado com presença de células epitelióides
M	Infiltrado predominantemente macrofágico
C	Infiltrado composto, com presença de células macorfágicas e granulomas.

4.1. Imuno-histoquímica

As proteínas integrina $\beta 1$ e S-100 foram pesquisadas em blocos de parafina do material biopsiado a fim de se analisar sua expressão nas terminações nervosas nas lesões de pele da hanseníase, pelo método da imunohistoquímica que é descrito a seguir:

Fragmentos de 3 μm foram cortados para a realização da técnica imunohistoquímica. Os cortes de 3 μm foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os cortes foram re-hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 85%, respectivamente) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos.

Após a lavagem em água corrente e água destilada, foi realizada incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% com o intuito de se bloquear a peroxidase endógena tecidual.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, os cortes foram imersos duas vezes em solução de TRIS pH 7,4 por dois minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de 1% BSA (Sigma), 5% SFB (Cultilab) em TRIS, pH 7,4 por 60 minutos, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais.

Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário. Detalhes do protocolo como recuperação antigênica, soro primário, clones, fabricantes e título de utilização estão descritos na Tabela 4.2.

Os procedimentos subsequentes foram sempre precedidos de duas lavagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS pH 7,4, durante 5 minutos cada e revelados com kits de revelação descritos na Tabela 05. Os protocolos utilizados para a revelação seguiram as instruções do fabricante.

Após todo o processo de revelação, os cortes foram finalmente lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 10 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em três banhos de xilol, e montados em resina permount para o exame ao microscópio de luz.

Controles negativos das reações supracitadas foram realizados através da incubação de espécimes com solução tampão substituindo o anticorpo primário. Adicionalmente, controles internos positivos consistindo de pele normal foram utilizados para cada reação e suas marcações consideradas como o padrão - intensidade forte-(+++)- para a comparação com o tecido lesado.

Tabela 4.2: anticorpos, título, fabricante e detalhes do protocolo de imunohistoquímica

Soro	Clone	Fabricante	Recuperação	Título	Kit de	cromógeno
primário			antigênica		revelação	
Integrina β1	6S6	Chemicon	Tripsina 0,5% em PBS	1:100	En Vision Peroxidase (DAKO)	Diaminobenzidina
S-100	15E2E2	BIOGENEX	_____	1:400	En Vision Fosfatase Alcalina (DAKO)	New Fucsina BIOGENEX

Os resultados foram padronizados conforme descrito abaixo:

Tabela 4.3. – Expressões da integrina.

Expressão da integrina $\beta 1$ nas
terminações nervosa da pele

+++	Expressão forte
++	Expressão moderada
+	Expressão fraca
0	Ausência de expressão

Tabela 4.4.– Expressões da proteína S-100.

Expressão da proteína S-100 nas
terminações nervosas da pele

+++	Expressão forte
++	Expressão moderada
+	Expressão fraca
0	Ausência de expressão

- avaliações estatísticas foram realizadas pelos métodos do teste quiquadrado, teste quiquadrado corrigido (Yates), teste de Fisher e correlação linear de Spearman, regressão linear simples e múltipla, método estatístico Kappa, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Dos 44 doentes examinados clinicamente e classificados de acordo com Ridley-Joplin constatou-se: 12 doentes indeterminados, 7 doentes tuberculóides, 17 doentes dimorfo-tuberculóides, 2 doentes dimorfo-dimorfos, 2 doentes dimorfo virchowianos e 4 doentes virchowianos – Os dados completos dos doentes estão no Anexo 6.

Exemplos dos casos clínicos incluídos no trabalho estão ilustrados na Figura 5.1.

A análise histopatológica das biopsias desses doentes revelou: infiltrado inespecífico em 12 casos, em 7 casos infiltrado granulomatoso, em 4 casos infiltrado macrofágico e em 21 casos infiltrado composto. Exemplos desses achados estão ilustrados na Figura 5.2. e 5.3.

A análise imuno-histoquímica da expressão das proteínas integrina β 1 e S-100 revelou níveis diversos dessas proteínas, expressão forte - idêntica ao grupo controle, denotando normalidade e, expressões diminuída, moderada, fraca e ausência de expressão, indicando intensidade variável da agressão às terminações nervosas. Esses resultados foram analisados de forma semi-quantitativa e estão representados na tabelas 4.3 e 4.4 e ilustrados nas Figuras 5.4., 5.5. e 5.6..

Na data da primeira consulta nenhum doente apresentava qualquer tipo de reação.

No início do presente trabalho os doentes não haviam sido tratados.

Figura 5.1. Exemplos de casos clínicos.

- A) Hanseníase indeterminada,
- B) Hanseníase indeterminada.
- C) Hanseníase tuberculóide.
- D) Nervo espessado.
- E) Hanseníase dimorfa-dimorfa.
- F) Hanseníase virchowiana.

FIGURA 5.1

Figura 5.2. Infiltrados histopatológicos I (coloração HE).

- A) Infiltrado inflamatório inespecífico
- B) Infiltrado inflamatório inespecífico.
- C) Infiltrado granulomatoso.
- D) Infiltrado granulomatoso.

FIGURA 5.2

Figura 5.3. Infiltrados histopatológicos II (coloração HE).

- A) Infiltrado composto de células macrofágicas e granulomas.
- B) Infiltrado composto de células macrofágicas e granulomas.
- C) Infiltrado composto de células macrofágicas e granulomas.
- D) Infiltrado composto de células macrofágicas e granulomas.
- E) Infiltrado macrofágico.
- F) Infiltrado macrofágico.

FIGURA 5.3

Figura 5.4. Expressão controle em pele normal.

A – Controle em pele normal da proteína S-100

B – Controle em pele normal da Integrina $\beta 1$.

FIGURA 5.4

Figura 5.5. Variações de expressão da proteína S-100 nas terminações nervosas das lesões da pele em pacientes com hanseníase.

- A) Expressão fraca (+)
- B) Expressão fraca (+)
- C) Expressão fraca (+)
- D) Expressão moderada (++)
- E) Expressão moderada (++)
- F) Expressão forte (+++)

FIGURA 5.5

Figura 5.6. Variações de expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas das lesões da pele em pacientes com hanseníase.

- A) - Expressão ausente (0)
- B) - Expressão ausente (0)
- C) - Expressão fraca (+)
- D) - Expressão fraca (+)
- E) - Expressão moderada (++)
- F) Expressão moderada (++)

FIGURA 5.6

Os resultados obtidos estão disponíveis nas várias tabelas que se seguem:

Tabela 5.1. - Número e percentagem de pacientes segundo quantidade de lesões de pele e variáveis de estudo

Variáveis	Lesão pele				TOTAL		p
	Mais que cinco		Até cinco				
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Incapacidades							
1 ou 2	14	70,0	6	30,0	20	100,0	⁽¹⁾ 0,0003
0	3	12,5	21	87,5	24	100,0	
Histopatologia (morfologia)							
C	14	63,6	8	36,4	22	100,0	-
G	0	0,0	7	100,0	7	100,0	
I	0	0,0	12	100,0	12	100,0	
M	3	100,0	0	0,0	3	100,0	
Clínica Ridley-Joplin ⁽³⁾							
I	0	0,0	12	100,0	12	100,0	⁽²⁾ ,0001
TT	0	0,0	7	100,0	7	100,0	
DT	9	52,9	8	47,1	17	100,0	
DD	2	100,0	0	0,0	2	100,0	
DV	2	100,0	0	0,0	2	100,0	
VV	4	100,0	0	0,0	4	100,0	
Reação de Mitsuda							
Positivo	7	23,3	23	76,7	30	100,0	⁽¹⁾ 0,0065
Negativo	10	71,4	4	28,6	14	100,0	
Baciloscopia							
Positiva	8	100,0	0	0,0	8	100,0	⁽²⁾ 0,0001
Negativa	9	25,0	27	75,0	36	100,0	
Integrina (expressão)							
(+) e 0	16	42,1	22	57,9	38	100,0	⁽²⁾ 0,3801
(+++) e (++)	1	16,7	5	83,3	6	100,0	
S100 (expressão)							
(+) e 0	11	36,7	19	63,3	30	100,0	⁽¹⁾ 0,9518
(+++) e (++)	6	42,9	8	57,1	14	100,0	

Nº: número de doentes

%: percentagem de doentes

p ≤ 0,05

⁽¹⁾ Teste Quiquadrado corrigido Yates

⁽²⁾ Teste de Fisher

⁽³⁾ Para o cálculo do teste, foram agrupadas as categorias I, TT e DT, como paucibacilar; e as categorias DD, DV e VV, como multibacilar.

Como se depreende na Tabela 5.1 houve significância na correlação entre número de lesões e grau de incapacidade. Nos casos com incapacidade 1 e 2 predominaram os doentes com mais de 5 lesões. Com relação às formas clínicas, nos doentes com mais de 5 lesões predominaram as formas dimorfa – dimorfas , dimorfa-virchowiana e virchowianas. Nos casos com mais de 5 lesões prevaleceu a negatividade da reação de Mitsuda e a positividade da baciloscopia. Não houve correlação estatisticamente significativa entre número de lesões e alterações na expressão da integrina $\beta 1$ e proteína S-100 nas terminações nervosas das lesões de pele.

