MARCIA LANZONI DE ALVARENGA

**Caracterização da resposta imune *in situ* nas lesões de
hanseníase indeterminada**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Irma
Seixas Duarte

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alvarenga, Marcia Lanzoni de

Caracterização da resposta imune *in situ* nas lesões de hanseníase indeterminada / Marcia Lanzoni de Alvarenga. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Maria Irma Seixas Duarte.

Descritores: 1.Hanseníase paucibacilar 2.Células dendríticas 3.Células apresentadoras de antígenos 4.Fator XIIIa 5.Células Th2

USP/FM/DBD-217/15

Aos meus pais:

Meu pai, meu ídolo como pai, pessoa e pesquisador.

Minha mãe, que representa para mim a força com delicadeza e o
amor incondicional.

Meu marido, que admiro com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dra Maria Irma Seixas Duarte, que esteve sempre disponível e entusiasmada. Que contribuiu com raciocínios brilhantes que não conhecia e me fez enxergar novas maneiras de pensar. Que me ensinou imunologia e patologia com paixão. Que me deu conselhos pessoais e profissionais. Por ter me dado a oportunidade de fazer esta tese, que foi importante para meu amadurecimento na vida pessoal e profissional.

Ao Prof^o Dr Raul Negrão Fleury (*in memoriam*) que permitiu meu acesso ao laboratório de Patologia do Hospital Lauro de Souza Lima e ao seu material, sem os quais não seria possível a realização desta tese. Por ter se interessado no meu estudo e me estimulado, ensinando hanseníase pelo período de uma semana que lá fiquei. É imortal aquele que divulga conhecimentos, planta ideias e forma admiradores.

À Prof^a Dra Mirian Nacagami Sotto, por servir de exemplo como uma verdadeira mentora, por ter me ensinado dermatopatologia, por ter me apresentado à Dra Maria Irma, e ainda por conselhos pessoais e profissionais.

Ao Prof^o Dr Heitor Franco de Andrade Jr, que fez inúmeras análises estatísticas com muita paciência, que constituíram o cerne de todo o estudo.

A Prof^o Dr Gil Benard, Prof^a Dra Neusa Yuriko Sakai Valente e prof^o Dr Heitor Franco de Andrade Jr, que fizeram contribuições importantes na banca de qualificação. Em especial à Dra Neusa, que me ensinou também dermatopatologia.

À Dra Carla Pagliari por ter me ajudado com análises estatísticas, relatórios, reações imuno-histoquímicas, orientações e conselhos.

À Aline Alves de Lima Silva, por ter me auxiliado na contagem das marcações, pela ajuda na montagem de figuras, pelas reações imuno-histoquímicas, pelo apoio emocional em momentos de desespero e por estar sempre pronta a ajudar.

À Andrea de Faria Fernandes Belone, que permitiu o uso das informações de prontuário, além da liberação de blocos e lâminas do laboratório de Patologia do Hospital Lauro de Souza Lima, sempre de maneira prestativa e simpática.

Ao Wellington Luiz Ferreira da Silva, por suas reações imuno-histoquímicas e por ter me ensinado a usar o *software* de análise de imagens.

À Rosana Cardoso, pela presteza no agendamento dos encontros com a Dra Maria Irma, pelas orientações nos procedimentos com as diversas etapas da tese, além do carinho e simpatia.

À Cleusa Fumica Hirata Takakura por ter me ajudado a tirar fotos, pelo incentivo e apoio carinhoso.

À Monica Rebeca Kauffman e Luciane Kanashiro Galo, do laboratório de Patologia de Moléstias Transmissíveis, pela recepção sempre simpática.

Ao Thiago Rezende por todas as orientações da sequência da tese, sempre com muita prontidão.

Aos patologistas do laboratório de Patologia do Hospital Lauro de Souza Lima, cujos diagnósticos histopatológicos foram essenciais a este estudo.

Aos funcionários do arquivo e de secretaria do laboratório de Patologia do Hospital Lauro de Souza Lima, que levantaram blocos e lâminas, além de prontuários dos casos usados

À Universidade de Taubaté, por ter me concedido horas para que eu pudesse me dedicar a este estudo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por auxílio financeiro número 2011/06778-8, que possibilitou a realização de reações imuno-histoquímicas.

Aos familiares, amigos e colegas de profissão, por compreender os momentos de ausência e pelo incentivo.

Ao meu marido, pelo apoio e incentivo em todas as etapas, emocional e logístico, além da ajuda com informática. Por ter sido compreensivo. Por ser uma referência de calma nos momentos de nervosismo.

Se porventura me esqueci de alguém, peço sinceras desculpas pela falha, já que a memória se encontra um pouco comprometida após este trabalho extenso.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals 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 da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Epidemiologia.....	3
1.2 O agente	7
1.3 Porta de entrada/transmissão do <i>M. leprae</i>	9
1.4 Reservatório de infecção.....	11
1.5 Classificação de Ridley e Jopling.....	12
1.5.1 Hanseníase tuberculoide (HT).....	12
1.5.2 Hanseníase virchowiana (HV)	13
1.5.3 Hanseníase dimorfa (HD)	13
1.6 Hanseníase indeterminada (HI)	14
1.7 Forma neurítica pura.....	15
1.8 Reações hansênicas	16
1.8.1 A reação tipo 1 é uma resposta imune do tipo hipersensibilidade tardia e ocorre geralmente em pacientes dimorfos	16
1.8.2 A reação tipo 2 é uma resposta inflamatória sistêmica cuja patogênese se associa à deposição de imunocomplexos.....	16
1.9 Diagnóstico da hanseníase segundo a OMS	17
1.10 Índice bacteriológico ou índice bacilar (IB)	18
1.11 Reação de Mitsuda	19
1.12 Aspectos histológicos e moleculares das lesões	20
1.13 Patogênese, resposta imune do hospedeiro e influências genéticas.....	22
1.13.1 Resposta inata	22
1.13.1.1 Receptores do <i>M. leprae</i> nas células dendríticas	23
1.13.1.1.1 Receptores lectina tipo C (cálcio dependente):	23
1.13.1.1.2 Receptores <i>toll-like</i> (TLR)	24

1.13.1.1.3 Receptores de complemento.....	25
1.13.1.2 Células <i>Natural killer</i> (NK)	25
1.13.1.3 Células dendríticas (DC) / células apresentadoras de antígenos (APC)	26
1.13.2 Resposta adaptativa/adquirida celular.....	28
1.13.3 Resposta imune reguladora	30
1.13.4 Resposta adaptativa humoral.....	32
1.13.5 Interação bacilo-células de Schwann	32
1.13.6 Influência genética na resposta imune/alterações genéticas na hanseníase.....	33
1.14 Justificativa.....	33
2 OBJETIVO	37
3 MÉTODOS	41
3.1 Casuística	41
3.2 Análise semiquantitativa dos aspectos histológicos.....	42
3.3 Método imuno-histoquímico para determinação do fenótipo das células, citocinas e moléculas	43
3.4 Análise quantitativa das células inflamatórias, citocinas e moléculas imunomarcadas na derme	46
3.5 Análise quantitativa de CD1a	47
3.6 Análise semi-quantitativa da expressão de BCG nas lesões	47
3.7 Distribuição da casuística	48
3.8 Análise estatística	48
4 RESULTADOS.....	51
5 DISCUSSÃO	67
5.1 Revisitação dos aspectos histológicos da HI.....	67
5.1.1 O infiltrado inflamatório na HI	67
5.1.2 O bacilo nas lesões de HI.....	68
5.1.3 A epiderme e a HI	69
5.1.4 Melanófagos e melanócitos na HI	70
5.2 A reação de Mitsuda	71
5.3 Caracterização do ambiente celular e citocínico da HI.....	71
5.3.1 Células dendríticas/apresentadoras de antígenos (CD1a, FXIIIa, CD123, S100 e CD68)	72
5.3.1.1 Dendrócitos dérmicos positivos para FXIIIa	72
5.3.1.2 Células de Langerhans.....	73

5.3.1.3 Células dendríticas plasmocitoides	74
5.3.1.4 Células dendríticas CD68+ e S100+	74
5.3.2 Linfócitos T CD4 e CD8.....	75
5.3.3 TLR-2 e TLR-4	75
5.3.4 iNOS.....	76
5.3.5 Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 10 (IL-10)	76
5.3.6 TGF- β	77
5.3.7 IL-2r.....	78
5.3.8 Foxp3 - Resposta reguladora da inflamação.....	78
5.3.9 IL-12 e IL-6	79
5.3.10 IFN- γ	80
5.3.11 TNF- α	80
5.3.12 IL-1 β	81
5.3.13 CD57	81
5.3.14 Granzima B	82
5.3.15 IL-18	82
5.3.16 IL-8	82
5.4 Limitações do estudo.....	83
6 CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS.....	91
8 APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células Apresentadoras de Antígeno
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
C	complemento
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDP	células dendríticas plasmocitoides
CL	Células de Langerhans
CLA	antígeno leucocitário comum
DC	Células Dendríticas
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule-grabbing nonintegrin</i>
DD	Forma dimorfa dimorfa
DDFXIIIa	dendrócitos dérmicos positivos para FXIIIa
DT	Forma dimorfa tuberculoide
DV	Forma dimorfa virchowiana
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
FXIIIa	fator XIIIa
HD	Hanseníase dimorfa
HI	Hanseníase indeterminada
HLA	antígeno leucocitário humano
HLSL	Hospital Lauro de Souza Lima
HT	Hanseníase tuberculoide
HV	Hanseníase virchowiana
IB	Índice Bacteriológico ou Índice Bacilar
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
IIM	Infiltrado Inflamatório Mononuclear
IL	interleucina
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
LAM	Lipoarabinomanan

LM	Lipomanan
LPS	lipopolissacarídeo
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MB	Multibacilares
MH	Mal de Hansen
MS	Ministério da Saúde
NK	Células Natural <i>Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilares
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDIM	<i>Mycocerosoic Acids of Phthiocerol Dimycocerosates</i>
PG E2	Prostaglandina E2.
PGL	Glicolípido Fenólico
PIM	Fosfatidilinositol Manosídeo
PL	Fosfolipídeos
RM	Reação de Mitsuda
TGF- β 1	fator de crescimento transformador beta 1
Th	T helper
TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
TMD	Tratamento com Múltiplas Drogas
TMM	Trehalose Monomycolates
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
T-reg	T Reguladoras
TT	Forma tuberculoide
VV	Forma virchowiana

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tendência da incidência de hanseníase em 16 países que reportaram mais de 1000 casos em 2012, e número de novos casos reportados anualmente, desde 2005.....	5
Tabela 2 -	Semiquantificação das alterações epidérmicas e dérmicas vistas à coloração de hematoxilina/eosina em 15 casos de hanseníase indeterminada.....	42
Tabela 3 -	Especificações dos anticorpos usados nas reações imuno-histoquímicas.	46
Tabela 4 -	Casos de hanseníase indeterminada selecionados para o estudo - dados demográficos e resultado de reação de Mitsuda.....	51
Tabela 5 -	Análise semiquantitativa das alterações histológicas em 15 casos de HI corados por hematoxilina e eosina.....	54
Tabela 6 -	Resultado da pesquisa de bacilos por coloração de Fite-Faraco em 15 casos de hanseníase indeterminada.....	54
Tabela 7 -	Resultado da pesquisa de antígeno bacilar (por técnica de Fite-Faraco ou imuno-histoquímica anti-BCG) dos 15 casos de HI.....	55
Tabela 8 -	Contagem dos marcadores celulares, citocínicos e moleculares <i>in situ</i> nas lesões de pele de 15 casos de hanseníase indeterminada	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes no mundo no começo de 2011.....	4
Figura 2 -	Incidência de casos de hanseníase por 100.000 habitantes no mundo em 2011.	4
Figura 3 -	Coeficiente de prevalência de hanseníase por estado (à esquerda) e por município (à direita) no Brasil referentes ao ano de 2012.	6
Figura 4 -	Coeficiente de detecção de hanseníase por 100.000 habitantes por estado (à esquerda) e município (à direita) no Brasil em 2012.	6
Figura 5 -	Coeficientes de prevalência e detecção de hanseníase em 10.000 habitantes de 1990 a 2010.	7
Figura 6 -	Modelo esquemático da parede celular do <i>M. leprae</i>	9
Figura 7 -	Esquema da história natural da hanseníase.	15
Figura 8 -	Esquema de representação de receptores de células dendríticas relevantes para a ligação com <i>M. leprae</i>	25
Figura 9 -	Sequência de contagem das células, citocinas e moléculas marcadas na derme.	47
Figura 10 -	A e B: Discreta alteração vacuolar da camada basal e exocitose de linfócitos nos casos 2 e 3, aumentos de 400x e 200x, respectivamente. C e D: presença de melanófagos na derme papilar nos casos 3 e 1, aumentos de 200x e 400x, respectivamente.	52
Figura 11 -	A: Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular superficial e neural, caso 7, aumento de 200x. B: Detalhe (400x) do infiltrado inflamatório neural do caso 7. C: Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular profundo, caso 11, aumento de 200x.	53
Figura 12 -	Pele com infiltrado inflamatório mononuclear moderado perineural e intraneural, com delaminação do perineuro, caso 7, aumento de 400x.	53
Figura 13 -	Marcação imuno-histoquímica positiva para BCG em nervos do caso 10. A: aumento de 200x, B: aumento de 400x.....	55

Figura 14 - Análise estatística da correlação de pesquisa de antígeno bacilar entre os grupos de reação de Mitsuda positiva e negativa dos 15 casos de HI.	56
Figura 15 - Frequência de casos positivos para os imunomarcadores celulares, citocínicos e moleculares.	57
Figura 16 - Análise gráfica da quantificação dos fenótipos celulares marcados por reação imuno-histoquímica em lesões de pele de hanseníase indeterminada.	58
Figura 17 - Marcação imuno-histoquímica das células mais numerosas nas lesões de HI, aumento de 200x. A: CD4 no caso 12. B: CD8 no caso 7. C: Fator XIIIa no caso 6.	59
Figura 18 - Análise gráfica da quantificação de citocinas e moléculas marcadas por reação imuno-histoquímica em lesões de pele de hanseníase indeterminada.	59
Figura 19 - Comparação da média de quantidade de expressão de A) CD4, B) CD8, C) TLR-4 e D) IL-1 entre os grupos de pesquisa antigênica (pesq ag) negativa (0) e positiva (1).	60
Figura 20 - Comparação da média de quantidade de expressão de A) CD4, B) CD8, C) TLR-4 e D) IL-1 entre os grupos de reação de Mitsuda negativa (0) e positiva (1).	61
Figura 21 - Comparação da quantidade de células FXIIIa/mm ² entre HI e pele normal.	62
Figura 22 - Imunomarcacão de células positivas para FXIIIa (400x), A: caso 3, B: pele normal.	62
Figura 23 - Comparação da fração de área epidérmica positiva para CD1a entre pele normal e pele com HI.	63
Figura 24 - Imunomarcacão de células positivas para CD1a (400x): A: caso 8, B: pele normal.	63

RESUMO

Alvarenga ML. *Caracterização da resposta imune in situ nas lesões de hanseníase indeterminada* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A forma indeterminada é a fase inicial da hanseníase, que se caracteriza histologicamente pelo infiltrado inflamatório leve, não granulomatoso, de linfócitos e histiócitos ao redor de vasos, anexos e nervos. No local de entrada do *M. leprae*, as células apresentadoras de antígeno do tipo células dendríticas são as primeiras a encontrar o bacilo. Este, no interior de células dendríticas, desencadeia a produção local de citocinas e quimiocinas, que resultam em proliferação de linfócitos T *helper* 1 ou T *helper* 2, assim definindo uma resposta imune celular ou humoral, respectivamente. As lesões tuberculoides mostram predominância das citocinas de padrão Th1 como IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-18, enquanto que nas lesões virchowianas predominam citocinas de padrão Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β . Na pele, as principais células dendríticas são células dendríticas mieloides, células de Langerhans e alguns dendrócitos dérmicos. São identificadas respectivamente pela expressão imuno-histoquímica de S100, CD1a e Fator XIIIa. Células de Langerhans e dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos estão aumentados em quantidade nas lesões tuberculoides quando comparadas com lesões virchowianas. Os objetivos do presente estudo foram: 1) caracterizar a inflamação “in situ” na hanseníase indeterminada através da quantificação das marcações imuno-histoquímicas de: CD57, CD4, CD8, CD1a, S100, FXIIIa, CD68, Foxp3, CD123, IL-1, IL-2r, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , iNOS, granzima B, receptor Toll-like 2/4, e antígeno BCG, 2) comparar o perfil fenotípico e citocínico das lesões na hanseníase indeterminada entre grupos de reação de Mitsuda positiva e negativa, a fim de investigar se existem padrões que possam prever para qual forma a doença evoluiria, e 3) revisar a histopatologia da forma indeterminada através da análise semiquantitativa das alterações vistas à coloração de hematoxilina/eosina. Foram selecionadas 15 lesões de pacientes com hanseníase indeterminada. Foram usados grupos controles de expressão de Fator XIIIa e CD1a em 10 casos de pele normal. A histopatologia mostrou discretas alterações epidérmicas, como alteração vacuolar e exocitose de linfócitos (33% dos casos cada), apoptose de queratinócitos (26%), atrofia e acantose (06% dos casos cada); infiltrado inflamatório linfomononuclear neural (100%), perivascular superficial (100%), perivascular profundo (93%), peri-écrino (40%) e peri-folículo pilossebáceo (20%), além de melanófagos em 93% dos casos. Esses achados mostraram que nem sempre todos os ambientes estão acometidos por inflamação na histopatologia. Em 66% dos pacientes foi encontrado antígeno bacilar (por Fite-Faraco ou técnica imuno-histoquímica anti-BCG), portanto a forma indeterminada não deve ser considerada sistematicamente como paucibacilar. Não houve diferença significativa de padrões de marcadores entre os grupos

Mitsuda positivo e negativo. No microambiente inflamatório das lesões houve expressões significativas de TLR 2/4, Fator XIIIa, CD4, CD8, IL-2r, IL-4, IL-10, iNOS e TGF- β . A expressão importante de IL-4, IL-10 e TGF- β nas lesões de hanseníase indeterminada significaram tendência de resposta imune para o polo Th2, um ambiente de tolerância à permanência do bacilo. A baixa expressão de IFN- γ colaborou para a inexpressiva resposta Th1. Não houve diferença significativa na expressão de CD1a entre as lesões e pele normal. Fator XIIIa foi expresso em mais que 50 células/mm² em todos os casos, com quantidades significativamente maiores que outras células dendríticas nas lesões (S100, CD68, CD123) e que a pele normal. Estes achados demonstraram a importância dos dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos na apresentação de antígeno na fase inicial da hanseníase.

Descritores: Hanseníase paucibacilar; Células dendríticas; Células apresentadoras de antígenos; Fator XIIIa; Células Th2

ABSTRACT

Alvarenga ML. *Characterization of the in situ immune response in indeterminate leprosy lesions* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The indeterminate form is the initial stage of leprosy, which is characterized histologically by mild inflammatory infiltrate, non granulomatous, with lymphocytes and histiocytes around vessels, nerves and adnexals. When *M. leprae* enter the host, antigen-presenting cells of dendritic type are the first cells to find the bacillus. Once inside dendritic cells, the bacillus elicits local production of cytokines and chemokines, which result in proliferation of T lymphocytes helper 1 or T helper 2, thereby defining a cellular or humoral immune response, respectively. The tuberculoid lesions show predominance of Th1 cytokines such as IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12 and IL-18, whereas in the lepromatous lesions predominate cytokines of Th2 pattern such as IL-4, IL-5 IL-10 and TGF- β . In the skin, main dendritic cells are myeloid dendritic cells, Langerhans cells, and some dermal dendrocytes. They are identified respectively by immunohistochemical expression of S100, CD1a and Factor XIIIa. Langerhans cells and dermal dendrocytes Factor XIIIa positive are increased in number in tuberculoid lesions compared with lepromatous lesions. The objectives of this study were: 1) to characterize "in situ" inflammation in indeterminate leprosy through the quantification of immunohistochemical markers: CD57, CD4, CD8, CD1a, S100, FXIIIa, CD68, Foxp3, CD123, IL-1, IL-2r, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , iNOS, granzyme B, Toll-like receptor 2/4, and BCG antigen, 2) compare the phenotypic and cytokinic profile of indeterminate leprosy lesions between positive and negative Mitsuda reaction groups in order to investigate if there are patterns that can predict which way the disease may evolve, and 3) review the histopathology of the indeterminate form by semi-quantitative analysis of changes seen in hematoxylin / eosin. Fifteen lesions of patients with indeterminate leprosy were selected. There was used control groups of Factor XIIIa and CD1a expression in 10 cases of normal skin. Histopathology showed discrete epidermal changes, such as vacuolar changes and lymphocyte exocytosis (in 33% of cases each), keratinocyte apoptosis (26%), atrophy and acanthosis (in 06% of cases each); neural lymphocytic inflammatory infiltrate (100%), superficial perivascular (100%), deep perivascular (93%), peri-eccrine (40%), peri-pilosebaceous follicle (20%), and melanophages in 93% of cases. These findings showed that not always all environments are affected by inflammation in histopathology. In 66% of patients it was found bacterial antigen (by Fite-Faraco or immunohistochemical technique anti-BCG), so the indeterminate form should not be systematically considered as paucibacillary. There was no significant difference in phenotypic and cytokinic patterns between the positive and negative Mitsuda groups. In the microenvironment of inflammatory lesions there was significant expression of TLR 2/4, Factor XIIIa, CD4, CD8, IL-2r, IL-4, IL-10,

TGF- β and iNOS. The important expression of IL-4, IL-10 and TGF- β in indeterminate leprosy meant tendency to Th2 immune response pole, an environment of tolerance to permanence of bacillus. Low IFN- γ expression contributed to the negligible Th1 response. There was no significant difference in the expression of CD1a between the lesions and normal skin. Factor XIIIa was expressed as greater than 50 cells / mm² in all cases, with significantly larger quantities than other dendritic cells in lesions (S100, CD68, CD123) and than normal skin. These findings demonstrate the importance of Factor XIIIa positive dermal dendrocytes in antigen presentation at the initial stage of leprosy.

Descriptors: Leprosy; Paucibacillary; Dendritic cells; Antigen-presenting cells; Factor XIIIa; Th2 cells.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele, nervos periféricos, mucosa do trato respiratório superior e olho. É de notificação compulsória no Brasil e no mundo¹. Os subitens descritos a seguir representam tópicos relevantes para o entendimento atual da hanseníase indeterminada.

1.1 Epidemiologia

De acordo com relatórios oficiais recebidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 115 países e territórios, a prevalência global de hanseníase registrada no final do primeiro trimestre de 2013 foi de 189.018 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante 2012 foi de 232.857 (excluindo-se um pequeno número de casos na Europa), 6231 casos a mais que em 2011².

As Figuras 1 e 2 ilustram, respectivamente, as taxas de prevalência (por 10.000 habitantes) e incidência (por 100.000 habitantes) da doença no mundo, referentes a 2011.

FONTE: Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf>

Figura 1 - Prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes no mundo no começo de 2011.

FONTE: Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_DR_2011.pdf>.

Figura 2 - Incidência de casos de hanseníase por 100.000 habitantes no mundo em 2011.

É notável que 95% dos novos casos de hanseníase foram notificados por 16 países e apenas 5% pelo resto do mundo² em 2012. A Tabela 1 mostra a tendência de novos casos nesses países, onde se vê que o Brasil ocupa a segunda posição em números absolutos de novos casos no mundo, atrás da Índia.

Tabela 1 - Tendência da incidência de hanseníase em 16 países que reportaram mais de 1000 casos em 2012, e número de novos casos reportados anualmente, desde 2005.

Country – Pays	Number of new cases reported – Nombre de nouveaux cas notifiés							
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011*	2012
Bangladesh	7 882	6 280	5 357	5 249	5 239	3 848	3 970	3 688
Brazil – Brésil	38 410	44 436	39 125	38 914	37 610	34 894	33 955	33 303
China – Chine	1 658	1 506	1 526	1 614	1 597	1 324	1 144	1 206
Côte d'Ivoire	NR	976	1 204	998	884	NR	770	1 030
Democratic Republic of the Congo – République démocratique du Congo	10 369	8 257	8 820	6 114	5 062	5 049	3 949	3 607
Ethiopia – Éthiopie	4 698	4 092	4 187	4 170	4 417	4 430	NR	3 776
India – Inde	169 709	139 252	137 685	134 184	133 717	126 800	127 295	134 752
Indonesia – Indonésie	19 695	17 682	17 723	17 441	17 260	17 012	20 023	18 994
Madagascar	2 709	1 536	1 644	1 763	1 572	1 520	1 577	1 474
Myanmar	3 571	3 721	3 637	3 365	3 147	2 936	3 082	3 013
Nepal – Népal	6 150	4 235	4 436	4 708	4 394	3 118	3 184	3 492
Nigeria – Nigéria	5 024	3 544	4 665	4 899	4 219	3 913	3 623	3 805
Philippines	3 130	2 517	2 514	2 373	1 795	2 041	1 818	2 150
South Sudan – Soudan du Sud							1 799	1 801
Sri Lanka	1 924	1 993	2 024	1 979	1 875	2 027	2 178	2 191
United Republic of Tanzania – République-Unie de Tanzanie	4 237	3 450	3 105	3 276	2 654	2 349	2 288	2 528
Total (%)	279 166 (93)	243 477 (92)	237 652 (92)	231 047 (93)	225 442 (92)	211 261 (92)	210 655 (93)	220 810 (95)
Global total – Total global	299 036	265 661	258 133	249 007	244 796	228 474	226 626	232 857

FONTE: Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2013/wer8835.pdf?ua=1>>

Deve-se salientar que a doença foi considerada eliminada em nível global pela OMS no ano de 2000 (i.e. uma taxa de prevalência de menos de 1 caso por 10.000 habitantes)². No entanto, alguns países, dentre eles o Brasil, com uma prevalência de 1,42 por 10.000 habitantes em 2013³, ainda não atingiram esta taxa de eliminação em nível nacional. Entre os estados e municípios do Brasil, as taxas de prevalência e incidência são muito heterogêneas, variando de áreas consideradas hiperendêmicas a áreas sem casos (Figuras 3 e 4).

FONTE: Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/mapa_coeficiente_prevalencia_2012.pdf>

Figura 3 - Coeficiente de prevalência de hanseníase por estado (à esquerda) e por município (à direita) no Brasil referentes ao ano de 2012.

FONTE: Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/mapa_coeficiente_prevalencia_2012.pdf>

Figura 4 - Coeficiente de detecção de hanseníase por 100.000 habitantes por estado (à esquerda) e município (à direita) no Brasil em 2012.

A OMS aposta que a redução na prevalência leve a uma redução da incidência da doença², no entanto os dados referentes ao Brasil mostram achados um tanto paradoxais: queda expressiva da prevalência entre 1990 e 2000 (coincide com a implementação extensiva e oficial da terapia com múltiplas drogas no Brasil⁴) e incidência praticamente inalterada ao longo destas duas décadas (Figura 5).

FONTE: Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/mapa_coeficiente_prevalencia_2012.pdf>

Figura 5 - Coeficientes de prevalência e detecção de hanseníase em 10.000 habitantes de 1990 a 2010.

Apesar do fato de que os maiores índices de incidência e prevalência de hanseníase provenham de países subdesenvolvidos, a migração populacional e o prolongado período de incubação da doença contribuem para que os países desenvolvidos também apresentem casos da doença. Pela raridade da moléstia nestes países o diagnóstico nessas áreas é muito mais desafiador e tardio do que nas áreas endêmicas⁵. A hanseníase portanto é um desafio diagnóstico ainda maior em áreas não endêmicas e deve ser considerada como uma causa de neuropatia periférica ou de lesões cutâneas persistentes, especialmente em pacientes provenientes de países endêmicos⁶.

1.2 O agente

O *Mycobacterium leprae* é a principal espécie causadora da doença e foi descoberto por Gerhard Armauer Hansen em 1873⁷. Por isso a hanseníase

também é conhecida como mal de Hansen (MH)⁸. Han *et al.* em 2008 descreveram uma nova espécie de micobactéria, *Mycobacterium lepromatosis*, que foi associada a hanseníase virchowiana difusa, após o achado de diferenças genéticas significativas com *M. leprae*⁹. A existência de *M. lepromatosis* foi confirmada em outros estudos independentes^{10,11}.

O *M. leprae* é um microrganismo intracelular obrigatório, em formato de haste, reto ou encurvado, com 1 a 10 micrômetros de comprimento por 0,3 a 0,6 micrômetros de largura. É bacilo imóvel, não esporulado, aeróbio ou microaerófilo. Pertence à classe *Schizomycete*, ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, *Mycobacterium*¹.

Sua capacidade de resistir à descoloração quando tratado com álcool-ácido é compartilhada com outras micobactérias e é o princípio dos métodos histoquímicos para sua demonstração, onde os bacilos são corados em vermelho pela fucsina fenicada e assim permanecem (resistem) depois de descoloração subsequente por uma solução de álcool-ácido (bacilos álcool-ácido resistentes – BAAR). Este bacilo é menos álcool-ácido resistente que as outras micobactérias e os métodos habitualmente utilizados para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos (Ziehl-Neelsen) não são adequados para demonstrar bem o *M. leprae*. Para tal se utiliza o método de Fite-Faraco, descrito pelo brasileiro Faraco e aplicado e divulgado por Fite¹². Outras características deste bacilo são: não ser cultivável *in vitro*¹, ter multiplicação muito lenta⁸, e requerer para sobrevivência e proliferação temperatura entre 27 e 30 °C⁴.

Seu citoplasma contém estruturas comuns a microrganismos gram-positivos. A membrana citoplasmática tem uma dupla camada lipídica com proteínas de interação, que são antígenos proteicos de superfície⁴. É característica de micobactérias uma parede celular feita de uma camada de peptidoglicana ligada covalentemente a uma membrana externa de ácido micólico pelo polissacarídeo arabinogalactan^{13,14}. O lipoarabinomanan está envolvido na modulação da atividade bactericida do macrófago¹⁵. A cápsula, estrutura mais externa, tem lipídios como o glicolípido fenólico (PGL-1), que é específico desta espécie e estimula uma resposta de anticorpos IgM,

proporcional à carga bacilar¹⁵. A Figura 6 mostra um esquema da parede celular do *M. leprae*.

Figura 6 - Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*. TMM (trehalose monomycolates), PDIM (mycocerosoic acids of phthiocerol dimycocerosates), PGL (glicolípido fenólico, LM (lipomannan), LAM (lipoarabinomannan), PIM (fosfatidilinositol manosídeo) PL (fosfolípídeos). Copiado de Scollard *et al.*¹³.

O genoma desta bactéria é menor que o do *M. tuberculosis* (3,3 versus 4,4 megabases). Menos de 50% do seu genoma codifica genes funcionais, com 1133 genes inativos. O *M. tuberculosis* tem 90% do seu genoma codificando genes funcionais e somente seis genes inativos^{13,16}.

1.3 Porta de entrada/transmissão do *M. leprae*

O exato mecanismo de transmissão do MH não está ainda bem definido. Até recentemente a teoria mais aceita era que a doença se transmitia pelo contato entre doentes e pessoas sãs, a partir da observação de que indivíduos próximos a pacientes com hanseníase tinham uma chance maior de adquirir a doença. Posteriormente a especificação de "contato" por qualificações como

“pele a pele”, “íntimo” e “repetido” gerou a impressão de que a doença pudesse ser adquirida somente nestas condições e que a transmissão envolvesse algum tipo de “fricção” da pele do doente com a pele do indivíduo sã. Relatos do encontro de bacilo na epiderme, e mais especificamente na camada córnea, são indicadores de que a pele, mesmo íntegra, é um potencial meio de transmissão da doença^{17,18,19}. Ainda, a observação de que o bacilo é eliminado nas secreções sebácea e sudorípara, reforça a teoria da transmissão pelo contato pele a pele²⁰. Das diversas situações que promovem contato próximo, aquela entre os indivíduos de uma mesma casa é a única que é facilmente identificável. Neste ambiente o risco relativo para os contactantes é de quatro vezes em relação aos não contactantes. A incidência atual entre contactantes e o risco relativo para eles variam consideravelmente em diversos estudos²¹. O tipo da hanseníase e o índice bacteriano são os principais fatores relacionados ao paciente envolvidos neste tipo de transmissão. Quanto aos fatores relacionados aos contactantes são a proximidade e intensidade do contato e suscetibilidade herdada²².

Ultimamente a possibilidade de transmissão por via respiratória vem ganhando força. Há dados que sustentam esta hipótese, tais como (a) a demonstração de grande número de organismos em descarga nasal²³, (b) a alta proporção de bacilos morfológicamente intactos nas secreções nasais, e (c) a evidência de que o *M. leprae* pode sobreviver fora do hospedeiro humano até nove dias²⁴. Ainda, há modelos experimentais bem sucedidos, com desenvolvimento de doença em ratos imunossuprimidos contaminados por aerossóis contendo *M. leprae* e ratos “nude” que receberam aplicação tópica do bacilo na cavidade nasal. Recentemente foi detectado *M. leprae* na cavidade oral em 94% de pacientes não tratados usando técnica de imunohistoquímica anti-BCG e anti PGL-1 ou PCR com primers-específicos (MntH) para *M. leprae*. As biópsias foram obtidas de áreas normais (incluindo língua, mucosa bucal e palato mole) e de lesões visíveis em qualquer topografia. Não houve diferenças na detecção do bacilo entre multibacilares (MB) e paucibacilares (PB)²⁴. Job *et al.*¹⁹ encontraram DNA de *M leprae* por PCR em 60% dos pacientes multibacilares não tratados em *swab* nasal.

A mucosa nasal deve estar mesmo envolvida nas formas iniciais da doença. Ressalte-se que foram encontradas alterações em mucosa nasal também em pacientes na forma indeterminada, como inflamação neural, de músculo liso e achado de bacilos²⁵. Outro estudo²⁶ mostrou acometimento da mucosa nasal antes mesmo de a lesão aparecer na pele ou outros locais, como nervo, sugerindo que a via aérea pode ser o primeiro local de infecção.

Achados interessantes de Silva *et al.*²⁷ servem de embasamento para a hipótese de que as células epiteliais respiratórias constituem um nicho de sobrevivência de bactérias e possível porta de entrada do *M. leprae*, durante a infecção subclínica e fases iniciais da doença. Foi observado que o bacilo é capaz de fato de entrar em células respiratórias de vias aéreas e que, especialmente as células epiteliais pulmonares são suscetíveis à infecção durante exposição *in vivo* ao bacilo. A internalização do bacilo mostrou ser um processo passivo, dependente do citoesqueleto do hospedeiro (microtúbulos e microfilamentos de actina), uma vez que foram encontrados bacilos tanto vivos quanto mortos dentro dessas células. E ainda, o ambiente intracelular dessas células epiteliais nasais e alveolares suporta a sobrevivência do *M. leprae*.

A OMS e o Ministério da Saúde consideram que a doença é transmitida por gotículas do nariz e boca durante contato íntimo e frequente com doentes não tratados^{2,28}.

A sobrevivência do organismo fora do corpo humano sugere ainda a possibilidade de transmissão por roupas e fômites contaminados. Outras possibilidades como transmissão via insetos não podem ser completamente descartadas^{29,31}.

1.4 Reservatório de infecção

Foi relatada doença em tatus capturados no sul dos Estados Unidos da América (Louisiana e Texas), num chimpanzé de Serra Leoa e macacos-fulgigem mangabey da Nigéria³⁰. Uma significativa prevalência de hanseníase em tatus estabelece este animal como reservatório do bacilo e possível fonte de infecção^{30,31}.

Até 5% dos tatus da Louisiana tinham doença clínica e 20% tinham evidência sorológica de infecção pelo *M. leprae*. A significância epidemiológica do tatu é considerada nula apesar de casos ocasionais relatados em indivíduos com história de manuseio de tatus. Entre os seres humanos são os casos de hanseníase virchowiana que carregam as maiores cargas de microrganismos, o máximo atingindo cerca de sete bilhões por grama de tecido. Pacientes não-virchowianos têm uma carga de bacilo muito menor, provavelmente não excedem um milhão de organismos no total²¹.

1.5 Classificação de Ridley e Jopling

Ridley e Jopling³² fizeram em 1966 uma classificação para a hanseníase e assim estabeleceram cinco categorias para abranger o espectro da doença: tuberculoide (TT), dimorfa tuberculoide (DT), dimorfa-dimorfa (DD), dimorfa virchowiana (DV) e virchowiana (VV). Esta classificação é baseada em aspectos clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos e foi adotada no mundo todo^{15,33}. A forma indeterminada e a neural pura não foram inicialmente contempladas neste espectro³³. Algumas características das categorias da doença, com enfoque na apresentação clínica, são descritas a seguir.

1.5.1 Hanseníase tuberculoide (HT)

Considerada o polo de resistência alta³³, nesta forma clínica, encontram-se lesões bem delimitadas, em número reduzido, anestésicas e de distribuição assimétrica. Descrevem-se lesões em placas ou anulares eritematosas com bordas elevadas e centro hipocrômico. Podem assumir aspecto tricofitoide, com descamação das bordas e eventualmente com alopecia e anidrose, devido à denervação dos anexos cutâneos. Ocorre ainda, a variedade infantil, que se manifesta em crianças conviventes com portadores de formas bacilíferas e localiza-se principalmente na face^{1,4,8}.

1.5.2 Hanseníase virchowiana (HV)

Considerada o polo de baixa resistência³³, manifesta-se naqueles indivíduos que apresentam imunidade celular defectiva para o *M. leprae*. Admite-se que a HV possa evoluir a partir da forma indeterminada ou se apresentar como tal desde o início. Sua evolução crônica caracteriza-se pela infiltração progressiva e difusa da pele, podendo afetar ainda mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, ossos, articulações, dentes e órgãos internos. Na pele, descrevem-se pápulas, nódulos e máculas, mais frequentes na face e nos membros. As lesões são hipocrômicas, eritematosas ou acastanhadas. Pode não haver perda da sensibilidade. A pele torna-se luzidia, xerótica, com aspecto apergaminhado e tonalidade semelhante ao cobre. Há rarefação ou queda dos pelos nos membros, cílios e sobrancelhas (madarose). A infiltração difusa da face, incluindo os pavilhões auriculares, com madarose e manutenção da cabeleira, forma o quadro conhecido como *facies leonina*. O comprometimento nervoso ocorre nos ramúsculos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos. Estes últimos vão resultar em deficiências funcionais e sequelas tardias. Não há espessamento nervoso, a não ser que o paciente desenvolva a forma dimorfa. São sinais precoces de HV a obstrução nasal, rinorreia serossanguinolenta e edema de membros inferiores. A HV apresenta baciloscopia fortemente positiva e representa, nos casos virgens de tratamento, importante foco infeccioso ou reservatório da doença^{1,4,8}.

1.5.3 Hanseníase dimorfa (HD)

Entre os polos tuberculoide e Virchowiano, existe o grupo hanseníase dimorfa (HD), com manifestações clínicas, baciloscópicas, histológicas e imunológicas intermediárias. Este grupo é caracterizado por sua instabilidade imunológica, o que faz com que haja grande variação em suas manifestações clínicas, seja na pele, nos nervos ou no comprometimento sistêmico. As lesões da pele revelam-se numerosas e a morfologia mescla aspectos de HV e HT, podendo haver predominância ora de um tipo, ora de outro. São descritas

placas eritematosas, ferruginosas ou violáceas, com bordas internas nítidas e limites externos imprecisos (lesões foveolares), manchas hipocrômicas com bordas ferruginosas e manchas eritematosas ou acastanhadas. Quando numerosas, são chamadas lesões em renda ou queijo suíço. A infiltração assimétrica da face, dos pavilhões auriculares, e a presença de lesões no pescoço e nuca são elementos sugestivos desta forma clínica. As lesões neurais são precoces e assimétricas^{1,8,34}.

1.6 Hanseníase indeterminada (HI)

Tecnicamente ficou fora do espectro de classificação original de Ridley e Jopling³³, mas é hoje amplamente aceita como a forma inicial da doença³⁵.

Foi inicialmente chamada de “incharacterística”, termo introduzido no Segundo Congresso Panamericano de hanseníase, no Rio de Janeiro (1946), que depois foi substituído por “indeterminada”, em 1948, no Congresso Internacional de hanseníase em Havana. É reconhecida como uma forma clínica na classificação de Madri (1953) e nas classificações indianas originais. Foi incluída como paucibacilar pelo sistema da OMS em 1982³³.