Tabela 5.2 - Número e porcentagem de pacientes segundo a presença ou não de lesões neurais e variáveis de estudo

Variáveis	Lesão neural				TOTAL		p
	Presente		Ausente		Nº	%	
	Nº	%	Nº	%			
Lesão de pele							
Mais que cinco	14	82,4	3	17,6	17	100,0	(1) 0,0003
Até cinco	6	22,2	21	77,8	27	100,0	
Incapacidades							
1 ou 2	20	100,0	0	0,0	20	100,0	(1) 0,0000
0	0	0,0	24	100,0	24	100,0	
Histopatologia (morfologia)							
C	12	54,5	10	45,5	22	100,0	-
G	0	0,0	7	100,0	7	100,0	
I	5	41,7	7	58,3	12	100,0	
M	3	100,0	0	0,0	3	100,0	
Clínica Ridley-Joplin (3)							
I	5	41,7	7	58,3	12	100,0	(2) 0,1148
TT	0	0,0	7	100,0	7	100,0	
DT	9	52,9	8	47,1	17	100,0	
DD	1	50,0	1	50,0	2	100,0	
DV	1	50,0	1	50,0	2	100,0	
VV	4	100,0	0	0,0	4	100,0	
Reação de Mitsuda							
Positivo	12	40,0	18	60,0	30	100,0	(1) 0,4601
Negativo	8	57,1	6	42,9	14	100,0	
Baciloscopia (3)							
Positiva	6	75,0	2	25,0	8	100,0	(2) 0,1148
Negativa	14	38,9	22	61,1	36	100,0	
Integrina (expressão)							
(+) e 0	19	50,0	19	50,0	38	100,0	(2) 0,1977
(+++) e (++)	1	16,7	5	83,3	6	100,0	
S100 (expressão)							
(+) e 0	12	40,0	18	60,0	30	100,0	(1) 0,4601
(+++) e (++)	8	57,1	6	42,9	14	100,0	

Nº: número de doentes

%; porcentagem de doentes

p ≤ 0,05

⁽¹⁾ Teste Quiquadrado corrigido Yates

⁽²⁾ Teste de Fisher

⁽³⁾ Para o cálculo do teste, foram agrupadas as categorias I, TT e DT, como paucibacilar; e as categorias DD, DV e VV, como multibacilar.

A Tabela 5.2 relacionou a presença e ausência de lesões neurais clinicamente detectáveis, com outras variáveis.

A primeira confirmação é a de que quanto maior o número de lesões cutâneas apresentadas pelos doentes mais freqüentes foi o diagnóstico de lesões neurais.

Da mesma forma, obviamente, demonstrou-se que, quando ocorrem lesões neurais clinicamente constatadas as incapacidades são mais freqüentes. Por outro lado não houve correlação estatisticamente significativa entre ausência e presença clínica de lesões neurais, forma clínica, reação de Mitsuda, baciloscopia, histologia e expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100 nas terminações nervosas das lesões da pele.

Tabela 5.3. - Número e porcentagem de pacientes segundo a integrina e variáveis de estudo

Variáveis	Integrina (expressão)				TOTAL		p
	(+) e 0		(+++ e (++)		Nº	%	
	Nº	%	Nº	%			
Incapacidades							
1 ou 2	19	95,0	1	5,0	20	100,0	0,1977
0	19	79,2	5	20,8	24	100,0	
Histopatologia (morfologia)							
C	20	90,9	2	9,1	22	100,0	-
G	5	71,4	2	28,6	7	100,0	
I	10	83,3	2	16,7	12	100,0	
M	3	100,0	0	0,0	3	100,0	
Clínica Ridley-Joplin ⁽²⁾							
I	10	83,3	2	16,7	12	100,0	1,0000
TT	5	71,4	2	28,6	7	100,0	
DT	16	94,1	1	5,9	17	100,0	
DD	2	100,0	0	0,0	2	100,0	
DV	2	100,0	0	0,0	2	100,0	
VV	3	75,0	1	25,0	4	100,0	
Reação de Mitsuda							
Positivo	25	83,3	5	16,7	30	100,0	0,6467
Negativo	13	92,9	1	7,1	14	100,0	
Baciloscopia							
Positiva	7	87,5	1	12,5	8	100,0	1,0000
Negativa	31	86,1	5	13,8	36	100,0	
S100 (expressão)							
(+) e 0	30	100,0	0	0,0	30	100,0	0,0004
(+++ e (++)	8	57,1	6	42,9	14	100,0	

Nº: número de doentes

%: porcentagem de doentes

p ≤ 0,05 (Teste de Fisher)

⁽²⁾ Para o cálculo do teste, foram agrupadas as categorias I, TT e DT, como paucibacilar; e as categorias DD, DV e VV, como multibacilar.

A Tabela 5.3 relaciona-se às alterações da expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas das lesões da pele com outras variáveis. Demonstra que somente houve correlação estatisticamente significativa com as alterações da expressão da proteína S-100. Não foi constatada esta mesma correlação com a histopatologia, reação de Mitsuda, baciloscopia e formas clinicas mesmo quando agrupadas e analisadas em grupos paucibacilares e multibacilares.

Tabela 5.4. - Valores do teste de Correlação linear de Spearman, segundo as variáveis de estudo

Variáveis	rs (Spearman)	t	p
Lesão pele X baciloscopia	0,6380	5,3689	0,0000
Lesão pele X mitsuda	-0,3879	-2,7277	0,0092
Lesão pele X Lesão neural	0,5955	4,8044	0,0000
Lesão pele X incapacidades	0,5523	4,2933	0,0001
Lesão pele X integrina	0,0471	0,3057	0,7613
Lesão pele X S-100	0,0781	0,5076	0,6144
Lesão neural X baciloscopia	0,3106	2,1175	0,0401
Lesão neural X R. Mitsuda	-0,2298	-1,5301	0,1334
Lesão neural X incapacidades	0,9366	17,3214	0,0000
Lesão neural X integrina	-0,0300	-0,1944	0,8468
Lesão neural X S100	0,1470	0,9634	0,3408
Integrina X idade	0,3708	2,5872	0,0132
Integrina X duração	-0,1507	-0,9879	0,3288
Integrina X baciloscopia	-0,0319	-0,2070	0,8370
Integrina X R. Mitsuda	0,0074	0,0479	0,9620
Integrina X incapacidades	-0,0566	-0,3671	0,7154
Integrina X S100	0,6794	5,9999	0,0000

NOTA: Correlação Linear de Spearman, ao nível de significância de 5 %.

A Tabela 5.4 emprega a correlação linear de Spearman, com nível de significância de 5%. Este teste diferentemente dos anteriores é um teste quantitativo, que considera todas as multiplicidades (números) das variáveis.

A quantidade de lesões dermatológicas apresentou correlação estatisticamente significativa entre índices crescentes da baciloscopia, entre o número crescente de troncos nervosos clinicamente lesados e suas incapacidades, bem como, apresentou relação inversa à resposta a reação de Mitsuda. Não apresentou também significância com as alterações das expressões da integrina $\beta 1$ e proteína S-100 nas terminações nervosas da pele..A quantidade de troncos nervosos lesados diagnosticados clinicamente apresentou correlação estatisticamente significativa com as incapacidades e,

diversamente dos testes qualitativos, com o aumento dos índices bacilares, não apresentou correlação com a reação de Mitsuda, e as expressões da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100. Neste teste a expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas das lesões da pele confirma a correlação estatisticamente significativa com as expressões da proteína S-100 e também com idade.

Tabela 5.5. - Valores do teste de Regressão Linear Simples, segundo a integrina e variáveis de estudo

Variáveis	R2 (ajustado) %	p
Integrina X lesões de pele	- 2,31	0,8610
Integrina X lesões neurais	- 2,22	0,7961
Integrina X idade	8,63	0,0281
Integrina X duração	1,66	0,1933
Integrina X baciloscopia	- 2,09	0,7316
Integrina X R. Mitsuda	- 2,38	0,9925
Integrina X incapacidades	- 1,64	0,5886
Integrina X S-100	39,76	0,0000

NOTA: Regressão Linear Simples, ao nível de significância de 5%.

As tabelas 5.5 (acima) e 5.6 (abaixo) ratificam as correlações quantitativas da expressão da integrina $\beta 1$ com a idade e a expressão da proteína S-100. Confirma a ausência de correlação entre a expressão da integrina $\beta 1$ entre a quantidade de lesões de pele, quantidade de troncos nervosos clinicamente lesados, baciloscopia, incapacidades, duração da doença e reação de Mitsuda

Tabela 5.6. - Valores do teste de Regressão Linear Múltipla, segundo a integrina e variáveis de estudo

Variáveis	Coeficiente parcial de regressão	<i>t</i>	<i>p</i>
S-100 (b1)	0,4464	5,5557	0,0000
Idade (b2)	0,0135	2,4965	0,0173
Baciloscopia (b3)	-0,1636	-1,5213	0,1371
Lesões de pele (b4)	0,0133	1,4287	0,1619
Duração (b5)	-0,0042	1,2650	0,2142
Incapacidades (b6)	-0,1328	-0,8650	0,3929
Lesões neurais (b7)	-0,0258	0,7342	0,4677
R. Mitsuda (b8)	-0,0027	-0,1078	0,9148

NOTA: Regressão Linear Múltipla, ao nível de significância de 5%,

$F(8,35) = 5,9048$ $p = 0,0002$

Intercepto(a) = - 0,3701 $t = -1,2246$ $p = 0,2288$

$Y'(\text{integrina}) = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_iX_i$

Tabela 5.7. – Número de pacientes segundo o exame laboratorial integrina, e o exame S-100

S-100 (expressão)	Integrina (expressão)	
	(+) e 0	(+++) e (++)
(+) e 0	30	0
(+++) e (++)	8	6

NOTA: Kappa = 0,51

Sensibilidade (IC 95%) = 78,9% (62,2% - 89,9%)

Especificidade (IC 95%) = 100% (51,7% - 100%)

Valor preditivo positivo (IC 95%) = 100% (85,9% - 100%)

Valor preditivo negativo (IC 95%) = 42,9% (18,8% - 70,4%)

A Tabela 5.7, demonstra que, quando se comparam as expressões da integrina $\beta 1$ e proteína S-100, a sensibilidade da proteína S-100 é, em média de 78,9% enquanto a sensibilidade da integrina $\beta 1$ é de 100%.

Tabela 5.8. – Número de pacientes segundo o exame laboratorial S-100, a classificação clínica e incapacidades

Variáveis	S 100 (expressão)				TOTAL		p
	(+) e 0		(+++ e (++)		Nº	%	
	Nº	%	Nº	%			
Clínica Ridley-Joplin							
(3)							
I	9	75,0	3	25,0	12	100,0	(1) 0,6951
TT	4	57,1	3	42,9	7	100,0	
DT	12	70,6	5	29,4	17	100,0	
DD	2	100,0	0	0,0	2	100,0	
DV	1	50,0	1	50,0	2	100,0	
VV	2	50,0	2	50,0	4	100,0	
Incapacidades							
Tipo 2	6	66,7	3	33,3	9	100,0	(2) 0,4803
Tipo 1	6	54,5	5	45,5	11	100,0	
Ausentes	18	75,0	6	25,0	24	100,0	

NOTA: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa

(1) Teste de Fisher

(2) Teste Qui-quadrado

(3) Para o cálculo do teste, foram agrupadas as categorias I, TT e DT, como paucibacilar; e as categorias DD, DV e VV, como multibacilar.

Da mesma forma que a expressão da integrina $\beta 1$ a Tabela 5.8, demonstra ausência de correlação estatisticamente significativa entre as alterações da expressão da proteína S-100 e a presença de incapacidade e formas clínicas mesmo quando se analisam os doentes agrupados em formas paucibacilares e multibacilares.

Tabela 5.9. – Relação Integrina $\beta 1$ x Incapacidades.

	Expressão integrina $\beta 1$ (0) e (+)	Expressão integrina $\beta 1$ (++) e(+++)
Incapacidade tipo 2 (9)	4 + 5 44% 55%	0 0%
Incapacidade tipo 1 (11)	8 2 72% 18%	1 9%
Sem incapacidades (24)	14 5 58% 21%	5 21%

A Tabela 5.9 demonstra que maiores alterações da expressão da integrina $\beta 1$ ocorrem nos doentes com incapacidades maiores, ainda que não haja significância estatística neste achado.

6. DISCUSSÃO

Devido a grande importância do diagnóstico preciso e precoce do agravo nervoso na hanseníase, estudos focados na elucidação dos mecanismos moleculares do acometimento do sistema nervoso periférico pelo *Mycobacterium leprae*, são fundamentais para a obtenção de avanços no conhecimento da patogenia da afecção. Podem inclusive, propiciar novas formas de tratamento visando a proteção e recuperação dos nervos, impedindo as temidas seqüelas nervosas que sempre acarretam graves conseqüências.

Com relação ao sistema nervoso periférico, alvo de eleição do *Mycobacterium leprae*, existem vários estudos analisando as funções da lâmina basal das células de Schwann bem como de outros elementos estruturais como a laminina e seus receptores, entre eles a integrina, na fisiologia e patologia deste sistema.

No sistema nervoso periférico as células de Schwann, a matriz extracelular, a lâmina basal e as integrinas desempenham importantes funções de adesão e interação, como complexo regulador e ordenador da embriogênese, do desenvolvimento pos-natal e da homeostase.

Estudo *in vitro* de Fernandez-Valle (1994), destacou o papel das integrinas no sistema nervoso periférico. Utilizando anticorpo anti-integrina $\beta 1$

provocou dissociação entre células de Schwann e a lâminina da lâmina basal com conseqüente falha no processo de mielinização

Em modelos animais a ausência da integrina $\beta 1$ leva a perda da aderência entre as células de Schwann e a lâmina basal produzindo desorganização do sistema e em conseqüência desmielinização, (Feltri, 2002)

A expressão anormal das integrinas e seus ligantes está associada com processos degenerativos, inflamatórios e malignizantes do sistema nervoso periférico (Previtali, 2001).

Considerando esses achados em várias condições patológicas neurais, pode-se admitir que também na neuropatia hansênica ocorrem alterações da expressão das integrinas e os achados do presente trabalho confirmam esta possibilidade.

Na casuística estudada a expressão da integrina $\beta 1$ foi variável, sendo encontradas: ausência da expressão (0), expressão fraca (+) e expressão moderada(++) e, em nenhum caso, foi detectada expressão forte (+++), , como ocorre em controles normais

A presença de alterações variáveis na expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele em todos os doentes nas diversas formas clínicas da doença assinala que a agressão é variável, e constante, pois ocorreu em toda a casuística estudada e, precoce, pois ocorreu mesmo nas formas indeterminadas. Assim sendo podemos inferir que as alterações da expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele na hanseníase são precoces, variáveis e se apresentam em todos os casos.

Estudando as expressões da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele nas diversas formas clínicas da casuística, constatou-se que dos 12 casos da forma clínica indeterminada (I), 10 doentes (83,3%) apresentaram-se com expressão ausente ou fraca e em somente 2 casos (16,7%), a expressão nas terminações nervosas da pele apresentou-se moderada. Nos 7 casos da forma tuberculóide (TT) em 5 casos (71,4%) a expressão da integrina nas terminações nervosas da pele mostrou-se ausente ou fraca e em 2 casos (28,6%) a expressão foi moderada. Nos 4 doentes da forma virchowiana (V V), em 3 casos (75%) a expressão foi ausente ou fraca e em 1 caso (25%) a expressão foi moderada. Nas formas clínicas dimorfa-tuberculoide, dimorfa-dimorfa e dimorfa-virchowiana, apesar de não haver significância estatística, constatou-se expressão ausente e fraca da integrina nas terminações nervosas na pele em 20 dos 21 doentes, denotando uma maior agressividade nervosa, própria destas formas clínicas.

Portanto em todas as formas clínicas da hanseníase a expressão da integrina $\beta 1$ foi anormal em relação aos controles, predominando no conjunto dos casos expressão fraca ou ausente em relação à expressão moderada e, em nenhum dos doentes a expressão da integrina $\beta 1$ foi normal.

As alterações da expressão da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele, a semelhança da integrina $\beta 1$, foi precoce, de intensidade variável, porém não foi constante, como a alteração da expressão da integrina $\beta 1$, pois em cinco casos houve expressão forte, idêntica ao grupo controle, revelando nervo preservado. Estes 5 doentes compreendiam, 1 indeterminado, 2 tuberculóides, 1 dimorfo-virchowiano e 1 virchowiano.

Com relação à expressão da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele na forma clínica indeterminada (I) nos 12 casos (75%) foi nula ou fraca e 25% apresentaram-se com expressão moderada ou forte, destacando-se 1 caso com expressão forte. Nas 7 formas tuberculoides a expressão nula e fraca da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele foi verificada em 4 casos (57,1%) e em 3 casos (42,9%) a expressão foi moderada e forte, destacando-se aqui, 2 casos com expressão forte. Nos quatro doentes da forma clínica virchowiana a expressão da proteína S-100 foi em 2 casos (50%) com nula e fraca e em 2 casos (50%) foi moderada e forte, destacando-se 1 caso com expressão forte. Porém o que mais chama a atenção são as formas dimorfa-tuberculóide, dimorfa-dimorfa e dimorfa-virchowiana, nos quais, dos 21 casos, 15 (71,4%) apresentaram ausência de expressão ou expressão fraca, 6 casos (28,6%) apresentaram expressão moderada ou forte, destacando-se 1 caso com expressão forte da proteína S-100, a semelhança do grupo controle.

A proteína S-100 no conjunto dos doentes das várias formas clínicas mostrou predominantemente expressão fraca ou ausente a semelhança da integrina $\beta 1$, porém em menor frequência. Assim se forem combinadas as formas dimorfas (DT, DD, DV) a expressão da integrina $\beta 1$ foi ausente ou fraca em 20 de 21 doentes (95,2%) e a expressão da proteína S-100 foi ausente ou fraca em 15 dos 21 doentes (71,4%). Além disso em 5 doentes a expressão da proteína S-100 foi normal, o que não ocorreu com a integrina $\beta 1$ em nenhum destes doentes. Esses achados demonstram que a integrina $\beta 1$ é mais sensível em relação à proteína S-100 na detecção das alterações das terminações nervosas na hanseníase.

Estatisticamente as alterações de expressão da integrina $\beta 1$ e proteína S-100 mostraram uma correlação bastante significativa: pelo método de Fischer (0,0004), pelo método do teste de Correlação linear de Spearman (0,0000), pelo teste da regressão linear simples (0,0000) e pelo teste da regressão linear múltipla (0,000). Pelo método Kappa os casos com expressões nula e leve, que sinalizam maior dano aos nervos, revelam coerência de 100% entre si, contudo para as expressões moderada e forte que indicam menor agressão ao nervo ou nervo preservado, a relação foi de 78,9%.

Desse modo os resultados das duas reações imunohistoquímicas são correlatos sendo porem o método da expressão da integrina $\beta 1$ mais sensível na detecção de lesões das terminações nervosas da pele.