As lesões surgem após um período de incubação que varia, em média, de dois a cinco anos. Caracteriza-se pelo aparecimento de manchas hipocrômicas ou eritemato-hipocrômicas, única ou múltipla, com alteração de sensibilidade, ou simplesmente por áreas de hipoestesia na pele sem lesão visível. Podem se localizar em qualquer área da pele, sendo mais frequentes na face, na superfície de extensão dos membros, em tronco e nádegas. Não há comprometimento de troncos nervosos nessa forma clínica, apenas de ramúsculos nervosos cutâneos. Por isso, não ocorrem alterações motoras ou sensitivas tipo anestésicas que possam resultar em incapacidades. Frequentemente, apenas a sensibilidade térmica encontra-se alterada. Pode ocorrer anidrose ou hipoidrose e queda de pelos no local das lesões^{1,36,37}. Essa forma é observada geralmente em contactantes de casos multibacilares^{8,38}.

Após período de tempo que varia de poucos meses até anos, ocorre evolução para cura (mais frequente) ou para outra forma clínica (em 25 a 30% dos casos)^{8,37}, desde tuberculóide até virchowiana (Figura 7).

FONTE: Adaptado de Sampaio *et al.* (2000) e McKee *et al.* (2005)

Figura 7 - Esquema da história natural da hanseníase

1.7 Forma neurítica pura

Esta forma não participa do espectro de classificação original de Ridley e Jopling. Pode se situar entre TT e DV no sistema de Ridley e Jopling, dependendo do estudo imunológico, bacteriológico e histopatológico³³. Na forma neural pura (mono ou polineurítica), não se encontram lesões cutâneas. Há espessamento do tronco nervoso com dano neural precoce e grave, em especial quando atinge nervos sensitivo-motores.

1.8 Reações hansênicas

São episódios agudos que afetam primariamente a pele e o nervo, e resultam de alterações no equilíbrio imunológico entre hospedeiro e bacilo. A maioria do dano neural na doença se deve às reações Hansênicas, que podem ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento ou após o tratamento. São classificadas em reação tipo 1 (reação reversa) e reação tipo 2 (eritema nodoso Hansênico)⁴.

1.8.1A reação tipo 1 é uma resposta imune do tipo hipersensibilidade tardia e ocorre geralmente em pacientes dimorfos

Pode levar à melhora ou piora da doença. Pacientes dimorfos em tratamento podem migrar para o polo tuberculoide devido à redução da carga bacteriana, enquanto que pacientes dimorfos sem tratamento podem manifestar um quadro semelhante ao Virchowiano, devido à piora da imunidade celular. Em ambos há uma resposta inflamatória em áreas de pele e nervos previamente afetados pela doença, que se caracteriza por hiperestesia, eritema e edema, com posterior descamação e possível ulceração. Geralmente há também edema de extremidades e neurite que pode resultar em paralisia permanente³⁹. As manifestações sistêmicas são mínimas em indivíduos com reações próximas do polo tuberculoide, e mais importantes nas reações próximas do polo Virchowiano^{4,39}.

1.8.2A reação tipo 2 é uma resposta inflamatória sistêmica cuja patogênese se associa à deposição de imunocomplexos

É manifestada por uma piora abrupta da doença, e é vista principalmente durante o tratamento de pacientes Virchowianos. As lesões são nódulos subcutâneos inflamatórios ulcerados ou lesões em alvo e ocorrem em qualquer área. Os pacientes apresentam febre, mal-estar, mialgia, edema, artralgia e linfadenomegalia. Por vezes advêm neurite e envolvimento do fígado e rins^{4,40}.

1.9 Diagnóstico da hanseníase segundo a OMS

De acordo com a OMS²⁸, o diagnóstico de hanseníase é mais comumente feito baseado nos sinais e sintomas, com raras circunstâncias que exigem a necessidade de apoio laboratorial para confirmação diagnóstica. Em áreas endêmicas, um indivíduo deve ser diagnosticado com hanseníase se tiver um dos seguintes sinais cardinais:

- Lesões cutâneas consistentes com hanseníase e perda sensorial, com ou sem nervos espessados,
- Esfregaço cutâneo positivo para bacilos.

Segundo a OMS⁴¹ a doença pode ser classificada com base em manifestações clínicas e o resultado de esfregaço cutâneo. Pacientes com esfregaços negativos de todas as lesões são agrupados como hanseníase paucibacilar e aqueles com esfregaço positivo em qualquer lesão são agrupados como hanseníase multibacilar. No entanto, a OMS assinala que, na prática, a maioria dos programas usa critérios clínicos para classificar e decidir o regime de tratamento apropriado para o paciente, principalmente devido a não disponibilidade de serviços que façam esfregaços cutâneos. Assim, o sistema de classificação clínica (operacional)⁷ para propósitos de tratamento inclui o número de lesões e de nervos envolvidos, agrupando em paucibacilares pacientes com até 5 lesões e em multibacilares os que apresentam mais de 5 lesões. Se houver dúvida recomenda-se classificar em multibacilar, por ser de suma importância que pacientes multibacilares não sejam tratados com regimes para paucibacilares.

A classificação proposta pela OMS baseada no número de lesões para definir o regime de tratamento é alvo de críticas. Rao *et al.*⁴² apontaram a natureza heterogênea desse grupo de doentes com 1 a 5 lesões, por vezes com variadas características bacteriológicas e histopatológicas. Os autores descreveram significativa presença de aspectos multibacilares em cortes histológicos de lesões de pacientes classificados como paucibacilares. Colocaram que essa categorização da doença baseada no número de lesões

cutâneas para fins terapêuticos é arbitrária, voltada para a conveniência dos profissionais em campo, e que a OMS não mencionou nenhuma base científica para tal recomendação, exceto citar a falta de serviços que realizam esfregaço cutâneo. Quanto ao critério de perda de sensibilidade, apesar de 70% das lesões Hansênicas terem diminuição da sensibilidade, sobram 30% de lesões não anestésicas e que ocorrem em pacientes multibacilares¹⁵. Ainda, a classificação operacional adotada pela OMS e pelo Ministério da Saúde (MS)^{43,33} consideram as formas clínicas indeterminada e tuberculoide como paucibacilares, enquanto as formas dimorfa e virchowiana são multibacilares. Essa classificação operacional não contempla a possibilidade da forma indeterminada ter bacilos e choca com a categorização da OMS de considerar um paciente com a presença de esfregaço positivo como multibacilar⁴¹.

1.10 Índice bacteriológico ou índice bacilar (IB)

É uma expressão que reflete a extensão da carga bacteriana. É calculado contando seis a oito esfregaços corados usando a lente objetiva de 100x com imersão em óleo. O esfregaço é obtido após incisão da pele com um bisturi, expressão da pele e o espalhamento do material obtido de forma espessa numa lâmina, que é corada pelo método histoquímico de Ziehl-Neelsen ou Fite-Faraco. Os resultados são expressos numa escala semilogarítmica:

- 1+ pelo menos 1 bacilo em 100 campos
- 2+ pelo menos 1 bacilo em cada 10 campos
- 3+ pelo menos 1 bacilo em cada campo
- 4+ pelo menos 10 bacilos em cada campo
- 5+ pelo menos 100 bacilos em cada campo
- 6+ pelo menos 1000 bacilos em cada campo

O IB é valioso porque é simples e representativo de várias lesões, mas é afetado pela profundidade de incisão da pele, rigor da raspagem e pela

espessura do esfregaço^{29,12}. A contagem de bacilos em cortes histológicos pode ser feita da mesma maneira que em esfregaços³³.

1.11 Reação de Mitsuda

A reação de Mitsuda (RM), introduzida em 1919 por Kensuke Mitsuda, consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml do antígeno de Mitsuda (antígeno bruto, não purificado, preparado a partir de hansenomas obtidos de pacientes bacilíferos ou de tatus infectados) e análise da resposta cutânea a essa injeção. O antígeno é injetado com seringa de tipo insulínica, na face anterior do braço ou antebraço. Há duas respostas cutâneas independentes: a reação precoce (de Fernandez) e a reação tardia (de Mitsuda), e o critério de leitura clínica das duas reações é baseado no diâmetro da induração no local¹. A reação precoce é considerada positiva se houver eritema e induração local medindo de 10 a 20 mm entre 48 a 72 horas após a injeção. A reação tardia ocorre gradualmente e atinge seu auge por volta de 28 dias, é analisada entre 3 a 4 semanas após a injeção. É considerada positiva quando aparece uma pápula com diâmetro igual ou maior a 5,0 mm. Indurações com diâmetros inferiores são consideradas respostas aos antígenos comuns compartilhados entre o *M. leprae* e outras micobactérias⁴⁴. A reação de Mitsuda positiva corresponde histologicamente a reação granulomatosa tuberculoide, e por isso avalia a resposta imune celular do paciente ao *M.leprae*^{1,44,45,46}.

A reação de Mitsuda foi incorporada aos critérios de classificação da hanseníase no ano de 1953, no Sexto Congresso Internacional de Madri, como auxílio na classificação da forma clínica da doença. Ficou deliberado que a reação positiva seria associada a pacientes tuberculoides, e negativa a pacientes virchowianos^{1,46}. Em pacientes dimorfos a positividade da reação diminui gradativamente perto do polo Virchowiano e aumenta progressivamente à medida que se aproxima o polo tuberculoide⁴⁶.

Seria de utilidade nos casos de HI por fornecer uma indicação para qual forma a doença migraria se evoluísse^{1,12}. Quando positiva, indica polo tuberculoide¹. Quando negativa, há opiniões controversas: de que não tem

valor preditivo para definir o polo de evolução³⁷ e de que esses casos sempre evoluem para formas bacilíferas¹.

1.12 Aspectos histológicos e moleculares das lesões

O exame histológico é considerado padrão ouro para o diagnóstico de hanseníase, pelo fato de o bacilo poder ser revelado por métodos histoquímicos¹. A presença de BAAR no interior de nervos é exclusiva da hanseníase, não foi observada em nenhuma das outras infecções por micobactérias¹². Ainda, a inflamação neural vista à histologia diferencia hanseníase de outras doenças granulomatosas.

O quadro histopatológico, assim como o clínico, é heterogêneo e reflete a resposta imune do hospedeiro.

Na forma tuberculoide observam-se lesões granulomatosas tuberculoides organizadas, caracterizadas por histiócitos epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo Langhans, rodeadas por linfócitos T CD4 e CD8. Há predomínio das células T do tipo CD4, com uma relação CD4:CD8 de 1,9:1^{47,48}. As células T CD4, que são de fenótipo T de memória, estão em justaposição com macrófagos no centro do granuloma. As células T CD8 estão restritas ao manguito que contorna o granuloma e são predominantemente CD28+ (T citotóxicas). Nesta área estão também células T *naïve*. Esses granulomas se dispõem ao redor de vasos, nervos e anexos. Plasmócitos são pouco frequentes. Pouco ou nenhum bacilo é encontrado^{15,47}.

Nas lesões virchowianas a derme contém infiltrado difuso e pouco organizado de grande quantidade de macrófagos com lipídios no citoplasma, conferindo aspecto espumoso a essas células (células de Virchow), poucas células T CD4 e CD8, poucos plasmócitos e mastócitos. Exibem predomínio de células T CD8, e a relação CD4: CD8 é de 0,6:1^{47,48}. Não há granuloma organizado, as células CD4, CD8 e macrófagos estão misturadas. A epiderme está achatada e a zona subepidérmica está poupada (faixa de Unna). A maioria das células CD8 nestas lesões é de fenótipo CD28- (T supressoras). No interior dos macrófagos e células de Schwann são encontrados muitos bacilos^{15,47}.

As lesões dimorfas apresentam características histológicas intermediárias entre as formas tuberculoide e virchowiana. A pesquisa de BAAR pode ser negativa ou positiva^{12,47}.

A hanseníase indeterminada exibe infiltrado inflamatório não granulomatoso, de leve intensidade, composto por linfócitos e histiócitos, que se dispõem ao redor de vasos e principalmente de anexos e nervos (peri ou intra-neural). Em 25% a 100% dos casos se encontra o bacilo no infiltrado perineural, músculos pilo-erectores, nervo, zona subepidérmica e dentro de histiócitos^{1,8,37,35,49,50}. A sensibilidade de detecção do bacilo aumenta conforme aumenta o número de cortes examinados^{35,50}. Somente com o encontro do bacilo é possível fazer o diagnóstico histológico definitivo de HI¹².

A técnica imuno-histoquímica, seja usando anti-PGL1⁵⁰ ou anti-BCG, aumenta a possibilidade do diagnóstico de HI pela demonstração de antígenos micobacterianos. Por ter sensibilidade maior que o método histoquímico, representa uma ferramenta importante no diagnóstico precoce da hanseníase^{37,51,52}.

O uso de técnicas moleculares para detecção de bacilo, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que amplificam genes específicos do *M. leprae*, tem mostrado sensibilidade superior à técnica imuno-histoquímica, particularmente nos casos paucibacilares^{53,54}.

Ridley⁵⁵ já em 1976 chamou atenção ao fato de a lesão cutânea precoce da hanseníase ser tão incaracterística que deveria ser diferenciada de outras formas de dermatite. Por este motivo, o diagnóstico clínico e histológico é um desafio. Ele então estabeleceu alguns aspectos muito sugestivos de HI, como a implicação seletiva de locais protegidos, mais ou menos peculiares da doença, que, em ordem aproximada de importância, são: 1) fascículos nervosos, 2) músculos pilo-erectores, 3) epiderme ou zona subepidérmica, 4) glândulas sudoríparas e 5) fascículos neurovasculares. Qualquer desses lugares pode ser afetado por diferentes modos, sendo por ordem de importância: 1) presença de BAAR, 2) infiltrado celular. A desorientação dos núcleos das células de Schwann e a desorganização da estrutura do nervo ou perineuro são uma prova sólida da doença, do mesmo modo que a presença de bacilo no nervo. Um manguito de linfócitos ao redor de um nervo constitui forte evidência

em favor de hanseníase. O achado de numerosos bacilos num nervo, sem resposta histiocitária, sugere DV precoce ou VV. Por outro lado, há características que excluem quase por completo o diagnóstico da hanseníase precoce e favorecem uma dermatite inespecífica: hiperplasia pseudo-epiteliomatosa da epiderme, neutrófilos no meio do infiltrado, infiltrado celular (não granulomatoso) com distribuição predominantemente perivascular e muito escassa ao redor de outras estruturas cutâneas, edema abundante tanto ao redor dos vasos ou na epiderme e numerosos melanóforos na derme superficial quando a camada basal da epiderme está intacta.

1.13 Patogênese, resposta imune do hospedeiro e influências genéticas

A variedade de apresentação clínica e histopatológica da hanseníase reflete diferentes graus da resposta imune do hospedeiro frente ao *M. leprae*. Os eventos que acontecem no início da infecção são provavelmente os aspectos menos compreendidos na imunologia da doença. A resposta inata e a adaptativa se superpõem em diversos eventos durante o curso da doença. Em última análise, a expressão imune tanto inata, quanto adaptativa, é fortemente determinada pelo perfil genético do hospedeiro.

1.13.1 Resposta inata

Representa a primeira barreira de proteção contra o *M. leprae* e compreende a integridade do epitélio, secreções, imunoglobulina A (IgA), células natural killer (NK), células dendríticas apresentadoras de antígenos, linfócitos T citotóxicos e macrófagos. Uma resposta inata efetiva pode destruir o bacilo, sem precisar da ativação da resposta adaptativa. No local de entrada do *M. leprae*, seja mucosa nasal ou pele, as células dendríticas (DC) devem ser as primeiras células a encontrar o bacilo. Após sua entrada no macrófago, o *M. leprae* induz a produção de TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β 1 pelos macrófagos infectados. A TNF- α ativa macrófagos para a destruição

intracelular do bacilo e potencializa os efeitos do IFN- γ . Já TGF- β 1 e IL-10 inibem os próprios macrófagos e promovem a proliferação de bacilos³.

A entrada do bacilo nas DC com posterior produção local de citocinas e quimiocinas leva a imunidade celular adaptativa a um padrão Th1 ou Th2, com proliferação de linfócitos T *helper* 1 ou T *helper* 2, o que promove uma resposta imune celular ou humoral ao *M. leprae*, respectivamente, determinando a evolução da doença para uma forma tuberculoide ou virchowiana¹³.

1.13.1.1 Receptores do *M. leprae* nas células dendríticas

Durante a resposta imune inata, padrões moleculares associados a patógenos, expressos em muitos microrganismos, são reconhecidos por receptores reconhecedores destes padrões, localizados em células imunes. As classes desses receptores estão listadas abaixo e representadas na Figura 8.

1.13.1.1.1 Receptores lectina tipo C (cálcio dependente):

Todos se ligam a manose, um carboidrato presente no lipoarabinomanan da parede celular da bactéria.

- receptor de manose (CD206) que se liga ao lipoarabinomanan. Essa ligação leva a produção de TNF- α , prostaglandina E2 e nitrito, além de ativação microbicida do macrófago
- DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin ou CD 209) – também se liga ao lipoarabinomanan. Provavelmente a ativação deste receptor suprime a maturação de DC, possivelmente pela inibição da produção de IL-12 e indução de IL-10. Ainda, a ligação do DC-SIGN pode inibir a sinalização via receptores *toll-like*.

- Langerina (CD 207) – expresso pelas células da Langerhans (CL), é necessário para a formação dos grânulos de Birbeck (estruturas endossômicas pentalaminares exclusivas das CL. Ligantes são transportados aos grânulos de Birbeck via langerina para serem processados.

1.13.1.1.2 Receptores *toll-like* (TLR)

São proteínas transmembrana cujo domínio citoplasmático está ligado a cinase associada ao receptor de IL-1, que induz a produção de citocinas. Dez tipos de TLR já foram identificados, sendo que somente os heterodímeros TLR2 e TLR1, homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser significativos no reconhecimento de micobactérias. São necessários para a produção ótima de IL-12, uma citocina pró-inflamatória responsável pela indução da imunidade tipo Th1, assim como de TNF- α , citocina importante na ativação e formação do granuloma. Os TLR 2 e 4 são glicoproteínas expressas na superfície celular e são encontrados em monócitos/macrófagos, células dendríticas mieloides e mastócitos. O TLR-4 também é encontrado em linfócitos B e epitélio intestinal. Os antígenos bacterianos que se ligam a TLR são peptidoglicano, lipoproteína, ácido lipoteicoico e porinas em TLR-2 e lipopolissacarídeo em TLR-4. O reconhecimento pelos TLR de ligantes microbianos ativa fatores de transcrição, resultando na expressão de genes importantes para a resposta imune natural. Determinam a expressão de moléculas MHC e co-estimuladores, melhorando a eficiência da apresentação de antígeno e ativando células apresentadoras de antígeno (APC) a produzirem citocinas que estimulam a resposta de células T^{56,57}.

1.13.1.1.3 Receptores de complemento

Receptores 1, 3 e 4 do complemento se ligam ao PGL-1, facilitados pelo componente C3 do complemento, e são mediadores-chave na fagocitose do bacilo¹³.

Figura 8 - Esquema de representação de receptores de células dendríticas relevantes para a ligação com *M. leprae*. Os receptores em azul são lectinas tipo C que se ligam à manose da parede celular bacteriana. Os receptores em vermelho são receptores do complemento, que se ligam ao PGL-1. Em amarelo são receptores *toll-like*. O sinal + indica estimulação e o sinal – indica inibição. *indica receptor exclusivo a células de Langerhans. PG E2 = Prostaglandina E2.

1.13.1.2 Células *Natural killer* (NK)

Tem citotoxicidade espontânea contra células neoplásicas e infectadas. Na hanseníase, a citotoxicidade das células NK é dirigida contra macrófagos e células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*¹³. Parecem ser recrutadas em lesões virchowianas injetadas com IL-2, onde são responsáveis pelo subsequente *clearance* de bacilos.

1.13.1.3 Células dendríticas (DC)/células apresentadoras de antígenos (APC)

Fragmentos das proteínas micobacterianas, depois de processadas dentro do macrófago, são apresentados na superfície de células apresentadoras de antígenos associados a moléculas de classe II do HLA que apresentam antígenos para receptores de células T *naïve*. Indivíduos com alelos HLA-DR2 e HLA-DR3 induzem uma resposta de células T de padrão Th1 e estão associados ao polo tuberculoide. Já indivíduos com alelos HLA-DQ1 induzem resposta de padrão Th2 e estão associados ao polo Virchowiano¹⁵.

Células dendríticas (DC) são as células apresentadoras de antígenos mais eficazes para iniciar uma resposta de células T e ativar células CD4 e CD8⁵⁷. Elas fazem ligação entre o sistema imune natural e o adquirido, e por esta razão as APC podem ser consideradas componentes de ambos os sistemas. São derivadas de precursores da medula óssea e subdivididas em mieloides e plasmocitoides, com diferentes expressões gênicas entre elas⁵⁸. Suas projeções citoplasmáticas dendríticas aumentam a área de superfície e coletam ativamente componentes extracelulares por fagocitose, endocitose e pinocitose⁵⁷. Na pele, as principais APC são representadas pelas células dendríticas mieloides, de Langerhans e alguns dendrócitos dérmicos, que podem ser identificadas respectivamente pela expressão imuno-histoquímica de S100, CD1a e fator XIIIa (FXIIIa)⁵⁹. Outra célula dendrítica com capacidade de apresentação de antígeno é a célula dendrítica plasmocitoide, que exhibe marcação para CD123 e CD303⁶⁰. Além de apresentarem antígenos, as DC respondem a estruturas microbianas expressando níveis elevados de co-estimuladores, como as proteínas B7-1 e B7-2, que fornecem os segundos sinais para ativação da célula T, e secretam citocinas, como a IL-12, que estimula a diferenciação das células T⁵⁷.

As células de Langerhans (CL) são o arquétipo das células dendríticas na pele e se situam na epiderme, podendo também ser encontradas na derme. Seus prolongamentos dendríticos se estendem superiormente entre os queratinócitos até a camada granulosa, e inferiormente até a junção epidermo-dérmica. São consideradas a primeira resposta celular epidérmica a antígenos tumorais e microrganismos. A melhor maneira de identificá-las é por reação

imuno-histoquímica com marcação para anti-CD1a (glicoproteína de diferenciação da superfície celular do pro-timócito) e anti CD-207 (langerina); são difíceis de identificar com segurança à coloração de hematoxilina e eosina. Elas também expressam MHC de classe I (HLA-A, B, C), MHC de classe II (HLA-D), CD1b, CD18 ($\beta 2$ integrina), CD29 ($\beta 1$ integrina), CD45 (CLA), Lag, receptor II de Fc-IgG, S100, vimentina, e-caderina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e, quando ativadas, receptor de interleucina-2 (CD25) e CD4. À ultra-estrutura elas não possuem desmossomos nem tonofilamentos, têm um núcleo lobulado e citoplasma claro contendo os característicos grânulos de Birbeck. Esses grânulos são inclusões em formato de haste ou raquete, que se acredita ter papel importante na apresentação do antígeno, uma vez que sua principal função é transformar proteínas estranhas em peptídeos imunogênicos (oligopeptídeos lineares) para apresentação às células T efectoras. Depois da estimulação antigênica, as CL sensibilizadas migram para a zona paracortical do linfonodo sob influência de TNF- α e $\alpha 6$ integrina, estimulando linfócitos T. Então as células T agora específicas ao antígeno retornam à epiderme para continuar a reação imune contra o antígeno estimulador^{61,62}. As células de Langerhans estão presentes na epiderme normal numa concentração entre 460 e 1.000/mm^{62,63}.

Os dendrócitos dérmicos positivos para FXIIIa (DDFXIIIa) são APC situadas na derme. São mais numerosos na derme papilar, ao redor dos vasos e no tecido conjuntivo frouxo ao redor dos anexos, onde são grandes, com corpos celulares bulbosos que projetam vários processos citoplasmáticos longos orientados para a epiderme. No entanto, DDFXIIIa finos e isolados podem estar presentes entre as fibras colágenas, geralmente se estendendo aos septos de tecido conjuntivo entre os lóbulos de gordura, onde exibem delicados processos dendríticos bipolares ou tripolares^{64,65,66,67}. Eles não expressam CD1a e S100⁶⁵. O FXIIIa é identificado no citoplasma dessas células, assim como em histiócitos dos seios linfonodais, monócitos do sangue periférico, macrófagos alveolares e peritoniais, fibroblastos reativos, plaquetas e megacariócitos^{66,67}. Outras células dendríticas residentes da derme, como mastócitos, células de Schwann ou células endoteliais são negativas para

FXIIIa. DDFXIIIa podem perder a morfologia dendrítica/fusiforme e se transformarem em células com formas redondas, histiocitoides⁶⁸.

As células dendríticas plasmocitoides (CDP) estão também situadas na derme, e são especializadas na secreção de interferon tipo I⁵⁷, o que as tornam respondedoras precoces à infecção viral. Expressam CD4, CD123 (cadeia alfa do receptor de IL-3), CD68, MHC classe II e CD2. Possuem um grande retículo endoplasmático. Além da secreção de interferon tipo I, produzem IL-12, IL-6 e TNF- α ⁶⁹. Funcionalmente as CDP são menos eficientes como células apresentadoras de antígenos se comparadas com as células dendríticas convencionais. Elas circulam pelo sangue e são geralmente ausentes na pele humana normal, porém podem ser recrutadas durante condições inflamatórias como infecção viral, alergia ou auto-imunidade⁷⁰.

Há descrição da distribuição de células dendríticas convencionais nas formas polares da hanseníase, com densidade de CL marcadamente reduzida nas lesões de pacientes virchowianos e aumentada nas lesões de pacientes tuberculoides, comparando-se com controles de pele sem a doença^{13, 59,71,72,73}. Pacientes virchowianos têm menos DDFXIIIa nas lesões de pele quando comparados com pacientes com hanseníase tuberculoide ou controles⁵⁹. Quanto às CDP, Massone *et al.*⁶⁹ não encontraram expressão destas células em nenhum dos casos estudados (DV, VV, DT e TT).

Na forma indeterminada os estudos sobre células dendríticas são poucos, contemplam apenas as células de Langerhans, englobam uma população um tanto heterogênea e datam de mais de 20 anos^{73,74} quando as CL ainda eram consideradas as únicas APC da pele. Nesses estudos, a quantidade de CL na HI não difere da pele normal^{73,74}.

Não foram encontrados estudos referentes à avaliação de DDFXIIIa e CDP na HI.

1.13.2 Resposta adaptativa/adquirida celular

A resposta imune adquirida se dá pela interação de linfócitos, células dendríticas, macrófagos, anticorpos e citocinas. Pacientes com hanseníase

mostram diferentes respostas B e T. Enquanto os tuberculoides mostram boa resposta imune celular e anticorpos indetectáveis, os virchowianos têm grande quantidade de anticorpos e pouca ou nenhuma resposta imune mediada por células T. Diversos estudos relataram uma predominância de IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-18 nas lesões tuberculoides e de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β nas lesões virchowianas, mostrando uma tendência de padrões de resposta Th1 e Th2, respectivamente. Clones de células CD4 isolados de lesões tuberculoides secretam principalmente IFN- γ , enquanto que clones de CD4 e CD8 isolados de lesões virchowianas produzem predominantemente IL-4¹³. A resposta Th1 ativa macrófagos a matar ou inibir o crescimento de patógenos, em contraste a resposta Th2 leva a ativação humoral e inibe reações mediadas por células, levando à progressão da infecção^{75,76}.

As células citotóxicas T CD4 e CD8 são capazes de destruir macrófagos infectados pelo *M. leprae*. A lise de células infectadas por linfócitos T citotóxicos é mediada pela perforina e granzima B (um grânulo citotóxico presente em células T citotóxicas e células NK). A perforina forma poros na membrana celular da célula-alvo permitindo que a granzima B entre na célula, onde ativa caspases e leva à morte da célula. A perforina é expressa igualmente nas formas tuberculoides e virchowianas. A granulicina é outra proteína antimicrobiana das células T, e é mais frequente nas lesões tuberculoides que nas lesões virchowianas. Os bacilos liberados de macrófagos após destruição por células T serão fagocitados por novos macrófagos ativados, que exibem maior capacidade para lidar com os bacilos que as células prévias¹³.

A IL-2 é o principal fator autócrino para a maioria das células T, induzindo a expansão clonal destas células produtoras de citocinas e aumentando a produção de IFN- γ ^{57,76}.

Macrófagos ativados por IFN- γ podem inibir radicalmente ou matar o *M. leprae*, pela produção de espécies reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio^{3,13,76,77}. O IFN- γ também aumenta a expressão de HLA-DR e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que facilita a interação entre células T e células acessórias⁷⁶.

A IL-4 tem efeito negativo na resposta imune celular, favorecendo o crescimento bacteriano, devido a diversos fatores: bloqueia a proliferação de células T dependentes de IL-2 pela infra-regulação de receptores de IL-2, anula a ativação de monócitos pelo IFN- γ , infra-regula a produção de IL-1 β e TNF- α , e bloqueia a geração de óxido nítrico necessária para a morte de patógenos⁷⁶.

A IL-10 inibe a produção de citocinas pelas células T CD4 na ausência relativa de IFN- γ ou IL-2⁷⁶.

A IL-12 direciona células T a uma resposta Th1 e promove a expansão destas células⁷⁶.

Recentemente, foi relatado o achado que alguns pacientes de ambas as formas clínicas da doença mostraram resposta imune não polarizada (Th0), com produção de IFN- γ e IL-4, o que foi intrigante e tornou difícil alocá-los no paradigma Th1-Th2. Foi mostrado que pacientes com hanseníase com subtipo Th não polarizado tinham alta porcentagem de células Th17, devendo, portanto, constituir um terceiro subtipo de Th, sem polarização para Th1 ou Th2⁷⁸. Os linfócitos T CD4 Th17 produzem IL-17, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22 e TNF- α . IL-17 é uma potente citocina pró-inflamatória. Em estudo que avaliou a resposta Th17 na Hanseníase foi mostrado quantidade maior de TGF- β em formas virchowianas quando comparadas com as formas indeterminada e dimorfa; e quantidade maior de IL-6 e IL-17 nas formas tuberculoides quando comparadas com a forma indeterminada⁷⁹.

Na reação tipo I há um aumento abrupto na resposta imune, com aumento de células CD4, produção de IL-1, TNF- α , e IFN- γ nas lesões. Na reação tipo II ocorre inflamação mediada por imunocomplexos, caracterizada por aumento de IL-6, IL-8, e IL-10 nas lesões (padrão Th2), assim como aumento de TNF- α e TGF- β ⁴.

1.13.3 Resposta imune reguladora

As células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ são uma subclasse de células T reguladoras (T-reg), responsáveis pela inibição da auto-imunidade e pelo

controle a respostas imunes exageradas em doenças infecciosas e inflamatórias, através da inibição da resposta de células T efetoras, levando por vezes a um ambiente de imunossupressão em doenças infecciosas. Foxp3 é um fator de transcrição da família *forkhead* expresso por estas células T-reg e parece ser fundamental para a função supressora⁸⁰. Mutações em Foxp3 no camundongo e no homem resultam em ausência de linfócitos T-reg CD25+ e doença auto-imune em múltiplos sistemas⁵⁷. A expressão nuclear de Foxp3 por técnica imuno-histoquímica em cortes emblocados em parafina é uma avaliação relativamente precisa da quantidade de T-regs⁸¹. Além de Foxp3, a expressão de IL-10 e TGF- β também sinalizam uma resposta T reguladora⁸⁰. TGF- β parece ser um fator estimulador para estas células e também um produto dessas células^{80,82}.

O acúmulo dessas células na derme suprime a ação de células T efetoras de eliminar parasitas como *Leishmania sp*, desta forma levando a uma infecção persistente. A eliminação de T-regs nestes casos resultaria na manutenção da resposta inflamatória Th1 e consequente eliminação do parasita. Um papel igualmente supressor de resposta imune analisando-se o Foxp3 foi observado em tuberculose⁸³. Foi encontrada diminuição ou ausência de T-regs em biópsias de pele de pacientes com lúpus eritematoso, esclerose sistêmica e dermatomiosite⁸⁴.

Há poucos estudos de Foxp3 em lesões *in situ* de hanseníase^{69,83}. Massone *et al.*⁶⁹ estudaram 20 casos de hanseníase que englobaram pacientes com a forma TT, DT, DV, VV, DD em reação reversa, DT em reação reversa e eritema nodoso hanseniano. Encontraram células positivas para Foxp3 em 95% dos casos e ainda observaram aumento estatisticamente significativo nos pacientes em reação reversa comparando-se com pacientes com eritema nodoso Hanseniano e pacientes com hanseníase não reacional. Porém não encontraram diferença estatisticamente significativa na quantidade de Foxp3 entre os grupos de hanseníase não reacional, fato que poderia ser explicado pelo número limitado de pacientes dentro de cada categoria. Já Palermo *et al.*, em estudo de 20 lesões de pele de pacientes com hanseníase englobando as formas tuberculoide e virchowiana, encontraram aumento significativo na quantidade de T-reg (CD25+, Foxp3+) em lesões virchowianas quando

comparadas com lesões tuberculoides, sugerindo assim um papel supressor de T-reg na hanseníase virchowiana⁸³. O aumento gradual de T-reg nas formas virchowianas da hanseníase^{80,83,85,86} é uma explicação plausível para a não eliminação do bacilo nesta fase.

1.13.4 Resposta adaptativa humoral

Nos pacientes virchowianos há altos títulos de anticorpos contra PGL-1 e outros antígenos específicos do *M. leprae*. O anti-PGL1 é útil para fins diagnósticos embora nenhuma atividade neutralizadora contra o bacilo tenha sido reportada¹⁵.

1.13.5 Interação bacilo-células de Schwann

O *M. leprae* tem uma habilidade única de infectar nervos periféricos. A neuropatia da hanseníase resulta não só da infecção dos nervos pelo bacilo, mas também da resposta inflamatória a ele. Estudos experimentais em tatus infectados sugeriram que o *M. leprae* infecta o nervo primeiro em vasos sanguíneos e linfáticos do epineuro para depois atingir o endoneuro via sangue¹³. O bacilo interage com a laminina 2 das células de Schwann, que é um componente da lâmina basal destas células e é restrito a nervos periféricos. O PGL-1 é um dos antígenos envolvidos nessa interação bactéria-nervo periférico. Uma vez dentro da célula de Schwann, o bacilo inicia uma replicação lenta, num ambiente provavelmente adequado para a sua preservação e proliferação. As células de Schwann podem expressar moléculas de HLA classe II e participam da resposta imune apresentando antígenos micobacterianos para células T CD4. Em algum momento, células T específicas reconhecem antígeno micobacteriano dentro do nervo e iniciam uma inflamação crônica. O edema dentro de um perineuro inflexível leva a isquemia, com posterior dano neural e eventualmente fibrose com “morte” axonal¹⁵.

O sistema nervoso central também pode estar acometido por hanseníase, conforme mostram alguns estudos^{87,88}. Foram demonstrados bacilos em neurônios da medula espinhal, *medulla oblongata* e região frontal.

1.13.6 Influência genética na resposta imune/alterações genéticas na hanseníase

Há inúmeros estudos que apontam alterações genéticas e suas repercussões na apresentação clínica da hanseníase, bem como na suscetibilidade ou resistência à doença.

Mutações em genes como o do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 10 (IL-10), PARK2/PACRG, NRAMP1 (proteína 1 do macrófago associada à resistência natural), CCDC122, CD13orf31, NOD2, TNFSF15, HLADR, RIPK2, LRRK2 e receptor da vitamina D (VDR) são alguns exemplos de mutações associadas ao desenvolvimento de hanseníase^{3,4,13,15,89,90}. Os genes TNF- α , CD13orf31, NOD2, RIPK2 e LRRK2 estão associados particularmente com a forma multibacilar^{4,15,89,90}. Ainda, o genótipo do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) do tipo HLA-DR está associado a resposta imune do tipo Th1, enquanto que o HLA-DQ se associa a resposta Th2⁷⁶.

1.14 Justificativa

A principal consequência indesejável da hanseníase é a perda de função neural¹⁵. A maneira mais efetiva de impedir sequelas neurais assim como prevenir a transmissão da doença é o diagnóstico precoce e tratamento com múltiplas drogas (TMD), que formam a essência da estratégia de combate e eliminação da hanseníase².

A resposta imune inata e adaptativa estão bem descritas nas formas polares da doença. Os eventos de resposta do hospedeiro na forma indeterminada são os aspectos menos compreendidos da imunidade da

hanseníase. Restam lacunas e faltam dados sobre a resposta imune na fase inicial da doença.

Algumas possíveis explicações para a escassez de estudos de resposta imune nessa fase inicial de acometimento seriam o fato de as lesões iniciais da doença não serem reprodutíveis em animais experimentais⁴⁴ e a raridade da forma indeterminada dentre as formas de hanseníase diagnosticadas, ocorrendo em torno de 3 a 10 %^{91,92,93,94}.

Desconhecemos estudos *in situ* nas lesões de HI de perfil citocínico amplo e análise de elementos da imunidade inata (NK, TLR, células dendríticas FXIIIa positivas, iNOS e moléculas de expressão que indiquem ativação endotelial).

Neste contexto, tornam-se necessários estudos que caracterizem a resposta imune local nas lesões iniciais, que certamente irão contribuir para o melhor entendimento da doença, aumento do diagnóstico precoce e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para modulação da resposta imune.

Também motiva este estudo a hipótese de que poderia existir relação entre os perfis fenotípicos celular e citocínico com a reação de Mitsuda, o que poderia ser uma possível forma de diferenciar os grupos que posteriormente evoluíram para formas tuberculoide ou virchowiana.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é caracterizar a resposta inflamatória tecidual *in situ* das lesões na hanseníase indeterminada através do fenótipo de células, citocinas e outras moléculas.

Pretende-se também comparar o perfil fenotípico e citocínico das lesões de HI entre grupos de reação de Mitsuda positiva e negativa, à procura de um perfil preditivo de evolução da infecção.

Como objetivos específicos se pretende, por metodologia morfométrica, quantificar nas lesões:

- a- as células CD57, CD4, CD8, CD1a, S100, FXIIIa, CD68, Foxp3 e CD123;
- b- as citocinas IL-1, IL-2r, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α e TGF- β ;
- c- as moléculas de expressão: iNOS, granzima B, receptor Toll-like 2/4, e antígeno BCG.

Ainda, através da análise semiquantitativa das alterações histológicas vistas à coloração de hematoxilina e eosina, pretende-se revisitar o padrão inflamatório da HI.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

Este é um estudo transversal, cujos dados foram colhidos em dezembro de 2008, no laboratório de Patologia do Hospital Lauro de Souza Lima (HLSL), em Bauru – SP.

3.1 Casuística

A partir do livro de registros de diagnósticos do Serviço de Patologia do HLSL em Bauru, SP, instituição de referência no diagnóstico e tratamento da hanseníase, foram procurados laudos histopatológicos de hanseníase indeterminada entre 1997 e 2008. O resultado foi de 112 laudos de 108 pacientes com diagnóstico histopatológico de hanseníase indeterminada. Destes pacientes, 38 tinham registro do resultado da reação de Mitsuda em seus prontuários, sendo 17 positivos e 21 negativos. Após a análise dos prontuários dos 38 pacientes estabeleceram-se critérios de exclusão, que geraram 15 casos de uma população homogênea. Os critérios de exclusão foram:

- segunda lesão de um mesmo paciente (neste caso foi incluída somente a primeira lesão)
- pacientes que tinham diagnóstico histológico de HI, mas que após a análise do prontuário havia diagnóstico clínico de hanseníase em forma polar ou dimorfa
- pacientes com biópsia prévia cujo resultado era de hanseníase polar ou dimorfa
- ausência de inflamação neural na análise histológica das lesões
- presença de granuloma na análise histológica das lesões

Foram levantados os dados demográficos como sexo e idade, resultado da reação de Mitsuda, blocos de parafina, lâminas coradas pela hematoxilina/eosina e por Fite-Faraco, além dos resultados da pesquisa de bacilo por esta coloração histoquímica destes 15 pacientes.

3.2 Análise semiquantitativa dos aspectos histológicos

Os aspectos histológicos à coloração de rotina (hematoxilina e eosina) e suas semiquantificações foram estabelecidos conforme exposto na Tabela 2.

Tabela 2 - Semiquantificação das alterações epidérmicas e dérmicas vistas à coloração de hematoxilina/eosina em 15 casos de hanseníase indeterminada.