Como já se assinalou, em 5 doentes, a proteína S-100 apresentou expressão forte (+++), à semelhança do grupo controle, indicando nervos com padrão estruturalmente preservado e no entanto a expressão da integrina $\beta 1$ nesses casos, estava alterada, indicando que o fenômeno da agressão nervosa na hanseníase poderia ser mais precocemente detectado nas terminações nervosas da pele pela expressão da integrina $\beta 1$ em relação à expressão da proteína S-100

Esses dois métodos estudados em conjunto com as formas clínicas, acometimento de troncos nervosos e alguns parâmetros clínicos como, número de lesões na pele, idade, cor e sexo comportaram-se como se segue.

Encontramos nos casos indeterminados somente um com expressão forte (+++) da S-100 , indicando nervo estruturalmente preservado de acordo

com o grupo controle, porém a expressão da integrina β -1 neste caso foi moderada (++) demonstrando a precocidade da alteração deste exame, em evidente indicação do início da agressão nervosa.

Esses achados reforçam as hipóteses de Facer (1998), que encontrou fortes indícios de lesões neurais detectadas pelo método PGP 9,5 nos pacientes sem alterações neurológicas clinicamente detectáveis e, de Suneetha, (2005), que estudando a hanseníase neural pura, sugere que, quando do desenvolvimento da lesão cutânea já há acometimento de nervos, indicando que, a neurite precede a dermatite.

A mancha única é a lesão que mais oferece dificuldades diagnósticas. Somente a presença de bacilos dará à certeza diagnóstica, o que frequentemente não ocorre. É o que demonstra o trabalho retrospectivo realizado em 1108 casos histopatológicos com suspeita clínica de hanseníase no Estado da Bahia (Barbosa Jr, 1998), dos quais, 546 (49,3%) foram indistinguíveis de uma simples dermatite crônica bem como 100% dos casos diagnosticados como hanseníase tuberculoide apresentaram ausência de bacilo.

Em 12 casos indeterminados da casuística estudada configurou-se esta situação, A alteração da expressão da integrina β 1 e da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele estiveram presentes em 100% e 92% respectivamente. Considerando tal situação sem condições de um diagnóstico absolutamente preciso as alterações nas terminações nervosas da pele identificadas por meio dos métodos imunohistoquímicos das expressões da integrina β 1 e da proteína S-100, poderão contribuir para a diagnose,

particularmente a alteração das integrinas que mostraram-se alteradas nas terminações nervosas da pele em 100% dos doentes.

Nas formas tuberculoides, constatamos que dos 7 casos diagnosticados, ainda que com baciloscopia negativa, dois deles apresentaram expressão forte (+++) da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele, porém a expressão da integrina $\beta 1$, sempre apresentou alterações iguais ou mais intensas que a expressão da proteína S-100, confirmando assim os argumentos anteriores da maior sensibilidade da alteração da expressão da integrina $\beta 1$ bem como de sua possível utilidade na confirmação diagnóstica da hanseníase abacilar.

Deve-se considerar ainda a possibilidade de utilização do estudo da expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele na exclusão de diagnóstico de hanseníase, quando a expressão desta proteína estiver preservada, a semelhança dos grupos controle.

Estudando os troncos nervosos com base no padrão clínico observa-se que dos quarenta e quatro casos, vinte e quatro casos (55%) não apresentaram alterações, no entanto quando a pesquisa da agressão aos nervos se faz através das terminações nervosas da pele por meio da expressão da integrina $\beta 1$ nenhum dos casos revelou expressão forte (+++), indicando que nenhuma terminação nervosa estava preservada, diferentemente dos controles normais. Seis casos (13,6%) apresentaram expressão moderada da integrina $\beta 1$ (++), o que se pode considerar uma agressão leve ao nervo. Em onze casos (25,0%) a expressão da integrina $\beta 1$ foi fraca (+), considerada agressão moderada e em vinte e sete casos (61,3%)

a expressão da integrina $\beta 1$ foi ausente (0), indicando que estes doentes apresentavam agressão intensa às terminações nervosas da pele.

Esses dois parâmetros imunohistoquímicos, e em especial a expressão da integrina $\beta 1$ são muito mais sensíveis em relação aos critérios clínicos, identificando alterações nos padrões molecular e estrutural das terminações nervosas da pele, as quais ainda não resultaram em transtorno funcional nos troncos nervosos, portanto ainda não detectáveis clinicamente.

A observação de alterações da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele, pode portanto sinalizar antecipadamente em relação às manifestações clínicas o dano nervoso na hanseníase, provavelmente em função da adesão do *Mycobacterium leprae* a estas moléculas no processo de invasão ao nervo, fenômeno inicial da agressão nervosa.

Vários investigadores, entre eles Rambukkana, (2004), também destacam que embora o dano nervoso precoce não seja suficiente para produzir manifestações clínicas da doença, a análise das alterações moleculares pode oferecer informações para um diagnóstico mais preciso e precoce, e intervenções terapêuticas mais adequadas

Isto posto pode-se inferir que, nos casos de hanseníase neural pura, o estudo das alterações da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100 nas terminações nervosas, por meio de biópsia da pele na área correspondente ao tronco nervoso suspeito, pode contribuir para a elucidação diagnóstica, pois evidências de alteração da expressão da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100

demonstrando o efetivo e intenso dano as terminações nervosas da pele, ratifica uma agressão ao sistema nervoso periférico. Cite-se em reforço à esta hipótese aqui o trabalho de Del Valle e Gonzalez-Martinez (1993), demonstrando que quando há esmagamento ou secção do nervo, a expressão da proteína S-100 nos corpúsculos de Meissner está severamente comprometida.

Quanto ao grau de incapacidade tipo 2 observamos um número de nove casos, representando 20,5% da casuística estudada, portanto acima da estatística internacional, que registra 7% e 9% deste tipo de incapacidade (WHO, 2005). Esses casos estudados por meio dos métodos imunohistoquímicos, mostraram quatro casos com ausência de expressão da integrina $\beta 1$ e três com ausência de expressão da proteína S-100 consideradas agressão intensa às terminações nervosas da pele e cinco casos com expressão fraca (+) de integrina $\beta 1$, e três com expressão fraca (+) da proteína S-100, representando dano nervoso moderado. Nos casos com incapacidade tipo 2 não foi encontrada expressão forte da proteína S-100 bem como expressão moderada (++) da integrina $\beta 1$, registrando-se somente expressão fraca e ausente desta proteína. Apesar da casuística ser composta de somente 9 casos com incapacidade tipo 2, esses achados poderiam indicar correlação entre a maior alteração de expressão imunohistoquímica e maior grau de agressão nervosa, indicando maior probabilidade de seqüelas.

Não foi possível estabelecer significância estatística da expressão da integrina nas terminações nervosas da pele, nas múltiplas formas clínicas da casuística devido à dispersão dos doentes. Da mesma forma, mesmo

agrupando as formas clínicas paucibacilares e multibacilares não foi possível constatar indícios de correlação com as reações imunohistoquímicas. O mesmo ocorreu com a baciloscopia, a reação intra-dérmica de Mitsuda e os diversos dados clínicos dos doentes.

A expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele mostrou-se mais alterada quanto maior a idade dos doentes. Este evento poderá meramente estar relacionado ao maior tempo da evolução da enfermidade nos indivíduos mais idosos, provocando assim maior malefício aos nervos.

A casuística demonstrou correlação entre número de lesões e índice bacilar, coincidindo com os achados de Gallo (2003).

Como era de se esperar, o número de lesões de pele foi inversamente proporcional à positividade da intradermoreação de Mitsuda, confirmando o conhecimento de que quanto menor a resistência à infecção, maior é a sua agressividade. Houve ainda correlação entre número de lesões de pele e lesões de troncos nervosos clinicamente diagnosticados bem como com as conseqüentes incapacidades.

No futuro, um melhor entendimento do complexo formado pelos receptores da laminina, particularmente as integrinas levará a maior conhecimento da patogenia da infecção hansênica, podendo tornar mais eficientes os tratamentos não somente das neuropatias próprias desta enfermidade com também das neuropatias hereditárias e adquiridas em geral.

7. CONCLUSÕES

A expressão da integrina $\beta 1$, mostrou-se alterada nas terminações nervosas da pele em todos os casos estudados (100%).

A expressão da proteína S-100, mostrou-se significativamente alterada na casuística estudada (88,6%).

As alterações da expressão da integrina $\beta 1$, nas terminações nervosas da pele, mostraram-se mais sensíveis em relação às alterações da expressão da proteína S-100.

A presença de 100% de alterações da expressão da integrina $\beta 1$ nas terminações nervosas da pele dos doentes estudados indica a possibilidade da análise dessa molécula ser um método auxiliar na diagnose ou exclusão de hanseníase.

Não foi constatada correlação entre as formas clínicas paucibacilares e multibacilares e as alterações das expressões da integrina $\beta 1$ e da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele.

Nos casos com incapacidade tipo 2, foi constatada uma tendência de correlação com ausência de expressão e expressão fraca da, integrina $\beta 1$.

Houve correlação significativa entre o número de lesões de pele, baciloscopia, reação de Mitsuda e número de trocos nervosos clinicamente lesados.

Os achados das alterações na expressão da integrina β 1 e expressão da proteína S-100 nas terminações nervosas da pele não correlacionaram significativamente com os achados clínicos de alteração dos troncos nervosos, pois as alterações moleculares são detectadas muito mais precocemente em relação às alterações funcionais dos nervos.