ALTERAÇÕES DA EPIDERME				
	0	1	2	3
Espongiose	Ausente	presente	NA	NA
Alteração vacuolar da camada basal	Ausente	presente	NA	NA
Melanócito	quantidade diminuída	quantidade normal*	NA	NA
Acantose	ausente	presente	NA	NA
Atrofia	ausente	presente	NA	NA
Exocitose de linfócitos	ausente	presente	NA	NA
Paraqueratose	ausente	presente	NA	NA
Queratinócitos apoptóticos	ausente	presente	NA	NA
ALTERAÇÕES DA DERME				
IIM perivascular superficial	ausente	leve	moderado	acentuado
IIM perivascular profundo	ausente	leve	moderado	acentuado
IIM neural (peri e intraneural)	ausente	leve	moderado	acentuado
IIM peri-écrico	ausente	leve	moderado	Acentuado
IIM perifolicular ou perimúsculo pilo-erector	ausente	leve	moderado	Acentuado
IIM de melanófagos	ausente	leve	moderado	Acentuado
Delaminação do perineuro	ausente	presente	NA	NA

NA= Não se aplica

IIM= Infiltrado inflamatório mononuclear

*= (1 melanócito/10 queratinócitos basais⁶²)

3.3 Método imuno-histoquímico para determinação do fenótipo das células, citocinas e moléculas

Para identificação do fenótipo das células das lesões de HI usou-se método imuno-histoquímico de estreptavidina-biotina peroxidase (SABC), com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo^{95,96}. As etapas que compõem o método são descritas a seguir:

- 1- Os cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embocado em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução de “3-aminopropyltiethoxysilane” (Sigma, código A-3648).
- 2- Os cortes foram submetidos à desparafinização em banho de xilol por 30 minutos em estufa a 56 °C e em um segundo banho de xilol por 10 minutos à temperatura ambiente.
- 3- Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) por 5 minutos cada.
- 4- Lavados em água corrente, água destilada e em tampão “phosphate buffer saline” (PBS) pH 7,4 por 5 minutos cada.
- 5- Foi realizado o bloqueio de pigmentos de formol, submetendo-se os cortes à imersão em solução de hidróxido de amônio 25% diluído em álcool 95% por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 6- Em seguida, os cortes foram lavados novamente em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.
- 7- O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado colocando-se os cortes em água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes a 3%, em três incubações de 15 minutos cada em câmara escura.
- 8- Os cortes foram então lavados em água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

- 9- A recuperação antigênica, quando necessária, foi realizada através de calor úmido, colocando-se os cortes imersos em tampão ácido acético diaminotetraetileno (Tris/EDTA) pH 9,0 ou tampão citrato pH 6,0 já aquecidos à temperatura de 95 °C em banho-maria por 20 minutos.
- 10- Os espécimes foram lavados em água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos cada.
- 11- Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados em solução de leite desnatado (Molico - Nestlé®) 10% por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 12- Em seguida, foram incubados com anticorpo primário específico ao antígeno pesquisado, diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) a 1% por 12 horas à 4 °C.
- 13- Os cortes foram lavados em PBS por 2 vezes, 5 minutos cada.
- 14- Foram incubados com anticorpo secundário universal biotinilado (anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra) do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos à 37 °C.
- 15- Os cortes foram novamente lavados em PBS por 2 vezes, cinco minutos cada.
- 16- Foram incubados com o reagente Estreptavidina peroxidase do “Kit” LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) por 30 minutos a 37 °C.
- 17- Os cortes foram então lavados em PBS por 2 vezes, cinco minutos cada.
- 18- A revelação da reação imuno-histoquímica foi realizada com o emprego de 45 µg do cromógeno 3’3 Diamino-benzidina (DAB) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA, código D-5637), diluído em 100 ml de PBS, filtrado e acrescido de 1200 µl de H₂O₂ 10 volumes a 3%.
- 19- Os cortes foram colocados na solução cromógena (DAB) e posteriormente foram lavados em água corrente por 5 minutos.

- 20- Em seguida, foram contracolorados com hematoxilina de Mayer (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código S3309).
- 21- Novamente foram lavados em água corrente por 5 minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%).
- 22- Finalmente, os cortes foram diafanizados em xilol e montados em resina “permount” (Fisher Scientific, código SP-15-100).

Para identificação de citocinas e moléculas nas lesões empregou-se basicamente o mesmo método imuno-histoquímico para visualização das células, com alguns diferenciais, como a incubação dos cortes em solução de PBS-saponina (tampão PSB pH 7,4 contendo saponina 0,1% - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, código S 7900) por 10 minutos à temperatura ambiente antes do bloqueio de proteínas inespecíficas com leite Molico®. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários específicos para cada citocina, por 12 horas a 4 °C, seguindo o protocolo já descrito anteriormente, contudo, antes e após a incubação com o anticorpo secundário, os cortes foram novamente colocados em tampão PBS-saponina por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida colocados em tampão PBS pH 7,4. Os procedimentos foram efetuados com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo⁹⁶.

Os elementos celulares, citocínicos e moleculares estudados por método imuno-histoquímico foram os seguintes: CD57, CD4, CD8, CD1a, S100, FXIIIa, CD68, Foxp3, CD123, IL-1, IL-2r, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , iNOS, Granzima B, TLR-2, TLR-4 e BCG. As especificações dos anticorpos usados estão contidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Especificações dos anticorpos usados nas reações imuno-histoquímicas.

ANTICORPO	CÓDIGO	MARCA	DILUIÇÃO	SISTEMA
Ig de coelho anti-BCG	B124	Dako	1:20000	LSAB
Ig de camundongo anti-CD1a	MCA1657	Serotec	Puro	CSAII
Ig de camundongo anti-CD4	M0834	Dako	1-1000	CSAII
Ig de camundongo anti-CD8	M7103	Dako	1-20	CSAII
Ig de camundongo anti-CD57	MS136P	Neomarkers	1-100	LSAB
Ig de camundongo anti-CD68	M0814	Dako	1-30	LSAB
Ig de coelho anti-FXIIIa	PU337P	Biogenex	1-4000	Novolink
Ig de camundongo anti-S-100	MS296P	Neomarkers	1-200	LSAB
Ig de coelho anti-INO5	482728	Calbiochem	1-500	Novolink
Ig de cabra anti-Granzima - B	SC1969	SantaCruz	1-50	LSAB
Ig de rato anti-Foxp3	14-4776	E-Bioscience	1:50	LSAB
Ig de camundongo anti-TGF β	SC82	SantaCruz	1:40	LSAB
Ig de cabra anti-TLR-2	SC8689	SantaCruz	1-50	LSAB
Ig de cabra anti-TLR-4	SC8694	SantaCruz	1-50	LSAB
Ig de cabra anti-IL-1 β	AF201NA	R&D Systems	1:20	LSAB
Ig de camundongo anti-CD25 (IL2-R)	NCL-CD25	Novocastra	1-50	LSAB
Ig de cabra anti-IL-4	AF204NA	R&D Systems	1-40	LSAB
Ig de cabra anti-IL-6	AF206NA	R&D System	1:20	LSAB
Ig de cabra anti-IL-8	AF208NA	R&D Systems	1:25	LSAB
Ig de cabra anti-IL-10	AF217NA	R&D Systems	1-20	LSAB
Ig de camundongo anti-IL-12	MAB219	R&D Systems	1-40	LSAB
Ig de cabra anti-IL-18	SC6178	SantaCruz	1-100	LSAB
Ig de cabra anti-TNF- α	AF210NA	R&D Systems	1-40	LSAB
Ig de camundongo anti-INF- γ	MAB285	R&D Systems	1-30	LSAB
CD123	14-1239-82	eBioscience	1-100	Advance

3.4 Análise quantitativa das células inflamatórias, citocinas e moléculas imunomarcadas na derme

As células, citocinas e moléculas imuno-marcadas foram quantificadas em um microscópio Zeiss® Primo Star com o auxílio do programa Image-pro plus® versão 4.5.0.29 para Windows 98/NT/2000. Em cada lâmina, a contagem de elementos da derme foi iniciada no primeiro campo de derme superior à esquerda, e assim seguia-se para os próximos dois campos para baixo. Depois o próximo campo seria o segundo superior à esquerda e os dois abaixo dele, assim sucessivamente (Figura 9). Um máximo de 12 e um mínimo de 7 campos

foram contados. Os resultados foram expressos em número de células/mm², estabelecendo-se valores de 50 células/mm² como padrão de células frequentes e de 05 células/mm² como padrão de citocinas ou moléculas frequentes.

Figura 9 - Sequência de contagem das células, citocinas e moléculas marcadas na derme.

3.5 Análise quantitativa de CD1a

A análise quantitativa das células de Langerhans CD1a positivas foi realizada na epiderme em sua totalidade, utilizando-se graticulo com área de 0.0625 mm² no aumento de 400x. Foram considerados os cruzamentos de retas do graticulo que coincidiram com imunomarcção positiva em relação a todos os cruzamentos de retas que coincidiram com a área da epiderme. Desta forma, obteve-se a fração de área epidérmica com positividade para CD1a.

3.6 Análise semiquantitativa da expressão de BCG nas lesões

A análise de imunomarcção para BCG foi feita com visualização de todos os campos da derme, e o resultado expresso em marcação positiva ou negativa.

3.7 Distribuição da casuística

Foi usado um grupo controle de expressão de FXIIIa e CD1a em 10 casos de pele normal excisadas em cirurgias ortopédicas da região do joelho, provenientes dos arquivos do laboratório da disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis onde as reações foram realizadas⁹⁷.

Os eventos foram divididos em grupos de reação de Mitsuda positiva e negativa, para fins de comparação entre eles.

3.8 Análise estatística

A análise dos dados foi feita a partir da construção de planilhas com os dados demográficos, histológicos e imuno-histoquímicos. Para comparação de dados frequenciais utilizou-se a comparação pelo teste do chi quadrado ou o exato de Fisher. Para comparação de dados quantitativos entre duas populações foi utilizado o teste de T após verificação de uniformidade das variâncias. Na ausência desta realizou-se a correlação de Welch ou testes não paramétricos de Mann-Whitney. Para comparação de dados quantitativos de mais populações, utilizou-se o teste de ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. Na ausência de uniformidade de variâncias foi feito o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Para correlação entre eventos usou-se a correlação de Pearson. Os valores foram significativos quando a probabilidade de igualdade foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). A força do teste ou erro tipo 2 foi sempre mantida em 90% ou 0,10. A análise foi feita com os pacotes estatísticos Graph Pad Prism 5.00 para Windows, (Graphpad Software®, San Diego, CA, USA) e o pacote estatístico STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc®, Tulsa, OK, USA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Dos 15 pacientes com hanseníase indeterminada, 11 eram mulheres (73%), 10 tinham idade superior a 30 anos (66%) e 8 tinham reação de Mitsuda negativa (53%). A Tabela 4 mostra sexo, idade e resultado de reação de Mitsuda destes pacientes.

Tabela 4 - Casos de hanseníase indeterminada selecionados para o estudo - dados demográficos e resultado de reação de Mitsuda.

Número do paciente	CASO	SEXO	IDADE (anos)	RM
1	B03-132	F	57	negativa
2	B01-1234	F	23	negativa
3	B01-523	M	57	positiva
4	B00-3014	F	31	negativa
5	B02-1433	F	32	positiva
6	B02-3977	M	26	negativa
7	B02-2761	F	55	negativa
8	B99-2229	F	42	positiva
9	B08-584	M	45	positiva
10	B03-788	F	?	negativa
11	B03-1746	M	41	positiva
12	B04-991	F	23	negativa
13	B04-1308	F	28	negativa
14	B08-927	F	47	positiva
15	B06-103	F	31	positiva

RM = reação de Mitsuda

A avaliação histológica em cortes corados por hematoxilina e eosina dos 15 casos de hanseníase indeterminada revelou alterações epidérmicas numa minoria dos casos, sendo discretas e focais, tais como: alteração vacuolar e exocitose de linfócitos (33%), apoptose de queratinócitos (26%), atrofia (06%) e acantose (06%). Em nenhum dos casos foi observado espongiose ou paraqueratose. Os melanócitos estavam presentes em todos os casos em quantidades habituais.

Na derme havia infiltrado inflamatório mononuclear perivascular superficial e neural (peri ou intraneural) em todos os casos. O infiltrado

perivascular superficial foi leve na maioria dos casos (66%), moderado e acentuado em aproximadamente 27% e 07%, respectivamente. O infiltrado neural, que foi um pré-requisito para a seleção dos casos de HI, foi leve em 60% e moderado em 40% dos casos. A delaminação do perineuro foi observada em 26% dos casos. Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular profundo esteve presente em 93% dos casos, foi leve e moderado em aproximadamente, 86% e 14% dos casos, respectivamente. Em 40% dos casos havia infiltrado em torno de glândulas écrinas (leve em todos eles) e em 20% dos casos em torno do folículo pilosebáceo (aproximadamente 67% leve e 33% moderado). Os melanóforos foram observados em 14 dos 15 casos (93%), sendo estes localizados na derme papilar e em quantidade discreta.

Algumas alterações histológicas vistas à coloração de hematoxilina e eosina podem ser vistas nas Figuras 10, 11 e 12.

Figura 10 - A e B: Discreta alteração vacuolar da camada basal e exocitose de linfócitos nos casos 2 e 3, aumentos de 400x e 200x, respectivamente. C e D: presença de melanóforos na derme papilar nos casos 3 e 1, aumentos de 200x e 400x, respectivamente.

Figura 11 - A: Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular superficial e neural, caso 7, aumento de 200x. B: Detalhe (400x) do infiltrado inflamatório neural do caso 7. C: Infiltrado inflamatório mononuclear perivascular profundo, caso 11, aumento de 200x.

Figura 12 - Pele com infiltrado inflamatório mononuclear moderado perineural e intraneural, com delaminação do perineuro, caso 7, aumento de 400x.

O resultado dessa análise semiquantitativa das alterações histológicas em HI nos cortes corados por hematoxilina e eosina pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise semiquantitativa das alterações histológicas em 15 casos de HI corados por hematoxilina e eosina.

nº do paciente	Epiderme								Derme						
	Espongiose	Alteração vacuolar	Melanócito	Acantose	Atrofia	EL	PQ	QA	Infiltrado inflamatório mononuclear						DP
									PVS	PVP	N	PE	PFM	Melanófago	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	3	2	2	0	0	1	0
2	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
3	0	1	1	0	0	1	0	1	2	2	2	1	2	1	1
4	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
5	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	2	1	0	1	0
6	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
7	0	1	1	0	0	1	0	0	2	1	2	0	0	1	1
8	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
9	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
10	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	1	0
11	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
12	0	1	1	0	0	1	0	0	2	1	2	1	1	1	0
13	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
14	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
15	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0

Legenda: EL= Exocitose de linfócito; PQ= paraqueratose; QA = queratinócitos apoptóticos; PVS= perivascular superficial; PVP=perivascular profundo; N=neural (peri e intraneural); PE = periécrino; PFM = perifolicular ou perimascular; DP = delaminação do perineuro; NV= não visualizado.

Os resultados da pesquisa de bacilo por coloração de Fite-Faraco nas lesões histológicas foram colhidos nos laudos histopatológicos e expressos na Tabela 6 abaixo. Não foram realizados novos cortes do bloco de parafina para coloração de Fite-Faraco a fim de evitar desgaste do material emblocado. Dos 15 casos, 8 (53%) mostraram positividade para bacilos-álcool-ácido-resistentes. Em um dos casos não havia informação sobre bacilos (paciente 10).

Tabela 6 - Resultado da pesquisa de bacilos por coloração de Fite-Faraco em 15 casos de hanseníase indeterminada.

Número do paciente	Pesquisa bacilar
1	Negativa
2	Positiva
3	Positiva
4	Positiva
5	Negativa
6	Positiva
7	Negativa
8	Negativa
9	Positiva
10	?
11	Negativa
12	Positiva
13	Positiva
14	Negativa
15	Positiva

A pesquisa imuno-histoquímica de BCG revelou positividade em dois casos que eram negativos à histoquímica (casos 10 e 11), perfazendo um total de 10 casos em 15 (66%) onde se pode demonstrar a presença de antígeno bacilar, seja por método histoquímico ou imuno-histoquímico (Tabela 7). A Figura 13 mostra a positividade para BCG em um dos casos.

Figura 13 - Marcação imuno-histoquímica positiva para BCG em nervos do caso 10. A: aumento de 200x, B: aumento de 400x.

Tabela 7 - Resultado da pesquisa de antígeno bacilar (por técnica de Fite-Faraco ou imuno-histoquímica anti-BCG) dos 15 casos de HI.

Número do paciente	Pesquisa de antígeno bacilar
1	Negativo
2	Positivo
3	Positivo
4	Positivo
5	Negativo
6	Positivo
7	Negativo
8	Negativo
9	Positivo
10	Positivo
11	Positivo
12	Positivo
13	Positivo
14	Negativo
15	Positivo

Para verificar a correlação entre os parâmetros pesquisa de antígeno bacilar e reação de Mitsuda foram realizadas análises estatísticas de

correlação de Pearson, correlação não paramétrica de Spearman e Chi quadrado. Em nenhuma delas foi verificada correlação entre esses dois parâmetros ($p=0,1$) (Figura 14).

Figura 14 - Análise estatística da correlação de pesquisa de antígeno bacilar entre os grupos de reação de Mitsuda positiva e negativa dos 15 casos de HI.

Os resultados da análise quantitativa dos marcadores celulares, citocínicos e moleculares estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8 - Contagem dos marcadores celulares, citocínicos e moleculares *in situ* nas lesões de pele de 15 casos de hanseníase indeterminada

Número do paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CD1a	0,1672	0,0982	0,1552	0,2791	0,1621	0,1306	0,1125	0,1333	0,0524	0,1218	0,0381	0,123	0,0524	0,0295	0,1529
CD4	170.757	43.201	83.558	30.663	20.104	97.531	79.883	3.554	38.901	118.650	25.918	62.015	9.514	24.581	1.216
CD8	108.076	18.170	76.775	0	33.862	48.847	53.559	21.586	107.343	98.558	3.551	121.166	39.180	11.476	84.066
CD57	11.903	7.748	3.589	0	0	0	0	0	2.391	3.671	1.266	0	11.093	3.619	2,4
CD68	2.586	10,46	39.807	1.201	11.160	51.781	33.222	1.211	3,76	19.588	5.938	33.972	2.481	0	11.206
FXIIIa	358.276	184.254	173.707	201.074	78.935	270.880	317.995	266.548	281.241	210.007	234.937	138.381	159.898	127.055	232.751
S-100	36.841	7.785	30.200	13.412	48.429	27.823	37.667	22.080	6.943	21.031	3.720	24.953	13.049	18.532	81.404
iNOS	10.181		17.333	10.000	9.333	12.000	0		23.270	28.000	1.333	6.666			9.333
Granzima-B	5,33		1,33	0	0	0	0	2,9	0	10,66	0	0		1,33	2,66
Foxp3	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.660
TGF- β	16				8		0		10.666	1.333		8	12.444		
TLR-2	10.376	95.886	82.289	80.605	85.003	89.296	59.323	48.794	33.783	17.316	3.796	27.220	14.579	29.831	27.899
TLR-4	5.050	60.910	46.581	7.316	28.277	11.026	12.631	109.161	22.733	12.687	1.192	3.653	2.878	74.344	47.058
IL-1	5,33		5,33	0	5,33	0	0	0	0	0	0	2,66			4
IL-2R	5,33	6,85	6,66	0	9,6	9,6	5,33	22,66	2,66	2,66	5,33	9,33	0	0	2,66
IL-4	6,66	9,14	34,66	1,77	0	13,33	0	52,8	0	0	19,2	0	0	0	1,33
IL-6	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-8	0		0	0	8,88	0	0	1,45	2	10,66	0	0	0	0	2,66
IL-10	1,77		21,33	4	4	3,2	3,2	10,66	23,27	9,33	4,36	5,81		4	
IL-12	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-18	9,33	0	10,66	0	0	0	0	12	0	1,6	0	16		0	0
TNF- α	0		0	0	0	0	0	4,57	0	4	0	5,81	0	0	0
INF- γ	8,88		16	2,66	0	0	0	0	0	1,33	0	0		0	3,55
CD123	0		0		0	4,36	0	0	4,8	2,66	0	0	6	0	0

As lacunas em branco representam casos onde não foi possível realizar a contagem

Alguns marcadores estavam presentes em todos os casos, como CD1a, CD4, FXIIIa, S100, TLR-2 e TLR-4, enquanto que outros não foram expressos em nenhum dos casos, como IL-6 e IL-12. A frequência de casos positivos para os marcadores está expressa na Figura 15 abaixo.