8. BIBLIOGRAFIA

8.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ª. Ed. Artes Médicas. 1997

American Leprosy Missions Brasil. Relatório resumo do Fórum Técnico da ILA. Disponível em :
<http://www.almbrasil.com.br/pdf/ITF20%Summary%20February%2022002%20Portuguese.pdf>.

Barbosa Jr. AA, Jambeiro J, Cerqueira J, Silva TC. Classificação histopatológica retrospectiva de 1108 pacientes com suspeita clínica de hanseníase provenientes do Estado da Bahia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31(6), 1998.

Bartlett Bunge, M. Schwann cell regulation of extracellular matrix biosynthesis and assembly. *Peripheral Neuropathy*. Saunders, Philadelphia, PA 3rd ed. 1993.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Latest Academic Research on Hansen's Disease (Leprosy). *The Lancet*. 363(9416), 1209-19, Apr 2004.

Bunge RP, Bunge MB. Interrelationships between Schwann cell function and extracellular matrix production. *Trends Neurosci.* 6, 499-505, 1983.

Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 80, 675-679, 1995.

Darribère T, Skalski M, Cousin H, Gaultier A, Montmory C, Alfandary D. Integrins: Regulators of embryogenesis. *Biol. Cell*. 92, 5-25, 2000.

Danielssen DC, Boeck W: *Traité de la Spedalskhed ou Elepnhatiasis des Grecs*, Paris, J. B. Baillone, 1848

De Arcangelis A, Georges LE. Integrin and ECM functions. Roles in vertebrate development. *TIG*. 16(9), 389-395, 2000.

De Leon M, Van Eldik LJ, Shooter EM. Differential regulation of S100 β and mRNA coding for S100-like proteins (42A and 42C) during development and after lesion of rat sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.* 29, 155-162, 1991.

Del Valle ME, Cabal A, Alvarez-Mendez JC, Calzada B, Haro JJ, Colier W, Vega JA. Effect of denervation on lamellar cells of Meissner-like sensory corpuscles of the rat. An immunohistochemical study. *Cell. Mol. Biol.* 39, 801-807, 1993.

Donato R. Intracellular and Extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60, 540-551, 2003.

Edwards GM, Willford FH, Liu XW, Hennighausen L, Djiane J, Streuli CH. Regulation on mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 273, 9495-9500, 1988.

Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR. Distribution and isolation of four laminin variants; restricted tissue distribution of heterotrimers assembled from different subunits. *Cell Regul.* 1, 731-740, 1990.

Ervasti JM, Campbell KP. A role for dystrophin-glycoprotein complex as transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell. Biol.* 122, 809-823, 1993.

Facer P, Mathur R, Pandya SS, Ludiwala U, Singhal BS, Anand P. Correlation of quantitative tests of nerve and target organ dysfunction with skin immunohistology in leprosy. *Brain*. 121, 2239-2247, 1998.

Feltri ML, Porta DG, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichart LF, Messing A, Quattrini A, Mueller U, Wrabetz L.

Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J. Cell Biol.* 156, 199-209, 2002.

Feltri ML, Wrabetz L. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J Periph Ner Sys.* 10: 128-143, 2005.

Fernandez-Valle C, Gwynn L, Wood P, Carbonetto S, Bunge NB. Anti β 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination. *J. Neurobiol.* 25, 1207-1226, 1994.

Fleury RN, Bacchi CE. S-100 protein and immunoperoxidase technique as an aid in the histopathology diagnoses of leprosy. *Inst. J. Lep. Others Mycob. Diseases.* 53(3), 338-44, 1987.

Gallo ME, Ramos Junior LAN, Albuquerque ECA, Nery JAC, Sales AM. Allocation of leprosy patients for multidrugtherapy: correlation between the classification according to number of skin lesions and the skin smears examination. *An. Brás Dermatol. Inst. Oswaldo Cruz, Fiocruz – Rio de Janeiro, Brasil.* 78(4) 415-24, 2003.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 285(5430), 1028-1032, 1999.

Gonzalez-Martinez T, Perez-Piñera P, Dias-Esnal B, Vega JA. S-100 proteins in the Human Peripheral Nervous System. *Micros. Res. Tech.* 60, 633-638, 2003

Haimoto, H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100- α and S100 β proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab. Invest.* 57, 489-498, 1987.

Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biology.* 19, 319-323, 2000.

Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 578-585, 1998.

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan Inside and Out. *Courrent Opinion in Cell Biology*. 11, 602-607, 1999.

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol*. 147, 728-735, 1981.

Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem*. 257, 15972-15080, 1982

Hynes RO. Integrines: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69, 11-25, 1992.

Hynes RO. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biology*. 23, 333-340, 2004.

ILA. Resumo do Relatório do Fórum Técnico. Paris. Fev. 2002.

ILEP. Resumo de Relatório de 2002, disponível na Internet www.ilep.org.uk

Job CK. Nerve damage in leprosy. *Int. J. Lepr*. 57, 532-539, 1989.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica 10o Ed. Editora Guanabara Koogan SA, 2004.

Leivo I, Engvall E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblasts, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 1544-1548, 1988.

Levis WR, Meeker HC, Levis GS, Sersen E, Schwerer B. IgM and IgG Antibodies to Phenolic Glicolipid I from *Mycobacterium Leprae* in Leprosy: Insight into Patient Monitorig, Erythema Nodosum Leprosum and Bacillary Persistence. *Journal of Investigative Dermatology* 86, 529-534, 1986.

Lumsden CE. Leprosy and the Schwann cells *in vitro* and *in vivo* in Cochrane RD, *Leprosy in Theory and Practice*. Bristol John Wright & Sons Ltd. 221-250, 1959.

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1111-1122, 2004.

Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annual Rev Cell Dev Biology.* 20, 255-284, 2004.

Moura L, Oliveira ASB, Zanoteli E, Cardoso R, Schmidt B, Gabbai AA. Padronização normal das fibras nervosas intraepidérmicas em 30 voluntários saudáveis com PGP 9,5. *Arq. Neuropsiquiatr.* 62(2 A), 271-275, 2004.

Mukherjee R, Antia NH. Host-parasite interrelationship between *M. leprae* and Schwann cells *in vitro*. *Int. J. Lepr.* 1986.

Narayan R. Detection of S-100 protein and anticeramide antibody in leprosy patients by Elisa. *Lepr. Rev.* 68(20), 117-24, 1997.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 27, 103(3), 511-24, Oct 2000.

Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes, JR. Distribution and function of laminins in neuromuscular system of developing, adult and mutant mice. *J. Cell. Biol.* 139, 1507-1521, 1997.

Previtali SC, Archelos JJ, Hartung HP. Expression of integrins in experimental autoimmune neuritis and Guillain Barré syndrome. *Ann of Neurol.* 44, 611-621. 1998.

Previtali SC, Feltri ML, Archelos JJ, Quattrini A, Wrabetz L, Hartung H. Role of integrins in peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology.* 64, 35-49, 2001.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. *Cell*. 21, 88(6), 811- 21, Mar 1997.

Rambukkana A. Molecular Basis for the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium Leprae*. *Curr Opin Microbiol*. 4, 21-27, 2001.

Rambukkana A. *Mycobacterium Leprae*-Induced Demyelination: A Model for Early Nerve Degeneration. *Curr Opin Immunol* . 16, 511-518, 2004.

Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull. World Health Organ*. 51, 451–465, 1974.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. *Int J Lepr*. 34, 255-273, 1966.

Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann cells. *J. Biol. Chem*. 274, 8240-8246, 1999.

Sampaio SA, Rivitti, E. *Dermatologia*. 2ª Ed. Editora Artes Médicas, 2001.

Scollard DM, McCormick G, Allen JL. Localization of *Mycobacterium leprae* to endothelial cells of epineural and perineural blood vessels and lymphatics. *Am J. Pathol*. 154, 1611-1620, 1999

Secretaria Executiva de Saúde Pública – Pará. Hanseníase no Brasil. Disponível em: http://www.sespa.pa.gov.br/Situa%C3%A7%C3%A3o/situa%C3%A7%C3%A3o_hansen%C3%AAsse.htm

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti V, Rambukkana A. A 21-Kda Surface Protein of *Mycobacterium Leprae* Binds Peripheral Nerve Laminin-2 and Mediates Schwann Cell Invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96, 9857-9862, Aug 1999.

Suneetha S, Sigamani A, Kurian N, Chacko CJG. The Development of Cutaneous Lesions During Follow-Up of Patients With Primary Neuritic Leprosy. *International Journal of Dermatology*. 44, 224-229, 2005.

Talhari S, Neves RG. *Dermatologia Tropical: Hanseníase*. 3ª Ed. Manaus: Instituto Superior de Estudos da Amazônia, 1997.

Thomas MM, Jacob M, Chandi SM, Soshamma G, Pulimood S, Jeyaseelan L, Job, CK. Role of S-100 staining in differentiating leprosy from other granulomatous diseases of the skin. *Int. J. Lepr. Other Mycob. Diseases*. 67(1), 1-5, 1998.

WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser*; 675: 1-33. , 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Elimination of leprosy as a public health problem (update). *Weekly Epidemiological Record*. 73, 308-312, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for carrying out leprosy elimination campaigns. *Lepr. Rev.* 70(4), 408-27, Dez 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leprosy Situation, 2004. *Weekly Epidemiological Record*. 13(80), 118-124, Apr 2005. <http://www.who.int/wer> capturado em maio 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy, the disease 2005. Disponível em: <http://www.who.int/lep>

8.2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Abbas, AK, Lichtman, AH, Poder, JS. *Celular and Molecular Immunology*. 4th Ed. WB Sanders Co. 2002.