Figura 15 - Frequência de casos positivos para os imunomarcadores celulares, citocínicos e moleculares.

Na análise gráfica em *dot-plot* das médias das quantidades destes marcadores, nota-se que os marcadores celulares FXIIIa, CD4 e CD8 foram expressos em mais que 50 células/mm² (Figura 16). A Figura 17 mostra a marcação imuno-histoquímica das células mais numerosas nas lesões de HI. Quanto às citocinas, as que tiveram expressão maior ou igual a 05 células/mm² foram iNOS, TGF- β , TLR-2, TLR-4, IL-2r, IL-4 e IL-10 (Figura 18).

Figura 16 - Análise gráfica da quantificação dos fenótipos celulares marcados por reação imuno-histoquímica em lesões de pele de hanseníase indeterminada.

Figura 17 - Marcação imuno-histoquímica das células mais numerosas nas lesões de HI, aumento de 200x. A: CD4 no caso 12. B: CD8 no caso 7. C: Fator XIIIa no caso 6.

Figura 18 - Análise gráfica da quantificação de citocinas e moléculas marcadas por reação imuno-histoquímica em lesões de pele de hanseníase indeterminada. A linha pontilhada refere-se ao limite arbitrário de relevância.

Comparando-se a média de quantidades dos marcadores celulares, citocínicos e de moléculas entre os grupos de pesquisa antigênica positiva e negativa, não há diferença significativa entre eles. A Figura 19 ilustra a comparação entre alguns marcadores.

Figura 19 - Comparação da média de quantidade de expressão de A) CD4, B) CD8, C) TLR-4 e D) IL-1 entre os grupos de pesquisa antigênica (pesq ag) negativa (0) e positiva (1).

Comparando-se a média de quantidades dos marcadores celulares, citocínicos e de moléculas entre os grupos de reação de Mitsuda positiva e negativa, há diferença significativa entre eles em dois marcadores, CD4 ($p=0.047$) e TLR-4 ($p=0.043$). A média de quantidade de CD4 foi maior no grupo Mitsuda negativo enquanto que a média de quantidade de TLR-4 foi maior no grupo Mitsuda positivo. A Figura 20 ilustra a comparação entre alguns marcadores.

Figura 20 - Comparação da média de quantidade de expressão de A) CD4, B) CD8, C) TLR-4 e D) IL-1 entre os grupos de reação de Mitsuda negativa (0) e positiva (1).

Quando se comparou células FXIIIa e CD1a positivas com a pele normal, pelo teste t de Student, esta análise mostrou quantidade significativamente maior de células FXIIIa positivas na pele de lesões de HI comparando-se com pele normal (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Comparação da quantidade de células positivas para FXIIIa/mm² entre HI e pele normal.

Figura 22 - Imunomarcacão de células positivas para FXIIIa (400x), A: caso 12, B: pele normal.

Quanto à expressão de CD1a, não houve diferença quantitativa estatisticamente significativa entre pele normal e pele com HI (Figuras 23 e 24).

Figura 23 - Comparação da fração de área epidérmica positiva para CD1a entre pele normal e pele com HI.

Figura 24 - Imunomarcacão de células positivas para CD1a (400x): A: caso 8, B: pele normal.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Revisitação dos aspectos histológicos da HI

O diagnóstico histológico de HI é um exercício difícil. Deve ser feito sempre associado a dados clínicos. Na ausência de bacilos, achados histopatológicos sugestivos podem apoiar o diagnóstico se houver estreita correlação com o quadro clínico.

5.1.1 O infiltrado inflamatório na HI

Observamos que sempre há inflamação, mesmo que leve, em torno dos vasos superficiais e de nervos. Na literatura as descrições histológicas do infiltrado inflamatório nesta fase são também de intensidade mínima, discreta^{1,8,55,61,62}, o que justifica valorizar a presença de poucas células mononucleares em lesões suspeitas. Em estudo que avaliou o diagnóstico de hanseníase entre patologistas foi mostrado baixa concordância entre eles, principalmente referente à forma HI. As diferenças se concentram na identificação da inflamação neural precoce, pois a inflamação na derme e o acometimento neural podem ser tão discretos que a interpretação tende a ser subjetiva⁹⁸.

A inflamação neural deve ser um pré-requisito para o diagnóstico de hanseníase indeterminada, uma vez que se trata de lesão pauci-inflamatória e com variada demonstração do bacilo. Descreve-se que a presença de *cuffing* (infiltrado inflamatório denso, concêntrico, bem delimitado) perineural seria uma das mais importantes características histológicas da HI e que ele seria suficiente para se firmar o diagnóstico, se houver correlação clínica^{1,8,44,55,61,62}.

Um importante marcador de especificidade da lesão é a delaminação do perineuro. Esta desorganização e desorientação do perineuro e do endoneuro,

embora pouco frequente nos nossos casos (26%), deve ser considerada muito sugestiva de hanseníase, independente da forma, conforme sugeriu Ridley⁵⁵.

O diagnóstico diferencial histopatológico de lesões cutâneas que exibem inflamação perineural envolve doenças como sífilis secundária, herpes, outras micobacterioses, esclerodermia, lupus eritematoso, dentre outras^{99,100}. Há descrição de inflamação intraneural em infecções cutâneas por herpesvirus, leishmaniose e borreliose (acrodermatite crônica atrófica)⁹⁹, porém essas doenças exibem contexto clínico tão díspar da hanseníase indeterminada, que dificilmente seriam confrontadas na histopatologia.

O infiltrado perivascular profundo que foi visto em todos os casos menos um, é outro forte indício da doença. Já a inflamação do folículo pilossebáceo e das glândulas écrinas é menos frequente e foi observada em menos da metade de nossa casuística.

A descrição clássica na literatura das lesões de HI é de inflamação mononuclear perivascular, peri e intraneural, em volta de folículos pilosos, glândulas écrinas e músculos pilo-erectores^{1,8,44,55,61,62}. A nossa pesquisa usou critérios muito restritos para firmar o diagnóstico clínico-patológico de HI e os achados histopatológicos deste estudo mostram que não é obrigatório o acometimento inflamatório concomitante de todos os microambientes cutâneos para estabelecer o diagnóstico de HI, continuando o comprometimento neural como o evento principal para o diagnóstico da HI.

5.1.2 O bacilo nas lesões de HI

É unânime que o encontro de BAAR estabelece um diagnóstico de segurança e é considerado o único achado que oferece evidência conclusiva de hanseníase nesta fase^{1,44,62}. A procura deve ser feita em aumento de 1000x com uso de óleo de imersão, no mínimo em 6 até 30 cortes^{44,101}. Portanto, é uma prática laboriosa e demorada o que talvez explique os “raros” achados de bacilos em casos de HI.

Os resultados de nossa casuística evidenciaram que aproximadamente em metade dos pacientes (53%) foram encontrados bacilos por técnica

histoquímica. Portanto, esses pacientes com HI são multibacilares de acordo com a OMS⁴¹, o que vai contra a classificação operacional do MS⁴³ que enquadra a HI como paucibacilar, junto com a forma tuberculoide. Os resultados obtidos com esse estudo sistematizado justificam a não concordância com a categorização da HI como sendo invariavelmente paucibacilar. Assim sendo a forma indeterminada de hanseníase não pode seguir as recomendações para tratamento metodicamente como se fosse paucibacilar. Se fossemos aplicar essa proporção do resultado da nossa casuística de modo universal, teríamos metade de pacientes HI tratados de forma inadequada (sub-tratados) e assim não ocorreria a interrupção da transmissão da doença. Do ponto de vista individual, o paciente que não fosse adequadamente tratado poderia evoluir para outras formas clínicas da doença.

Com o uso de técnica imuno-histoquímica foi possível detectar antígeno micobacteriano em dois casos que eram negativos ao Fite–Faraco, ressaltando a importância da imuno-histoquímica como meio bastante útil no diagnóstico de lesões iniciais suspeitas com resultado negativo para pesquisa de bacilo por método histoquímico. Antígenos micobacterianos podem ser demonstrados em cortes histológicos de lesões de hanseníase por técnica imuno-histoquímica anti-BCG porque *M. leprae* e BCG mostram extensas reações cruzadas antigênicas, e isso pode melhorar o diagnóstico histopatológico da HI^{51,52,102,103}. Este achado está de acordo com outros da literatura, que mostraram sensibilidade maior de demonstração dos antígenos micobacterianos usando anti-BCG que pelos métodos histoquímicos^{37,50,52}.

5.1.3 A epiderme e a HI

O achado de alterações da epiderme como alteração vacuolar da camada basal, exocitose de linfócitos, apoptose de queratinócitos, acantose e paraqueratose foram discretas e focais. Não foi encontrada menção na literatura a estas alterações histológicas na forma HI, talvez justamente pelo fato de estas alterações serem tão mínimas que podem passar despercebidas. A atrofia, vista somente em 06% dos nossos casos,

representou um achado conspícuo em todos os casos de HI estudados pelo grupo de Agarwal *et al.*³⁵. Esse achado poderia ser justificado por outros fatores (idade, topografia, exposição solar) que não a hanseníase. Na tentativa de estabelecer uma correlação entre a atrofia e os achados inflamatórios e de alterações dos ramúsculos nervosos na HI, frequentemente discretos e pouco pronunciados, não parece plausível que as discretas alterações dérmicas observadas possam levar a quadro de atrofia epidérmica. A espongiose não foi encontrada em nenhum dos nossos casos. Lazaro-Medina *et al.*¹⁰⁴ descreveram espongiose na epiderme e no epitélio folicular em caso de reação tipo I em pacientes com hanseníase dimorfa.

Em suma, as alterações encontradas na HI revelam que a epiderme não é totalmente passiva nessa forma da doença. Deve-se, portanto, ressaltar a importância de não invalidar uma suspeita de HI quando houver alterações discretas da epiderme em cortes histológicos de lesões suspeitas.

5.1.4 Melanófagos e melanócitos na HI

Achado interessante foi a presença de melanófagos em quantidade discreta na derme papilar em todos os casos menos um (93%). Esse achado pode representar uma explicação para a natureza hipocrômica das lesões de HI. Não há trabalhos na literatura que envolvam a avaliação de melanófagos na HI, o que aponta para a necessidade de mais estudos para confirmar a associação entre lesão hipocrômica e melanófagos. Outra hipótese para tentar explicar a hipocromia das lesões seria um distúrbio na transferência de melanossomos de melanócitos para queratinócitos¹⁰⁵.

Os melanócitos presentes em quantidades adequadas em todos os nossos casos, estão em concordância com os achados de Shereef *et al.*¹⁰⁶, que também não encontraram diferenças estatisticamente significantes da quantidade de melanócitos entre as áreas hipopigmentadas e pele normal adjacente em 3 casos de HI.

5.2 A reação de Mitsuda

Dividindo a amostra de 15 casos em dois grupos quanto ao resultado da reação de Mitsuda, positivo e negativo, houve diferença estatisticamente significativa somente na expressão de CD4 e TLR-4. A quantidade de CD4 foi maior no grupo Mitsuda negativo enquanto que a quantidade de TLR-4 foi maior no grupo Mitsuda positivo. Como há controvérsias quanto ao valor preditivo da reação de Mitsuda negativa em casos de HI^{1,12,37}, podemos considerar que somente o achado de TLR-4 pode ser interpretado, o que será feito mais adiante. Outro resultado encontrado nesses pacientes foi que a reação de Mitsuda não teve correlação com a pesquisa de antígeno bacilar.

A hipótese inicial de que os grupos com reações de Mitsuda positiva ou negativa teriam padrões diferentes de resposta imune nos casos HI, onde os casos Mitsuda positivo seriam um ambiente Th1, e aqueles com Mitsuda negativo seriam um ambiente Th2, não foi confirmada por esta casuística.

Deve-se assinalar que na época atual a definição e acompanhamento dos pacientes com hanseníase está cada vez menos dependente da reação de Mitsuda, principalmente pelas dificuldades técnicas de obtenção dos hansenomas usados para a confecção do material a ser empregado para as reações.

Considerando-se essa situação e os nossos resultados pode-se inferir um futuro onde a reação de Mitsuda perca cada vez mais força como ferramenta para decisão diagnóstica das formas da doença e da terapêutica a ser aplicada.

5.3 Caracterização do ambiente celular e citocínico da HI

Considerando-se a quantidade de células e citocinas expressas por técnica imuno-histoquímica, pode-se dizer que as lesões de HI são um ambiente com quantidades expressivas de células positivas para FXIIIa, CD4 e CD8, e com expressão importante das citocinas e moléculas IL-4, IL-10, IL-2r, TGF- β , TLR-2, TLR-4 e iNOS. Os números de 05 e 50 células/ mm² (*cut-offs* de

citocinas e células) foram estabelecidos de modo arbitrário, para que se pudesse elencar os marcadores em maior quantidade nas lesões de HI. Não há na literatura parâmetros de quantidade de células, citocinas e proteínas em lesões de HI para se fazer análise comparativa. Este perfil citocínico assinala uma tendência para um perfil Th2 de resposta imune no local das lesões. Trata-se do primeiro estudo que mostra a HI como um ambiente Th2, através da análise quantitativa do perfil citocínico por método imuno-histoquímico.

Stefani *et al.*¹⁰⁷ estudaram 39 casos que chamaram de hanseníase precoce, dentre eles 14 casos de HI e 25 casos de formas T e DT. Através de quantificação de mRNA por real-time PCR de citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4 e TNF- α , encontraram predominância de imunidade tipo 1, devido à detecção de IFN- γ e ausência de IL-4. No entanto um importante viés desse estudo foi incluir junto com a HI, uma maior parte de casos T e DT, o que provavelmente resultou na predominância de imunidade tipo I, não havendo análise isolada do grupo HI que poderia apresentar um perfil diferente de resposta imune.

5.3.1 Células dendríticas/apresentadoras de antígenos (CD1a, FXIIIa, CD123, S100 e CD68)

5.3.1.1 Dendrócitos dérmicos positivos para FXIIIa

Foi surpreendente a expressão de FXIIIa nos nossos casos de HI. Esteve presente em 100% dos casos, em quantidades médias maiores que 50 células/mm² e em quantidade significativamente maior quando comparada com a pele normal.

Os dendrócitos dérmicos positivos para FXIIIa foram caracterizados na pele normal e em doenças inflamatórias há aproximadamente 25 anos^{66,65,108,109}. Cerio *et al.*⁶⁶ atribuíram propriedades fagocíticas e de apresentação de antígenos a estas células. Descreveu-se aumento da quantidade dos DDFXIIIa em diversas doenças como dermatite atópica, psoríase⁶⁶, pápula fibrosa, dermatofibroma, morfeia, líquen escleroso, granuloma piogênico e sarcoma de Kaposi^{65,66}. Em doenças granulomatosas

como leishmaniose tegumentar Americana (LTA), cromoblastomicose, paracoccidiodomicose e outras micobacterioses, as células FXIIIa positivas são hipertróficas e dispostas ao redor do granuloma^{97,110}. Foi observado parasitismo destas células em casos de LTA, hanseníase históide e outras doenças infecciosas^{59,111}.

É notável a localização de quantidades aumentadas de DDFXIIIa ao redor dos capilares superficiais, o que sugere uma posição sentinela e estratégica dessas células, e permite inferir que o bacilo chegaria a pele primeiramente na derme, via capilar sanguíneo. Tal achado reforça a teoria de transmissão respiratória da doença.

O achado de quantidades maiores de células FXIIIa em pele com HI comparada com pele normal em nosso estudo é novo e levanta a possibilidade de que estas células desempenhem um papel importante na fase inicial da hanseníase¹¹².

5.3.1.2 Células de Langerhans

Se o bacilo nessa fase inicial da doença alcançasse a pele via epiderme, esperar-se-ia uma resposta de aumento da quantidade de células de Langerhans, reativas à entrada da bactéria na pele, o que não ocorreu nessa investigação e em outros estudos^{73,74}. Assim, a teoria da transmissão respiratória nesta fase se fortalece.

Há poucos trabalhos referentes a CL em HI encontrados na literatura, e ambos encontraram quantidades semelhantes entre pele normal e pele com HI^{73,74}. Narayanan *et al.*⁷⁴ estudaram 10 casos de HI, com IB negativo e reação de Mitsuda positiva, e encontraram a mesma distribuição e número de CL entre lesões de HI e controles de indivíduos sem a doença, porém a seleção destes 10 casos foi feita por critérios somente clínicos. Gimenez *et al.*⁷³ estudaram 10 casos de HI em tratamento (dapsona). Não encontraram diferença na média de CL/mm² entre a população normal e HI.

As células de Langerhans são consideradas participantes da fase indutiva da resposta imune mediada por células T ao *M. leprae* e são estimuladoras

potentes da proliferação de células T. Refletindo sobre os nossos achados do comportamento quantitativo das CL na forma indeterminada da doença quando comparada com a pele normal, pode-se especular que a ativação de CL é um evento temporalmente posterior na patogênese da hanseníase. Talvez a orientação inicial do perfil da resposta imune se dê pela ativação de outras células dendríticas (células dendríticas FXIIIa+, células dendríticas plasmocitoides ou células dendríticas S100+). As células de Langerhans devem ser especialmente recrutadas na forma tuberculoide da hanseníase, conforme mostram diversos estudos de quantidades maiores dessas células nas formas tuberculoides quando comparadas com as formas virchowianas^{13,59,71,72,73}.

5.3.1.3 Células dendríticas plasmocitoides

A expressão insignificante de CD123 encontrada em nossos casos sugere que esta célula não tem papel efetivo como apresentadora de antígeno nesta fase. Desconhecemos outros estudos de CDP na HI. Massone *et al.*⁶⁹ também não encontraram expressão destas células em nenhuma das formas estudadas (DV, VV, DT e TT). No entanto o achado de abundância destas células na reação reversa¹¹³, tornam necessários outros estudos para estabelecer seu papel na resposta imune da hanseníase.

5.3.1.4 Células dendríticas CD68+ e S100+

As expressões de CD68 e S100 foram equivalentes, tanto em termos de frequência de casos positivos como em quantidade média. Estiveram presentes em 100% e 93% dos casos, respectivamente. Porém as quantidades médias de ambas não foram superiores a 50 células/mm². Ressalte-se que a contagem de S100 foi feita na derme, portanto não contempla as marcações da epiderme de melanócitos e células de Langerhans. Na derme, foi ignorada a marcação de filetes nervosos. Um estudo mostrou quantidades maiores de células dendríticas positivas para S100 em pacientes com hanseníase TT e DT,

quando comparados com pacientes com formas VV e DV¹¹⁴. Outro estudo mostrou justamente o contrário¹¹⁵. Desconhecemos estudos de células S100 e CD68 na forma HI.

Os nossos resultados de células S100+ frequentes, porém pouco numerosas, poderia indicar uma papel menos importante das mesmas na apresentação de antígeno que os DDFXIIIa na HI.

O papel da apresentação de antígeno dos macrófagos CD68+ parece também ter menor significado que os DDFXIIIa, visto que comparece em quantidade significativamente menor.

Em suma, a expressão significativamente maior de DDFXIIIa em relação às outras células dendríticas na HI nos leva a crer que essas células sejam as principais APC na fase inicial da hanseníase.

5.3.2 Linfócitos T CD4 e CD8

Como os linfócitos CD4 e CD8 exibiram expressões quantitativas médias semelhantes, pode-se dizer que não houve uma tendência para um polo tuberculoide ou virchowiano nas lesões de HI, onde se verifica predominância de CD4 e de CD8, respectivamente. Os resultados parecem mostrar que os DDFXIIIa estão interagindo tanto com linfócitos CD4 quanto com CD8 de forma igualitária, sem preferência de resposta imune orientada para os polos Th1 ou Th2, nesta fase.

Encontramos então a relação CD4:CD8 de 1:1 nas lesões de HI. Desconhecemos referências na literatura sobre quantificações de CD4 e CD8 em lesões de HI. Mais estudos são necessários para validar esse achado.