Abulafia J, Vignale RA. Leprosy: Pathogenesis Updated. *Int. J. Dermatol.* 38, 321-334, 1999.

Abulafia J, Vignale RA. Leprosy: accessory immune system as effector of infections, metabolic and immunologic reactions. *Int. J. Dermatol.* 40(11), 673-67, Nov 2001.

Antia, NH. Leprosy - A disease of the Schwann cell. *Leprosy in India*. 54, 599-603, 1982.

Bhattacharya SN, Sehgal VN. Reappraisal of the Drifting Scenario of Leprosy Multi-Drug Therapy: New Approach Proposed for New Millenium. *Int. J. Dermatol.* 41, 321-326, 2002.

Brakebusch C, Fässler R. Beta-1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer and Metastasis Reviews*. 24, 403-411, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Hanseníase. Atividades de Controle e Manual de Procedimentos. *MS Brasil*. Brasília, Df, 2001a.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Prevenção de Incapacidades. *MS. Brasil*. Brasília, Df, 2001b.

Brennan PJ. The US-Japan Joint Leprosy Research Program Meeting, San Francisco, Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523-1677, USA, June 28-30, 1999.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Young R-B, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Mondlin RL. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science*. 285(5428), 732-736, Jul 1999

Brito MFM, Ximenes RAA, Gallo MEN. O Retratamento por Recidiva em Hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 80(3), 255-260, Mai/Jun. 2005.

Cole ST, Elglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrel BG. Massive Gene Decay in the Leprosy Bacillus. *Nature*. 409, 1007-1011, Feb 2001.

Crippa ILF, Schettini MC, Schettini AP, Rebello PFB, Pennini SN. Correlação Clínico-Laboratorial Baseada em Dados Secundários dos Casos de Hanseníase Atendidos no Período de 01/2000 A 03/2001 na Fundação Alfredo da Matta, Manaus-AM, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 79(5), 547-554, Set-Out 2004.

Goulart IMB, Cardoso AM, Gonçalves MA, Santos MS, Goulart LR. Quantificação do DNA do *Micobacterium leprae* por PCR diferencial em biópsias de lesão de pele de pacientes com hanseníase: correlação com formas clínicas de Ridley-Jopling. *An. Bras. de Dermatol*. 80(2), S117, Jul-Ago 2005.

Hagge D, Robinson SO, Scollard D, McCormick G, Williams DL. A New Model for Studying the Effects of *Mycobacterium Leprae* on Schwann Cell and Neuron Interactions. *J. of Infectious Diseases*. 186, 1283-1296, 2002.

Hoang, B.;Chiba, A. Genetic analysis on the role of integrin during axon guidance in Drosophila. *J.Neuroscience*. 18, 7847-7855, 1998.

Hussain R, Shahid F, Zapar S, Dojki M, Dockrell HM. Immune Profiling of Leprosy and Tuberculosis Patients to 15-MER Peptides of *Mycobacterium Leprae* and *M. Tuberculosis* Groes in a BCG Vaccinated Area: Implications for Development of Vaccine and Diagnostic Reagents. *Immunology*. 111, 462-471, 2004.

Iwanaga T, Fujita T, Takahashi Y, Nakajima T. Meissner's and Pacinian corpuscles as studied by immunohistochemistry for S-100 protein, neuron-specific enolase and neurofilament protein. *Neurosci Lett*. 31, 117-121, 1982

Kahn AR. S-100 protein in diagnoses of tuberculoid/borderline tuberculoid leprosy. *Annals of Saudi Medicine*. 18(4), 305-307, 1998.

Kligman D, Hilt DC. The S-100 protein family. *Trends Biochem. Sci*. 13, 437-43, 1988.

Lê Douarin,N., Ziller, C. Plasticity in neural crest cell differentiation. *Cell Biology*. 5, 1036-1043, 1993.

Manandhan R, Lemaster JW, Butlin CR, Brennan PJ, Roche PW. Interferon-Gamma Response to Candidate Leprosy Skin Tests Reagents Detect Exposure to Leprosy in a Endemic Population. *Int. J. Lepr. Other Mycobat. Dis*. 68(1), 40-48, Mar 2000.

Marques MAM, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Pessolani MCV. Bacterial and host-derived cationic proteins bind 2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes and Infection*. 2, 1407-1417, 2000.

Marques MAM, Mahapatra S, Sarno EN, Santos S, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MCV. Further Biochemical Characterization of *Mycobacterium Leprae* Laminin-Binding Proteins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(4), 463-470, Apr 2001.

Martelli CMT, Stefani MMA, Penna GO, Andrade ALSS. Endemias e Epidemias Brasileiras, Desafios e Perspectivas de Investigação: Hanseníase. *Rev. Bras. Epidemiol.* 5(3), 273 – 285, 2002.

Mcinturff JE, Modlin RL, Kim J. The Role of Toll-Like Receptors in The Pathogenesis and Treatment of Dermatological Disease. *J. of Invest. Dermat.* 125, 1-8, 2005.

Ohyama H, Kato N, Takeuchi K, Soga Y, Uemura Y, Nishimura F, Matsushita S. Monocytes of Distinct Clinical Types of Leprosy Are Differentially Activated by Cross-Linking Class II HLA Molecules to Secrete IL-2. *Apmis.* 112, 271-4, 2004.

Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RN. Expression of Toll-Like Receptor 2 on Human Schwann Cells: A Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. *Infection and Immunity.* 71(3), 1427-1433, Mar 2003.

Organização Pan Americana de Saúde. *Manual para o controle de hanseníase.* 2 Ed. 1989

Patil SA, Ramu G, Prasad R. Detection of disease related immune complexes in the serum of leprosy patients. A novel single step method. *J. Neuroimmunol.* 105(1), 64-8, Jun 2000.

Podratz JL, Rodriguez E, Windebank AJ. Role of the extracellular matrix in myelination of peripheral nerve. *Glia* 35, 35-40, 2001.

Podratz JL, Rodriguez, EH, Windebank AJ. Antioxidants are necessary for myelination of dorsal root ganglion neurons in vitro. *Glia.* 45: 54-58, 2004.

Previtali, SC, Archelos, JJ, Hartung, HP. Modulation of the expression of integrins on glial cells during experimental encephalomyelitis: a central role for TNF- α . *Am. J. Pathol.* 151, 1425-1435, 1997.

Previtali SC, Quattrini A, Pardini CL, Nemni R, Feltri ML, Boncinelli E, Canal N, Wrabetz L. The laminin receptor $\alpha 6 \beta 4$ integrin is highly expressed in ENU-induced glioma in rat. *Glia* 26, 55-63, 1999

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of α -dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science*. 282 (5396), 2076-9, Dec 1998.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. *Science (Online)*. 296 (5569), 927-31, May 2002.

Ridley DS. A bacteriologic study of erithema nodosum leprosum. *Int. J. Lepr.* 28, 354-66, Jul-Set 1960.

Ridley DS. Pathogenesis of the early lesions in leprosy. *J. Pathol.* 3, 191-206, 1972.

Sampaio EP, Caneshi JR, Nery JA, Duppre NC, Pereira GM, Vieira LM, Moreira AL, Kaplan G, Sarno, EN. Cellular immune response to *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect. Immun.* 63, 1848-54, 1995.

Sampaio EP, Oliveira RB, Warwick-Davies J, Neto RB, Griffin GE, Shattock RJ. T-cell-monocyte contact enhances tumor necrosis factor- α production in response to *Mycobacterium leprae*. *J. Infect. Dis.* 182(5), 1463-72, Nov 2000.

Save MP, Shetty VP, Antia NH. Intracellular localization of dapsone and rifampicin in skin and nerves of multidrug treated leprosy patients. *Indian J. Lepr.*; 67, 273–284, 1995.

Saxena U, Misra RS, Ramesh V. Treatment of paucibacillary leprosy. *Int. J. Dermatol.*; 32, 135–137, 1993.

Saxena U, Ramesh V, Misra RS, Mukherjee A. Nodularity of nerves in treated leprosy. *Int. J. Dermatol.*; 2, 497–499, 1990.

Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of Inducible Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Borderline Leprosy Lesions. *British Journal of Dermatology*. 145, 809-815, 2001.

Seilheimer B, Persohn E, Schachner M. Neural Cell Adhesion Molecule Expression is Regulated by Schwann Cell-Neuron Interactions in Culture. *J. Cell Biology*. 108, 1909-1915, May 1989.

Spierings E, De Boer T, Wieles B, Adams LB, Marani E, Ottenhoff THM. *Mycobacterium leprae*-Specific, HLA Class II-Restricted Killing of Human Schwann Cells by CD4⁺ Th1 Cells: A Novel Immunopathogenic Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. *The Journal of Immunology*. 166, 5883-5888, 2001.

Waters MFR. Distinguishing Between Relapse and Late Reversal Reaction in Multidrug (MDT)-Treated BT Leprosy. *Lepr. Rev.* 72, 337-44, 2001.

9. ANEXOS.

Anexo 1

MANUAL PARA O CONTROLE DA HANSENÍASE

A classificação de Ridley e Jopling

A classificação proposta por Ridley e Jopling, em 1962, foi originalmente planejada para fins de pesquisa. Em 1966, ela foi desenvolvida para um sistema de cinco grupos que expressava a imunidade do paciente, já que é a resposta imunológica que determina o espectro da doença e o prognóstico.

Os grupos originalmente propostos sofreram algumas modificações e os agora recomendados por Ridley são: 1) Indeterminado (I), primeiro e segundo estágio; 2) tuberculóide (TT); 3) "borderline" tuberculóide (BT); 4) "borderline" central (BB); 5) "borderline" lepromatoso (BL) e 6) lepromatoso (LL).

Indeterminada (I)

Lesões indeterminadas de primeiro estágio. A infecção com um número pequeno de bacilos da hanseníase não produzirá uma resposta visível no paciente e nenhuma lesão se manifestará. Se a sua resposta imunológica for suficientemente boa para detectar e destruir os bacilos antes da multiplicação ocorrer, o paciente desenvolverá imunidade e nunca terá a doença. Se a resposta imunológica não for tão boa, um grupo de bacilos se estabelecerá e se multiplicará a ponto de poder ser detectado. Formar-se-á uma lesão mas,

como os bacilos são poucos e a hipersensibilidade ainda não se desenvolveu, a resposta será branda, não específica e, do ponto de vista da classificação, indeterminada. A lesão, provavelmente, também será autocurável. Se o sistema imunológico do paciente for menos eficaz, os bacilos continuarão a se multiplicar, antes de serem detectados imunologicamente, e a doença não será autocurável. Se a imunidade for muito baixa, os bacilos se disseminarão antes de serem detectados.

O teste de Mitsuda produz, geralmente, uma reação fraca e é de pouca ajuda. As lesões múltiplas sempre indicam baixa imunidade.

Lesões indeterminadas de segundo estágio

Quando a doença está um pouco mais avançada, suas características se tornam clinicamente aparentes pelo tamanho e distribuição das lesões, a natureza de suas bordas, o grau do eritema e as sutis alterações sensoriais.

Essas características são consequência, principalmente, da vascularização e de infiltrações não específicas, nenhuma das quais é de muito valor para a classificação histológica que depende de haver um granuloma. No estágio precoce, portanto, a classificação histológica depende da boa seleção do local da biópsia e também dos cortes seriados para encontrar um grupo de células granulosas; mesmo assim, a biópsia pode ser histologicamente indeterminada, ainda que o paciente seja classificável clinicamente. Neste estágio, o teste de Mitsuda ajuda a classificação clínica.

Tuberculóide (TT)

Corresponde, essencialmente, à forma fixa tuberculóide estável da classificação de Madri. Histologicamente é um granuloma epitelióide com um número significativo de linfócitos, contendo células gigantes de todos os tipos, mas sem comprometimento da área clara subepidérmica. Pode haver erosão extensa da epiderme, caseificação central das fibras nervosas da derme ou espessamento maciço de um feixe nervoso. O índice bacteriológico em exame histológico para bacilos álcool-acidorresistentes (BAR) no granuloma é 0-1. Esta forma é imunologicamente estável e o teste de Mitsuda, positivo: 3 + .

"Borderline" tuberculoide (BT)

Nesta forma existem, relativamente, poucas lesões cutâneas que se assemelham muito às lesões TT, mas tendem a ser mais simétricas. Comumente há envolvimento dos nervos e podem ocorrer danos, silenciosamente ou durante uma reação. O índice bacteriológico no exame histológico é 0-2^{1/2}, (no granuloma BAR). A reação da lepromina (Mitsuda): 2+ ou 1+.

"Borderline" central (BB)

As lesões cutâneas são mais numerosas e salientes em forma de placas, às vezes cupuliformes com áreas faviformes. Há muito pouco envolvimento dos nervos. Histologicamente, a aparência é a de um granuloma epitelióide, sem células gigantes, e com uma zona clara subepidérmica. O índice bacteriológico no exame histopatológico é 3-4^{1/2}. A reação de Mitsuda: negativa ou ligeiramente positiva.

"Borderline" lepromatosa (BL)

Nestas formas as lesões cutâneas são inúmeras e apresentam uma variedade de aspectos: as bordas algo indefinidas, tendendo a ser brilhantes. Os troncos nervosos acham-se assimetricamente espessados. Histologicamente, a aparência é a de um granuloma macrofágico com algumas células vacuolizadas; a zona subepidérmica é clara. Os esfregaços são sempre positivos nas lesões, mas podem ser negativos em outras partes da pele. O índice bacteriológico no exame histológico é 4-5'/2. A reação de Mitsuda: negativa.

Lepromatosa (LL)

Forma correspondente à lepromatosa na classificação de Madri. Histologicamente há um granuloma macrofágico sem células epitelióides; pode ou não haver células vacuolizadas; há uma zona livre subepidérmica. Os nervos podem se apresentar normais ou com um ligeiro espessamento. No exame bacteriológico os casos são altamente positivos e no imunológico, estáveis, ou seja, negativos ao teste de Mitsuda.

Devido à importância para a saúde pública das formas multibacilares, apresentam-se, a seguir, descrições mais específicas das formas de hanseníase lepromatosa polar (LLp) e lepromatosa subpolar (LLs).

A hanseníase lepromatosa polar clássica ((LLp) é bem reconhecida onde quer que a doença ocorra; as lesões apresentam uma evidente simetria bilateral. As lesões cutâneas são numerosas, com superfícies eritematosas lisas e brilhantes, e não são nem anestésicas nem anidróicas. Os casos detectados cedo podem ter numerosas pequenas máculas hipopigmentadas ou

pápulas com bordas indefinidas; os nervos podem estar ligeiramente espessados nesse estágio havendo, freqüentemente, envolvimento significativo da mucosa nasal. Com o tempo, desenvolvem-se placas e nódulos, a pele se espessa progressivamente e as infiltrações lepromatosas aumentam de espessura. Os lóbulos das orelhas aumentam e as linhas do rosto tomam-se marcadas e aprofundadas - é a "face leonina" característica. Os lábios muitas vezes incham e os supercílios e cílios se rarefazem. São comuns a irite e a queratite. Podem ocorrer obstrução nasal e a deformidade denominada nariz em sela. Freqüentemente, os gânglios linfáticos se enfartam e os testículos se infiltram podendo, mais tarde, se atrofiar. A danificação dos nervos dérmicos resulta em uma anestesia progressiva tipo luva-e-meia e, mais tarde na perda da sensibilidade ao tato, à dor e à temperatura na maior parte do corpo, exceto na área pilosa do couro cabeludo e nas dobras. Numerosos bacilos acham-se presentes nas lesões cutâneas e na mucosa nasal, assim como em outros locais. A hanseníase LL clássica pode ser a primeira a se manifestar; entretanto, em alguns pacientes lepromatosos, provavelmente em todas as raças mas, mais comumente, nas do sudeste da Ásia, existem indícios de que a doença se originou como hanseníase "borderline" e, por falta de tratamento, evoluiu para a forma lepromatosa. Hoje, esses pacientes são classificados como lepromatosos subpolar (LLs).

A aparência da maioria dos pacientes LLs muito se assemelha à dos casos lepromatosos polares. Entretanto, muitos deles informam que meses ou anos antes de começarem a aparecer as pápulas e o espessamento da pele, haver observado uma área dormente ou uma lesão anular. Através de uma inspeção cuidadosa outras lesões podem ser encontradas, e sua semelhança

às diferentes formas de lesões "borderline", significa estarem numa posição menos extremada do espectro. Como na hanseníase LLp, a maioria dos nervos de predileção acham-se ligeira e simetricamente espessados mas um, ou até mesmos dois nervos, podem estar muito espessados e a lesão pode ser suficientemente séria para resultar em mão em garra ou pé caído.

Tanto na forma LLp como na LLs, a reação da lepromina (Mitsuda) é negativa.

Classificação para programas de controle

A nova abordagem para o controle da hanseníase utilizando a poliquimioterapia resultou em algumas mudanças inevitáveis da terminologia. No entanto, deve-se assinalar que não houve intenção de formular outro sistema de classificação, mas somente um método sistemático de agrupar os pacientes para a quimioterapia, a qual é, na realidade, um tratamento antibacteriano especificamente dirigido contra o *Mycobacterium leprae*.

Nesse contexto, a doença é hoje classificada quer como hanseníase multibacilar, quer como hanseníase paucibacilar. A terminologia descritiva utilizada é uma definição de trabalho, ou seja, uma base para a ação. Conseqüentemente, deve ela ser julgada de conformidade com sua aplicabilidade prática e não pelo seu grau de perfeição.

Hanseníase paucibacilar

A hanseníase paucibacilar inclui somente os casos com baciloscopia negativa, indeterminados (I), os tuberculóides (TT) e os "borderline" tuberculóides (BT), na escala de Ridley e Jopling, ou casos indeterminados (I) e tuberculóides (T), na classificação de Madri. Qualquer caso que pertença a um desses tipos, mas que mostre esfregaço positivo, deve ser classificado como multibacilar para os programas de poliquimioterapia.

Hanseníase multibacilar

A hanseníase multibacilar inclui todos os casos "borderline" de centro (BB), "borderline" lepromatosos (BL) e lepromatosos (LL) da classificação de

Ridley e Jopling ou casos "borderline" (B) e lepromatosos (L) na de Madri, assim como quaisquer outros tipos quando o esfregaço for positivo.

Anexo 2.

O teste de Mitsuda

O teste de Mitsuda não é uma prova de diagnóstica para a hanseníase. Contudo, pode ser útil na classificação de um paciente, uma vez feito o diagnóstico. Descrito pela primeira vez por Mitsuda, em 1919 o teste consiste na injeção, por via intradérmica, de um preparado de tecido leproso conhecido como lepromina, emulsionado e autoclavado e padronizado de acordo com o conteúdo de *Mycobacterium leprae* mortos.

O número normal de bacilos álcool-ácido resistentes (BAR) numa mitsudina tipo integral varia entre $4,0 \times 10^7$ e $1,6 \times 10^8$ BAR por ml. A mitsudina pode ser preparada de tecido de lesões cutâneas lepromatosas, tais como nódulos de pacientes humanos - mitsudina H -, ou de tecido de tatus infectados experimentalmente - mitsudina T. A mitsudina T tende a dar uma reação ligeiramente mais forte que a mitsudina H. Para estudos práticos recomenda-se a mitsudina T (40 milhões de bacilos por ml). Ela deve ser armazenada em geladeira a 4 °C.

Para executar o teste, injetar intradermicamente, 0,1 ml de mitsudina na face flexora do antebraço, utilizando uma agulha hipodérmica calibre 0,25. Para fins operacionais, deve-se utilizar, como rotina, um local padronizado, por

exemplo, 3 cm abaixo da dobra do cotovelo na face flexora do antebraço esquerdo. Isso evitará confusão quando o resultado do teste for lido após quatro semanas, particularmente quando o agente de campo que for fazer a leitura não for a mesma pessoa que injetou a lepromina. A reação de Fernandez é lida 48 a 72 horas depois, tal como a reação de tuberculina.

A reação tardia de Mitsuda é lida com 21 a 30 dias, utilizando uma régua milimetrada para medir o diâmetro mais longo e o perpendicular da endureção, e os resultados são anotados na ficha. Se houver endureção esse fato também será registrado.

Os critérios adotados para o agrupamento dos resultados são os seguintes:

O	sem endureção
$\pm$	endureção inferior a 3 mm
1 +	nódulo de 3 a 5 mm
2+	nódulo de 6 a 10 mm
3 +	nódulo > 10 mm ou com ulceração.

A letra U deve ser adicionada ao tamanho para indicar ulceração.

Anexo 3

Técnica de avaliação da sensibilidade com estesiômetro

Antes de iniciar o teste, retire os monofilamentos do tubo e encaixe-os cuidadosamente no furo lateral do cabo. Disponha-os em ordem crescente do mais fino para o mais grosso. (Figura A-1)

Figura A-1 Suporte dos monofilamentos

Segure o cabo do instrumento de modo que o filamento de nylon fique perpendicular à superfície da pele, a uma distância de ± 2 cm. A pressão na pele deve ser feita até obter a curvatura do filamento sem permitir que o mesmo deslize sobre a pele (Figura A-2).

Figura A-2 – Uso do monofilamento

- O teste com o monofilamento mais fino 0,05 g (verde). Na ausência de resposta, utilize o monofilamento 0,2g (azul) e assim sucessivamente.
- Aplique os filamentos de 0,05g (verde) e 0,2(azul) 3 vezes em seguida em cada ponto específico, os demais 1 vez.
- Repita o teste, em caso de dúvida.
- Aplique o teste nos pontos específicos dos nervos, conforme esquema a seguir (Figura A-3).

- Registre o teste, colorindo os pontos específicos com a cor correspondente ao primeiro monofilamento que o paciente sente, conforme legenda L-1

Figura A-3 – Pontos que devem ser testados com estesiômetro.

Considera-se grau zero de incapacidade a presença de resposta positiva aos filamentos 0,05g (cor verde) ou 0,2g (cor azul), ou ainda 2,0g (cor violeta).

Considera-se grau 1 de incapacidade ausência de resposta aos filamentos igual ou maior a 2,0g (Violeta).

Legenda L-1

Legenda:		Cada filamento corresponde a um nível funcional representado por uma cor.
Verde		0,05g - sensibilidade normal na mão e no pé
Azul		0,2g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - Dificuldade para discriminar textura (tato leve)
Violeta		2,0g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
Vermelho (fechado)		4,0g - perda da sensibilidade protetora da mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
Vermelho (marcar com x)		10g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
Vermelho (circular)		300g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
Preto		- sem resposta. Perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

Anexo 4

Tabela A-1 Graus de incapacidades.(Anexo 4)

Graus	Mão	E D	Pé	E D	Olho	E D
0	Nenhum sinal e/ou sintoma		Nenhum sinal e/ou sintoma		Nenhum sinal e/ou sintoma	
1	Anestesia		Anestesia		Sensibilidade corneana diminuída ou ausente	
2	Úlceras, garras, mão caída, reabsorções e outros		Úlceras, garras, pé caído, reabsorções e outros		Lagofthalmo ectrópio, opacidade, acuidade visual menor que 0,1, e outros	

Anexo 5

O material foi coletado dos dois lóbulos auriculares, cotovelos, joelhos e lesões processado e colorado pela técnica histoquímica de Ziehl-Nilssen e analisado em microscópio de luz.

Tabela A-2-. Escala do índice baciloscópico.(Anexo 5)

ÍNDICE	ACHADO	PROCEDIMENTO
IB=0	nenhum bacilo em 100 campos microscópicos examinados ou no total do esfregaço	examinar 100 campos ou total do esfregaço
IB=1+	1 – 10 bacilos em 100 campos microscópicos examinados	examinar 100 campos microscópicos
IB=2+	1 – 10 bacilos em 10 campos microscópicos examinados	examinar 100 campos microscópicos
IB=3+	1 – 10 bacilos em média em cada campo microscópico examinado	examinar 100 campos microscópicos
IB=4+	10 – 100 bacilos em média em cada campo microscópico examinado	examinar 25 campos microscópicos
IB=5+	100 – 1000 bacilos em média em cada campo microscópico examinado	examinar 25 campos microscópicos
IB=6+	mais de 1000 bacilos em cada campo microscópico examinado.	examinar 25 campos microscópicos

IB – índice bacilar

Anexo 6

Planilha da casuística.

Número do paciente	Idade	cor	sexo	Duração da lesão (meses)	Clínica de Ridley-Joplin	Número de lesões de pele	Índice bacilos-cópico	Reação de Mistuda	Histopatologia	Número de lesões neurais	Grau de incapacidade	Expressão da integrina β -1	Expressão da proteína S-100
2	75	branco	F	12	DT	2	0	6	C	0	0	2	2
3	39	branco	F	12	I	1	0	4	I	0	0	0	0
7	49	pardo	M	2	DT	6	0	12	C	2	2	1	1
8	59	pardo	M	6	VV	50	5	0	M	8	2	0	0
9	55	pardo	M	4	TT	1	0	8	G	0	0	1	1
10	48	pardo	M	12	DT	4	0	9	C	0	0	0	0
11	53	pardo	F	5	TT	1	0	5	G	0	0	2	3
13	60	branco	M	6	VV	50	4	0	M	9	1	2	2
14	46	branco	F	12	DT	4	0	9	C	0	0	0	0
15	60	branco	M	12	I	1	0	5	I	2	2	1	2
16	79	branco	M	3	DT	11	0	0	C	6	2	1	1
17	45	branco	M	12	DT	10	0	6	C	0	0	0	0
18	26	pardo	M	8	VV	50	5	0	M	1	1	0	3
20	58	pardo	F	2	I	1	0	10	I	1	1	0	0
21	53	branco	F	6	I	1	0	6	I	0	0	2	3
22	60	negra	F	6	DT	25	0	11	C	5	2	1	2
23	52	branco	F	24	TT	1	0	5	G	0	0	2	2
24	65	branco	F	36	TT	1	0	5	G	0	0	1	3
25	25	pardo	M	12	I	1	0	5	I	0	0	2	2
26	33	pardo	F	16	DT	16	0	4	C	3	2	0	2
27	74	branco	M	4	TT	1	0	5	G	0	0	1	1
28	48	branco	F	3	DT	22	0	5	C	9	2	1	1
30	43	pardo	M	24	DV	50	1,5	0	C	0	0	1	1
32	64	pardo	F	24	DT	14	0	0	C	2	1	1	2
33	49	pardo	M	2	I	1	0	0	I	0	0	0	0
36	70	branco	M	12	DD	12	2	0	C	6	2	0	0
38	33	pardo	M	12	DD	10	2	0	C	0	0	1	1
41	57	pardo	M	120	TT	1	0	15	G	0	0	0	1
43	54	branco	M	24	VV	50	4	0	M	2	2	0	0
47	35	branco	F	120	I	1	0	4	I	1	1	0	0
48	53	pardo	F	36	I	1	0	6	I	1	1	0	0
50	40	branco	F	36	DT	3	0	0	C	0	0	0	0
53	17	branco	M	36	I	1	0	5	I	0	0	0	0
55	56	branco	F	4	TT	1	0	6	G	0	0	0	0
58	44	branco	F	12	DT	1	0	8	C	8	1	0	2
59	24	pardo	M	24	I	1	0	0	I	0	0	0	1
60	69	branco	F	36	DT	30	0	4	C	3	1	0	0
61	28	pardo	F	10	DV	10	3	0	C	3	1	0	3
62	21	pardo	M	1	DT	1	0	9	C	0	0	0	0

Número do paciente	idade	cor	sexo	Duração da lesão (meses)	Clínica de Ridley-Joplin	Número de lesões de pele	Índice bacilos-cópico	Reação de Mistuda	Histopatologia	Número de lesões neurais	Grau de incapacidade	Expressão da integrina β -1	Expressão da proteína S-100
63	53	pardo	M	8	DT	1	0	7	C	0	0	0	0
64	26	pardo	M	1	DT	9	0	7	C	2	1	0	0
66	17	pardo	M	12	DT	1	0	7	C	0	0	0	0
69	52	branco	F	24	I	1	0	3	I	1	1	0	0
71	42	pardo	M	2	I	1	0	0	I	0	0	0	1