5.3.3 TLR-2 e TLR-4

Dentre as expressões de citocinas e moléculas, a de TLR-2 e TLR-4 foi a de maior quantidade nas lesões de HI, com quantidade significativamente maior de TLR-4 no grupo Mitsuda positivo. No entanto parece que o *M. leprae*

é reconhecido principalmente pelo heterodímero TLR2/TLR1¹¹⁶. Krutzik *et al.*¹¹⁷ encontraram expressão mais forte de TLR-2 e TLR-1 em lesões de hanseníase tuberculoide quando as comparou com lesões virchowianas, e demonstraram que a expressão de TLR-1 e 2 foi inibida por IL-4. Nosso resultado pode sugerir que a entrada do bacilo nas APC se faça também por meio de TLR2/TLR4 na forma indeterminada.

5.3.4 iNOS

A sintase de óxido nítrico induzível é uma enzima responsável pela síntese de radicais reativos de nitrogênio, que em modelo murino, mostrou papel na eliminação de micobactérias. A expressão de iNOS é induzida durante ativação macrofágica por IL-1, IFN- γ e TNF- α ¹¹⁸. Em um estudo foi encontrada expressão maior no polo tuberculoide do que no virchowiano¹¹⁸. Apesar de não termos encontrado referência do comportamento de iNOS em HI, sua frequente e expressiva quantidade nos nossos 15 casos transmite a ideia de um ambiente de ativação de mecanismos bactericidas, embora sem resolução da doença.

5.3.5 Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 10 (IL-10)

IL-4 é o principal estímulo para o desenvolvimento de células Th2, sendo considerada a citocina de “assinatura” do grupo Th2. É produzida principalmente por linfócitos T CD4 do grupo Th2 e mastócitos. Assim como a IL-10, funcionam como fator de crescimento autócrino para células Th2 diferenciadas e ainda inibem o desenvolvimento das células Th1⁵⁷. A IL-10 é produzida principalmente por macrófagos ativados e células T reguladoras, portanto é um exemplo de regulador de *feedback* negativo. Inibe a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas, que é um estímulo crítico para a secreção de IFN- γ . Há relatos de níveis aumentados de IL-4 e IL-10 em

lesões virchowianas/dimorfos virchowianas^{84,119,120}, quando comparadas com lesões tuberculoides.

Na nossa casuística analisada as expressões de IL-4 e IL-10 foram importantes, presentes em mais de 05 células/mm² e em 53% e 80% dos casos, respectivamente. Juntas, favorecem um ambiente inflamatório com tendência Th2.

Esse resultado contrapõe-se ao encontrado por Stefani *et al.*¹⁰⁷, que não observaram níveis detectáveis de IL-4 mRNA por RT-PCR em lesões que os autores chamaram de hanseníase inicial, conforme prévia discussão no item 5.3. Nesse grupo os autores incluíram as formas HI, TT e DT. Achamos que para esclarecimento das quantidades de citocinas em hanseníase inicial, não devem ser englobados casos TT e DT, que mostram formação de granuloma, um fenômeno que não é consistente com fase inicial da hanseníase.

5.3.6 TGF- β

Produzida principalmente por macrófagos e algumas células T reguladoras, a principal ação no sistema imune é inibir a proliferação e função efetora de células T e a ativação de macrófagos⁵⁷. Desta forma, é uma citocina associada a resposta imune Th2. Na hanseníase, a literatura mostrou unanimidade na expressão de quantidades significativamente maiores de TGF- β nas lesões virchowianas quando comparadas com as tuberculoides^{120,121,122,123}.

Nesta pesquisa mostrou-se que o TGF- β expressou quantidades altas semelhantes a IL-10. Este resultado aliado às expressões de IL-4 e IL-10 colaboram para a ideia de um ambiente propício à permanência do *M.leprae* que a HI parece ser.

5.3.7 IL-2r

A IL-2 é o principal fator autócrino para a maioria das células T⁵⁷. É um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação de linfócitos T. A ativação das células T CD4 por antígenos e co-estimuladores estimula a transcrição do gene da IL-2, sua síntese e secreção. A IL-2 é secretada para dentro da sinapse imunológica formada entre a célula T e a APC. Os receptores a IL-2 nas células T também tendem a se localizar na sinapse e estão sempre expressos em células T-reg. A IL-2 é necessária para a sobrevivência e talvez para a função das células T-reg, participando, portanto na supressão de respostas T. Ainda a IL-2 aumenta a produção de outras citocinas efetoras, como IFN- γ e IL-4⁵⁷.

Na hanseníase foram encontradas quantidades maiores de células marcadas por IL-2 em lesões tuberculoideas que em lesões virchowianas^{119,120,124}, sugerindo que a resposta imune celular defectiva na HV parece estar associada com produção diminuída de IL-2.

Nos casos de HI investigados houve expressão de IL-2r em 80% das células e em quantidades médias maiores que 05 células/mm², provavelmente estimulando uma resposta T CD4 de padrão Th2 e favorecendo a produção de IL-4, contribuindo para um microambiente propício à manutenção das micobactérias no sítio da lesão.

5.3.8 Foxp3 - Resposta reguladora da inflamação

Os poucos estudos de Foxp3 em lesões *in situ* de hanseníase^{69,83,84} mostraram quantidades maiores nos pacientes em reação reversa comparando-se com pacientes com eritema nodoso Hansênico e hanseníase não reacional; e nas lesões virchowianas comparadas com lesões tuberculoideas, sugerindo assim um papel supressor de T-regs na hanseníase virchowiana⁸⁴.

Considerando a expressão praticamente nula de Foxp3 nos 15 casos de HI por nós estudados (somente um caso expressou o marcador e em quantidade baixa), poderia se postular que a HI representa uma forma onde

não ocorra resposta imune reguladora expressiva. No entanto, Parente *et al.*¹²⁵ estudaram Foxp3 em 9 casos de HI e encontraram expressão da molécula em 100% deles. Encontraram aumento significativo na quantidade de Foxp3 na reação reversa comparando-se com a forma indeterminada, DT e VV. São necessários mais estudos da expressão de Foxp3 em lesões de HI, para estabelecer se existe ou não uma resposta T reguladora nesta fase.

5.3.9 IL-12 e IL-6

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune natural inicial a microrganismos intracelulares e é um indutor essencial da imunidade mediada por células. Produto de APC ativadas, estimula a diferenciação de células T *naïves* em células efectoras do grupo Th1, a expansão clonal de células T CD8 e a secreção de IFN- γ por células T e NK. É crítica para iniciar uma sequência de respostas que envolvem macrófagos, células NK e linfócitos T, que resulta na erradicação de microrganismos intracelulares⁵⁷.

A ausência de IL-12 justifica um ambiente de tendência a Th2 como o verificado em nossos casos, com níveis altos de IL-10 e IL-4. A ausência de IL-12 sugere também um ambiente onde não está ocorrendo a eliminação do bacilo. Os níveis de IL-12 iguais a zero encontrados no nosso estudo reforçam a ideia de um ambiente sem resposta Th1.

A IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, endotélio vascular, fibroblastos e células T ativadas, em resposta a citocinas como IL-1 e TNF α com papel definido na imunidade inata. Há evidências que a IL-6 promove a reação imune mediada por células ao inibir a geração e ação das T-regs⁵⁷. Não encontramos quantidades significativas de IL-6, IL-1 e TNF- α nos nossos casos, o que estaria de acordo com um ambiente sem resposta inflamatória aguda.

5.3.10 IFN- γ

É a principal citocina ativadora de macrófagos e considerada a citocina de “assinatura” da resposta Th1. É produzida por células NK, células T CD4 Th1 e células T CD8. O IFN- γ acentua a função microbicida dos macrófagos mediante a estimulação da síntese de intermediários reativos de oxigênio e de óxido nítrico. Promove a diferenciação de células T CD4 *naïves* para o subgrupo Th1 e inibe a proliferação de células Th2. No cenário de imunidade natural as células NK secretam IFN- γ em resposta a IL-12 ou outros ligantes. Na imunidade adquirida, o IFN- γ é produzido por células T depois de estímulo antigênico e sua produção é acentuada por IL-12 e IL-18⁵⁷. Células positivas para IFN- γ são mais numerosas em lesões tuberculoides que em virchowianas⁷¹.

A baixa expressão de IFN- γ (média abaixo de 05 células/mm²) verificada em nosso estudo é esperada frente à pequena quantidade de células NK e IL-12 vistas nas lesões, e reforça a tendência de resposta Th2 na HI.

5.3.11 TNF- α

É o principal mediador de respostas inflamatórias agudas a bactérias gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. É produzida por fagócitos mononucleares ativados, células T estimuladas por antígeno, células NK e mastócitos. O estímulo mais potente para desencadear a produção de TNF- α por macrófagos é o encontro do TLR com LPS (lipopolissacarídeo) e outros produtos microbianos. TNF- α é essencial para a formação e manutenção dos granulomas e células positivas para TNF- α são mais numerosas em lesões tuberculoides que em virchowianas¹²⁰.

Uma vez que o IFN- γ aumenta a síntese de TNF- α por macrófagos estimulados⁵⁷, não poderíamos esperar quantidades significativas de TNF- α nos nossos casos de HI (quantidade média próximo de zero), por não haver níveis importantes de IFN- γ .

5.3.12 IL-1 β

A IL-1 age em conjunto com o TNF- α na imunidade natural e na inflamação. Sua produção por fagócitos mononucleares é induzida por produtos bacterianos como LPS e citocinas como TNF- α . Os efeitos biológicos da IL-1 são semelhantes aos do TNF- α e dependem da quantidade produzida. Em baixas concentrações age como mediador local, aumentando a adesão de leucócitos ao endotélio. Em maiores quantidades tem efeito endócrino, induzindo febre, síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e produção de neutrófilos e plaquetas pela medula óssea⁵⁷.

Os resultados acerca das quantidades de células IL-1 positivas em hanseníase são conflitantes, ora com quantidades maiores em lesões tuberculoides¹²⁰ ora em lesões virchowianas⁷¹. No estudo de Volc-Platzer *et al.* todos os 21 pacientes exceto um estavam em tratamento⁷¹, enquanto que Arnoldi *et al.*¹²⁰ analisaram mais pacientes (57) sendo alguns deles em tratamento. Seria importante que estudos a respeito de IL-1 na hanseníase envolvessem pacientes sem tratamento, para que não houvesse modificação ou alteração da resposta imune.

A IL-1 β foi detectada somente em 27% dos nossos casos e em níveis muito baixos comparando-se com outras citocinas, mostrando mais uma vez que na HI não há configuração de uma resposta inflamatória aguda.

5.3.13 CD57

É expresso em células NK maduras e em células T CD8 em pessoas com ativação imune crônica. As células NK produzem IFN- γ e têm função citotóxica espontânea^{57,126}.

A pequena expressão de CD57 nos nossos casos de HI, em quantidades médias próximas de zero, pode refletir uma participação menor da imunidade inata no local das lesões, onde não se demonstra uma resposta inflamatória aguda.

5.3.14 Granzima B

São moléculas presentes nos grânulos de linfócitos T citotóxicos e células NK, necessárias para a destruição eficiente das células-alvo pelos linfócitos T citotóxicos⁵⁷. Esteve presente em menos da metade dos casos e em quantidade média inferior a 05 células/mm², sendo esta quantidade sugestiva de prejuízo de função citotóxica nas lesões de HI.

5.3.15 IL-18

A IL-18 é produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas e tem como função principal acentuar a produção de IFN- γ por células T, um efeito sinérgico com IL-12⁵⁷. Na nossa amostra, a expressão de IL-18 foi em quantidades médias inferiores a 05 células/mm² e em apenas 33% dos casos. Esse resultado está consoante a um ambiente sem resposta Th1, como tem mostrado ser essas lesões de HI estudadas.

5.3.16 IL-8

A IL-8 é produzida por linfócitos Th2 e, assim como outras citocinas deste padrão de resposta inflamatória, suprime a atividade macrofágica¹⁴⁵. Tem a habilidade de recrutar neutrófilos, monócitos e linfócitos T para o sítio de infecção micobacteriana^{127,128}^{127,128}. Foi verificada maior expressão de IL-8 em monócitos de lesões de hanseníase virchowiana, comparadas com pele normal¹²⁹. Também foi observada maior expressão em lesões reacionais quando comparadas com não reacionais nas formas DT e DV¹²⁸. IL-8 não é uma citocina frequentemente investigada em lesões “in situ” de hanseníase e não foram encontrados relatos de observação do comportamento de IL-8 na forma indeterminada. No nosso estudo podemos interpretar que a quantidade de IL-8 foi baixa, uma vez que as quantidades médias foram inferiores a 05 células/mm² e que a expressão de IL-8 foi pouco frequente (33% dos casos).

Ela portanto não deve ser o principal fator recrutador de linfócitos T nas lesões de HI.

5.4 Limitações do estudo

Nossa casuística levanta alguns questionamentos e considerações. Partimos de 112 casos laudados como HI no laboratório de Patologia do HLSSL num período de 10 anos e chegamos a 15 no final. São vários os motivos de tal afunilamento. O registro do resultado da reação de Mitsuda foi o maior responsável pela redução dramática no número de casos, pois a princípio houve a hipótese de que os grupos Mitsuda positivo e negativo seriam significativamente diferentes em termos de quantidade de células, citocinas e moléculas, e então poder-se-ia diferenciar lesões histológicas de pacientes positivos de negativos. Depois, muitos casos que exibiam quadro histológico de HI (infiltrado linfocitário sem formação de granulomas e sem macrófagos espumosos) na verdade correspondiam clinicamente a outras formas da doença, isso pôde ser verificado após a análise do prontuário desses pacientes. Essa discrepância entre achados clínicos e histológicos parece não ser exclusiva da forma indeterminada, sendo relatada em todos os grupos da doença, porém parece que a discordância clínico-histológica é máxima em casos HI e mínima em casos virchowianos^{130,131}. A presença de agrupamentos de histiócitos epitelioides com células gigantes multinucleadas eliminou um caso, porque consideramos que a formação de granuloma não possa ser um evento de fase inicial na hanseníase. O último critério de exclusão aplicado foi a ausência de inflamação neural, que subtraiu 3 casos numa amostra de 18, chegando-se ao número final.

Ademais, o estudo se refere a uma forma clínica rara da doença⁹¹⁻⁹⁴, tornando difícil se alcançar uma casuística de impacto. A escolha do Hospital Lauro de Souza Lima teve, dentre outras motivações, a de atingir o maior número de casos possível, por se tratar de uma Instituição de referência em hanseníase.

Quanto ao fato de incluir casos com pesquisa bacilar negativa na população de HI, pudemos demonstrar que o grupo de pesquisa antigênica negativa era semelhante ao grupo de pesquisa antigênica positiva, devido ao fato das quantidades dos marcadores celulares, citocínicos e moleculares não diferirem significativamente entre os grupos (Figura 15).

Ainda, em estudo prévio com 18 casos de HI¹¹² (que incluíram 3 casos sem inflamação neural), separamos dois grupos, com e sem demonstração de antígeno bacilar, que foram chamados respectivamente de HI confirmada e HI suspeita. Nesse estudo os DDFXIIIa também foram mais numerosos nas lesões de HI (suspeitas e confirmadas) em relação a pele normal. Ainda, mostrou-se que a quantidade de DDFXIIIa em HI confirmada e suspeita não diferiu significativamente, levando a supor que estes grupos são homogêneos ou semelhantes. Por este motivo, além de outros como história epidemiológica dos pacientes verificada através de prontuário, consideramos seguro trabalhar com casos que não demonstraram antígeno bacilar.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1- O microambiente inflamatório nas lesões de HI é caracterizado por expressões significativas de TLR 2 e 4, FXIIIa, T CD4, T CD8, IL-2r, IL-4, IL-10, iNOS e TGF- β . Em face da expressão importante de IL-4, IL-10 e TGF- β , configura-se uma tendência de resposta imune para o polo Th2, o que propicia um ambiente de tolerância à permanência do bacilo e consequente escape dos fenômenos bactericidas do hospedeiro.
- 2- A imunidade inata não é expressiva nas lesões de HI, acontecimento que é evidenciado pelo pequeno número de células NK e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 IL-12) no local das lesões. Esses fatos se correlacionam com os aspectos histopatológicos analisados que não demonstram fenômenos exsudativos ou polimorfonucleares participando do processo inflamatório dérmico
- 3- Na HI não se configurou reposta imune de perfil Th1, visto que a expressão de IFN- γ ocorreu em quantidade média abaixo de 05 células/ mm² e esse fenômeno independeu da reação de Mitsuda positiva ou negativa.
- 4- Na HI a expressão notável de FXIIIa (em 100% dos casos, em quantidade média maior que 50 células /mm², e em quantidades significativamente maiores que a pele normal e que outras células dendríticas nas lesões) leva-nos a candidatar os dendróciots dérmicos positivos para FXIIIa como as principais células apresentadoras de antígeno na fase precoce da hanseníase, deixando em segundo plano a participação das tradicionais células de Langerhans (que não diferiram em quantidade com a pele normal).

- 5- A HI não deve ser considerada sistematicamente como uma forma paucibacilar e assim ser tratada, afirmativa que tem como base o encontro frequente de bacilos nas lesões evidenciados por coloração histoquímica de Fite-Faraco.
- 6- Na HI a comparação dos achados fenotípicos, citocínicos e moleculares entre os grupos de pacientes Mitsuda positivo e negativo não demonstrou diferenças quanto à resposta imune no local da lesão e não houve correlação com a pesquisa do antígeno bacilar nas lesões. Levanta-se então um questionamento sobre a reação de Mitsuda na HI ter a capacidade de prever a posterior definição da orientação do polo evolutivo da doença (tuberculoide ou virchowiano).

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Opromolla DVA. (Micobactérias) In: *Noções de hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos "Dr Reynaldo Quagliato"; 2000.
2. Available from: <http://www.who.int/lep/en/>.
3. [Cited Jan 14 2015]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/01/Dados-2013.pdf>.
4. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol*. 2014 Mar-Apr;89(2):205-18.
5. Rongioletti F, Gallo R, Cozzani E, Parodi, A Leprosy: A diagnostic trap for dermatopathologists in no endemic area. *The American Journal of Dermatopathology*. 2009 August;31(6):607-10.
6. Lockwood DN, Reid AJ. The diagnosis of leprosy is delayed in the United Kingdom. *QJM*. 2001 Apr;94(4):207-12.
7. [Cited Jan 21 2015]. Available from: http://www.who.int/lep/resources/Guide_Brasil_P.pdf.
8. Sampaio SAP, Rivitti EA. hanseníase. In: *Dermatologia*. 3a ed. rev. e ampl. São Paulo: Artes Médicas; 2007.
9. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, Li W, Nair RG. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. 2008 Dec;130(6):856-64.
10. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes WG, Gomez-Flores M, Ocampo-Candiani J, Busso P, Singh P, Cole ST. Case of diffuse lepromatous leprosy associated with "Mycobacterium lepromatosis". *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4366-8. doi: 10.1128/JCM.05634-11. Epub 2011 Oct 19.
11. Jessamine PG, Desjardins M, Gillis T, Scollard D, Jamieson F, Broukhanski G, Chedore P, McCarthy A. Leprosy-like illness in a patient with Mycobacterium lepromatosis from Ontario, Canada. *J Drugs Dermatol*. 2012 Feb;11(2):229-33.
12. Seminário sobre histopatologia da hanseníase. *Seminário Aymorés da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo*: Dr Raul Fleury. Botucatu e Barú, agosto de 1973. Não publicado.

13. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):338-81.
14. Bhamidi S, Scherman MS, Jones V, Crick DC, Belisle JT, Brennan PJ, McNeil MR. Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2011 Jul 1;286(26):23168-77.
15. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet.* 2004;363:1209-19.
16. Available from: <http://genolist.pasteur.fr>
17. Ghorpade AK. Transepidermal elimination of *Mycobacterium leprae* in histoid leprosy: A case report suggesting possible participation of skin in leprosy transmission. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2011;77:59-61.
18. Satapathy J, Kar BR, Job CK. Presence of *Mycobacterium leprae* in epidermal cells of lepromatous skin and its significance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2005 Jul-Aug;71(4):267-9.
19. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Mar;78(3):518-21.
20. Kotteeswaran G, Chacko CJ, Job CK. Skin adnexa in leprosy and their role in the dissemination of *M. leprae*. *Lepr India.* 1980 Oct;52(4):475-81.
21. *Transmission of leprosy.* [Cited Jul 28 2013]. Available from: <http://www.who.int/lep/transmission/en/>.
22. Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev.* 2004 Dec;75(4):310-26.
23. Takahashi MD, Andrade Junior HF, Wakamatsu A, Siqueira S, De Brito T. Indeterminate Leprosy: Histopathological and Histochemical Predictive Parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. *Int J Lepr.* 1991;59(1):12-9.
24. Morgado de Abreu MA, Roselino AM, Enokihara M, Nonogaki S, Prestes-Carneiro LE, Weckx LL, Alchorne MM. *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jan;20(1):59-64.
25. Chacko CJ, Bhanu T, Victor V, Alexander R, Taylor PM, Job CK. The significance of changes in the nasal mucosa in indeterminate, tuberculoid and borderline leprosy. *Lepr India.* 1979 Jan;51(1):8-22.

26. Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr Rev*. 1998 Dec;69(4):358-66.
27. Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, Rodrigues LS, Oliveira AV, Bermudez LE, Pessolani MC. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesions by surface proteome analysis. *Infect Immun*. 2013 Jul;81(7):2645-59.
28. Available from: <http://www.who.int/wer/2012/wer8734.pdf>.
29. *Microbiology of M. leprae*. [Cited Jul 28 2013]. Available from: <http://www.who.int/lep/microbiology/en/>.
30. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *J Leukoc Biol*. 1986 Nov;40(5):645-56.
31. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gormus BJ, Baskin GB, Wolf RH, Gerone PJ. Leprosy as a zoonosis: an update. *Acta Leprol*. 1988 Jan-Mar;6(1):51-60.
32. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.
33. Thakkar S, Patel SV. Clinical profile of leprosy patients: a prospective study. *Indian J Dermatol*. 2014 Mar;59(2):158-62.
34. Araújo MG. Leprosy in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 May-Jun;36(3):373-82.
35. Agarwal US, Handa AK, Mathur D, Mehta RD, Mittal A, Dhar N, Mathur NK. Hypopigmented lesions in early leprosy--a clinical and histological study. *Indian J Lepr*. 1990 Oct-Dec;62(4):416-21.
36. Mc Kee PH, Calonje E, Granter SR. *Infectious diseases of the skin in Pathology of the skin with clinical correlations*. Vol 1. 3rd edition. Elsevier; 2005.
37. Takahashi MD, Andrade Junior HF, Wakamatsu A, Siqueira S, De Brito T. Indeterminate Leprosy: Histopathological and Histochemical Predictive Parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. *Int J Lepr*. 1991;59(1):12-9.
38. Singhi MK, Kachhawa D, Ghiya BCA retrospective study of clinico-histopathological correlation in leprosy. *Indian J Pathol Microbiol*. 2003 Jan;46(1):47-8.

39. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002 Jul-Ago;35(4):365-75.
40. [Cited Jan 21 2015]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniaze/11295-informacoes-tecnicas>.
41. [Cited Jan 21 2015]. Available from: Classification of leprosy. Disponível em: <http://www.who.int/lep/classification/en/>.
42. Rao PN, Pratap D, Ramana Reddy AV, Sujai S. Evaluation of leprosy patients with 1 to 5 skin lesions with relevance to their grouping into paucibacillary or multibacillary disease. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2006 May-Jun;72(3):207-10.
43. [Cited Jan 21 2015]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniaze/11295-informacoes-tecnicas>.
44. Fine PE, Job CK, McDougall AC, Meyers WM, Ponnighaus JM. Comparability among histopathologists in the diagnosis and classification of lesions suspected of leprosy in Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1986 Dec;54(4):614-25.
45. Sarno EN, Duppre NC, Sales AM, Hacker MA, Nery JA, Matos HJ. Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec;107(8):1054-9.
46. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. *An Bras Dermatol*. 2014 May-Jun;89(3):389-401.
47. Harboe M. Overview of host-parasite relations. In: Hastings RC, Opromolla DVA. *Leprosy*. 2nd edition. Ed Churchill Livingstone; 1994. 87-112.
48. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003 May;9(5):525-32.
49. Silva VP, Fonseca HH, Sens MM, Bender AT. Indeterminate leprosy and lepromatous index case: four cases in the same family. *An Bras Dermatol*. 2013 Nov-Dec;88(6 Suppl 1):105-8.
50. Weng XM, Chen SY, Ran SP, Zhang CH, Li HY. Immuno-histopathology in the diagnosis of early leprosy. *Int J Leprosy*. 2000;68(4):426-32.

51. Barbosa Júnior Ade A, Silva TC, Patel BN, Santos MI, Wakamatsu A, Alves VA. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. *Pathol Res Pract*. 1994 Sep;190(8):782-5.
52. Natrajan M, Katoch K, Katoch VM, Bharadwaj VP. Enhancement in the histological diagnosis of indeterminate leprosy by demonstration of mycobacterial antigens. *Acta Leprol*. 1995;9(4):201-7.
53. Banerjee S, Biswas N, Kanti Das N, Sil A, Ghosh P, Hasanoor Raja AH, Dasgupta S, Kanti Datta P, Bhattacharya B Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. *Int J Dermatol*. 2011 Dec;50(12):1522-7.
54. Shi L, Yajima M, Kawatsu K, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Endoh M. Comparison of polymerase chain reaction, immunohistochemistry and conventional histopathology in the diagnosis of early leprosy in Sichuan Province of China. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2000 Nov;69(3):147-55.
55. Ridley DS. *La biopsia de piel en la lepra Interpretación histológica y aplicación clínica*. Segunda edición. Documenta Geigy; 1976.
56. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Toll-like_receptor.
57. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
58. Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol*. 2009 Dec;10(12):1237-44.
59. Quaresma JAS, de Oliveira MF, Ribeiro Guimarães AC, de Brito EB, de Brito RB, Pagliari C, de Brito AC, Xavier MB, Seixas Duarte MI. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of Mycobacterium leprae infection. *Am J Dermatopathol*. 2009 Aug;31(6):527-31.
60. Sandgren KJ, Smed-Sörensen A, Forsell MN, Soldemo M, Adams WC, Liang F, Perbeck L, Koup RA, Wyatt RT, Karlsson Hedestam GB, Loré K. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently capture HIV-1 envelope glycoproteins via CD4 for antigen presentation. *J Immunol*. 2013 Jul 1;191(1):60-9.
61. McKee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the skin with clinical correlations. Vol 1. 3rd edition. 2005
62. Elder DE, Elenitsas R, Johnson Jr BJ, Murphy GF. *Lever's Histopathology of the skin*. 9th edition; 2005.
63. Weedon D. *Weedon's skin pathology*. 3rd edition. Elsevier; 2010. p. 564.

64. Estrada JA, Pierard GE. Factor-XIIIa-Positive Dendrocytes and the dermal microvascular unit. *Dermatologica*. 1990;180:51-3.
65. Cerio R. Dermal dendrocytes and factor XIIIa in normal and pathological skin. *Ann Dermatol Venereol*. 1993;120(1):53-7.
66. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol*. 1989 Oct;121(4):421-31.
67. Cerio R, Spaul J, Oliver GF, Jones WE. A study of factor XIIIa and MAC 387 immunolabeling in normal and pathological skin. *Am J Dermatopathol*. 1990 Jun;12(3):221-33.
68. Martinuzzo ME, de Larrañaga GF, Forastiero RR, Pelegri Y, Fariña MH, Alonso BS, Kordich LC, Carreras LO. Markers of platelet, endothelial cell and blood coagulation activation in leprosy patients with antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Jul-Aug;20(4):477-83.
69. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini AP, Parente JN, Brunasso AM, Puntoni M, Clapasson A, Noto S, Cerroni L. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol*. 2010 May;32(3):251-6.
70. Kar PK, Arora PN, Ramasastry CV, Sayal SK, Dhaka RS. A clinico-pathological study of macular lesions in leprosy. *Indian J Lepr*. 1994 Oct-Dec;66(4):435-42.
71. Volc-Platzer B, Stemberger H, Luger T, Radaszkiewicz T, Wiedermann G. Defective intralesional interferon-gamma activity in patients with lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1988 Feb;71(2):235-40.
72. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):48-54.
73. Gimenez MF, Gigli I, Tausk FA. Differential expression of Langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. *Br J Dermatol*. 1989 Jul;121(1):19-26.
74. Narayanan RB, Natarajan M, Katoch K, Bagga AK. CD1 positive epidermal Langerhans cells in indeterminate leprosy. *Acta Leprol*. 1988 Jan-Mar;6(1):29-34.
75. Longley J, Haregewoin A, Yemaneberhan T, Warndorff van Diepen T, Nsibami J, Knowles D, Smith KA, Godal T. In vivo responses to *Mycobacterium leprae*: antigen presentation, interleukin-2 production, and immune cell phenotypes in naturally occurring leprosy lesions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1985 Sep;53(3):385-94.

76. Modlin RL Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994 Jun;102(6):828-32.
77. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Uszynski ST, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Rollinghoff M, Sarno EN, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nature Medicine*. 2001;7:174-9.
78. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4⁺ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Jul 25;7(7):e2338.
79. Quaresma JA, Aarão TL, Sousa JR, Botelho BS, Barros LF, Araujo RS, Rodrigues JL, Prudente DL, Pinto DS, Carneiro FR, Fuzii HT. Th17 cytokines expression in leprosy skin lesions. *Br J Dermatol*. 2014 Dec 15. doi: 10.1111/bjd.13608.
80. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jan 16;8(1):e2639.
81. Voorhis WCV, Kaplan G, Sarno EN, Horwitz MA, Levis WR, Nogueira N, Hair LS, Gattass CR, Arrick BA, Cohn ZA. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N Engl J Med*. 1982 Dec 23;307(26):1593-7.
82. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4⁺CD25⁺ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(4):513-20.
83. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, Yamashitafuji TM, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 May;86(5):878-83.
84. Solomon GJ, Magro CM. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol*. 2008 Nov;35(11):1032-9.
85. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. FoxP3 provides competitive fitness to CD4⁺CD25⁺ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur J Immunol*. 2014 Feb;44(2):431-9.
86. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van Schip JJ, Abebe M, Hussein J, Khadge S, Neupane KD, Hagge DA, Jordanova ES, Aseffa A, Ottenhoff TH, Geluk A. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 10;8(4):e2773.
87. Aung T, Kitajima S, Nomoto M, En J, Yonezawa S, Arikawa I, Goto M. Mycobacterium leprae in neurons of the medulla oblongata and spinal cord in leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 Apr;66(4):284-94.

88. Lee KH, Moon KS, Yun SJ, Won YH, Lee JH, Lee MC, Jung S. Brain involvement by leprosy presenting as a frontal cystic lesion. *J Neurosurg.* 2014 Jul;121(1):184-8.
89. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176(2):530-2
90. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis.* 2002 Dec 1;186(11):1687-91
91. Job CK, Baskaran B, Jayakumar J, Aschhoff M. Histopathologic evidence to show that indeterminate leprosy may be a primary lesion of the disease. International Journal of Leprosy and other mycobacterial diseases. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1997 Dec;65(4):443-9.
92. Pandhi RK, Khanna N, Sekhri R. Leprosy in resettlement colonies of Delhi. *Indian J Lepr.* 1995 Oct-Dec;67(4):467-71.
93. Silva AR, Santos AR, Santos GM, Silva VE, Gonçalves Eda G. Leprosy in Buriticupu, state of Maranhão: active search in the general population. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Mar-Apr;45(2):199-202.
94. Jindal N, Shanker V, Tegta GR, Gupta M, Verma GK. Clinico-epidemiological trends of leprosy in Himachal Pradesh: a five year study. *Indian J Lepr.* 2009 Oct-Dec;81(4):173-9.
95. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.
96. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, Andrade HF Jr, Vasconcelos PF, Duarte MI. Revisiting the liver in human yellow fever: vírus-induce apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology.* 2006;345:22-30.
97. Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003;25(2):107-12.
98. Shivaswamy KN, Shyamprasad AL, Sumathy TK, Ranganathan C, Agarwal V. Clinico histopathological correlation in leprosy. *Dermatol Online J.* 2012 Sep 15;18(9):2.
99. Abbas O, Bhawan J. Cutaneous perineural inflammation: a review. *J Cutan Pathol.* 2010 Dec;37(12):1200-11.

100. Jayakumar J, Aschhoff M, Job CK. A case of morphoea with dermal neuritis as in indeterminate leprosy. *Indian J Lepr.* 1997 Oct-Dec;69(4):407-9.
101. Sarkar R, Kaur I, Das A, Sharma VK. Macular lesions in leprosy: a clinical, bacteriological and histopathological study. *J Dermatol.* 1999 Sep;26(9):569-76.
102. Mshana RN, Belehu A, Stoner GL, Harboe M, Haregewoin A. Demonstration of mycobacterial antigens in leprosy tissues. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1982;50:1-10.
103. Schettini AP, Ferreira LC, Milagros R, Schettini MC, Pennini SN, Rebello PB. Enhancement in the histological diagnosis of leprosy in patients with only sensory loss by demonstration of mycobacterial antigens using anti-BCG polyclonal antibodies. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001;69:335-40.
104. Lazaro-Medina A, Tianco EA, Avila JM Additional markers for the type I reactional states of borderline leprosy. *Am J Dermatopathol.* 1990 Aug;12(4):417-21
105. Westerhof W A possible dysfunction of melanosome transfer in leprosy: an electron-microscopic study. *Acta Derm Venereol.* 1977;57(4):297-304.
106. Shereef PH, Thomas M. Hypopigmented macules in leprosy - a histopathological and histochemical study of melanocytes. *Indian J Lepr.* 1992 Apr-Jun;64(2):189-91.
107. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL; Brazilian Leprosy Study Group. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *J Infect Dis.* 2003 Oct 1;188(7):1024-31.
108. Cerio R, Spaul J, Jones EW. Identification of factor XIIIa in cutaneous tissue. *Histopathology.* 1988 Sep;13(3):362-4.
109. Monteiro MR, Murphy EE, Galaria NA, Whitaker-Menezes D, Murphy GF. Cytological alterations in dermal dendrocytes in vitro: evidence for transformation to a non-dendritic phenotype. *Br J Dermatol.* 2000 Jul;143(1):84-90.
110. Pagliari C, Sotto MN. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. *Medical Mycology.* 2002;40:407-10
111. Sotto MN, Halpern I, Kauffman MR, Pagliari C. Factor XIIIa+ dermal dendrocyte parasitism in American tegumentary leishmaniasis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2010 Feb;32(1):15-8.
112. de Alvarenga Lira ML, Pagliari C, Silva AA, Andrade HF Jr, Duarte MI. Dermal dendrocytes FXIIIa+ are essential antigen-presenting cells in

indeterminate Leprosy. *Am J Dermatopathol*. 2014 Oct 31. [Epub ahead of print.

113. Andrade PR, Amadeu TP, Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN. CD123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type 1 reaction. *Br J Dermatol*. 2015 Jan;172(1):268-71.
114. Camargo LH, Caldas ML, Neira M, Sarmiento L. Image analysis to quantify S100-positive dendritic cells in leprosy-affected skin. *Biomedica*. 2003 Jun;23(2):131-3.
115. Cuevas-Santos J, Contreras F, McNutt NS. Multibacillary leprosy: lesions with macrophages positive for S100 protein and dendritic cells positive for Factor 13a. *J Cutan Pathol*. 1998 Nov;25(10):530-7
116. Heath W, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature Immunology*. 2013;14(10):978-85.
117. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003;9:525-32.
118. Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol*. 1998 Sep;113(3):438-42.
119. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):277-9. Erratum in: *Science*. 1992 Jan 3;255(5040):12.
120. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*. 1990 Oct;137(4):749-53.
121. Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol*. 1996 Mar;148(3):911-7
122. Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernández-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand J Immunol*. 2003 Mar;57(3):279-85.
123. Aarão TL, Esteves NR, Esteves N, Soares LP, Pinto Dda S, Fuzii HT, Quaresma JA. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microb Pathog*. 2014 Dec;77:66-72.

124. Modlin RL, Hofman FM, Horwitz DA, Husmann LA, Gillis S, Taylor CR, Rea TH. In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. *J Immunol.* 1984 Jun;132(6):3085-90.
125. Parente JN, Talhari C, Schettini AP, Massone C. T regulatory cells (TREG) (TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An Bras Dermatol.* 2015 Jan-Feb;90(1):41-7.
126. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD57dimCD16+ NK-cell subset. *Blood.* 2010 Nov 11;116(19):3865-74.
127. Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004 Mar;72(1):35-44.
128. Kirkaldy AA, Musonda AC, Khanolkhar-Young S, Suneetha S, Lockwood DN. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. *Clin Exp Immunol.* 2003 Dec;134(3):447-53.
129. Foss NT. Capítulo II Aspectos imunológicos da hanseníase. Immunological aspects of leprosy Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: hanseníase 30: 335-339, jul./set. 1997
130. Giridhar M, Arora G, Lajpal K, Singh Chahal K. Clinicohistopathological concordance in leprosy - a clinical, histopathological and bacteriological study of 100 cases. *Indian J Lepr.* 2012 Jul-Sep;84(3):217-25.
131. Jha R, Karki S. Limitations of clinico-histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. *J Nepal Health Res Counc.* 2010 Apr;8(1):40-3.

8 APÊNDICES

Artigo referente à Tese: Dermal dendrocytes FXIIIa+ are essential antigen-presenting cells in indeterminate leprosy.

ORIGINAL STUDY

Dermal Dendrocytes FXIIIa+ Are Essential Antigen-Presenting Cells in Indeterminate Leprosy

Marcia Lanzoni de Alvarenga Lira, MD,* Carla Pagliari, PhD,* Aline Alves de Lima Silva, MS,* Heitor Franco de Andrade Jr, PhD,† and Maria Irma Seixas Duarte, PhD*

Abstract: Indeterminate leprosy (IL) is the early phase of Hansen disease and reword (APCs). Langerhans cells and dermal dendrocytes FXIIIa positive (DDFXIIIa) are the major APCs in the skin and can be identified by the expression of CD1a and FXIIIa, respectively, by immunohistochemical techniques. Plasmacytoid dendritic cells (PDCs) are another type of dermal dendrocytes with a questionable antigen-presenting function and can be highlighted by anti-CD123 expression. To our knowledge, there are no studies evaluating DDFXIIIa and PDC in IL. The purpose was to investigate the involvement of these cells in the pathogenesis of IL. The authors performed a retrospective study on 18 cases of IL (10 confirmed and 8 suspected) to investigate expression of FXIIIa, CD1a, and CD123. The results were compared with normal skin (for CD1a and FXIIIa only). A higher amount of FXIIIa-positive cells ($P < 0.05$) in confirmed and suspected IL cases was noted when comparing with normal skin. However, CD1a showed no quantitative differences in the epidermis of IL lesions when comparing with normal skin and CD123 expression was negligible. Based on these findings, the authors postulate that Langerhans cells and PDCs do not have a major role in IL and that DDFXIIIa may be the main APCs in IL. Further study is required to establish this.

Key Words: indeterminate leprosy, dendritic cells, FXIIIa dermal dendrocytes, CD1a, antigen-presenting cells

(*Am J Dermatopathol* 2015;37:269–273)

INTRODUCTION

Indeterminate leprosy (IL) is the early phase of Hansen disease,^{1,2} and begins at the moment when *Mycobacterium leprae* comes in contact with antigen-presenting cells (APCs). This initial interaction between host and bacillus is seldom investigated, with few studies regarding the immune response in this phase. Dendritic cells (DC) are the main type of APCs, and are a unique type, capable of initiating a T-cell response.³ In the skin, major APCs are represented by Langerhans cells (LCs) and some dermal dendrocytes. These cells are bone

marrow derived and can be identified by expression of CD1a and factor XIIIa (FXIIIa), respectively.⁴

LCs are located mainly at the epidermis and stimulate a wide range of T-cell immune responses. They are, therefore, considered the first intraepidermal cell response to tumor antigens and microorganisms. The best way to identify them is by immunohistochemical reaction with antibodies for CD1a (glycoprotein differentiation of cell surface prothymocyte) and anti-CD207 (langerin).^{5,6}

The dermal dendrocytes positive for FXIIIa (DDFXIIIa) are more numerous in the papillary dermis, around vessels, and loose connective tissue around appendages, where they are large with bulbous cell bodies and long cytoplasmic processes directed to the epidermis. Thin and isolated DDFXIIIa may be present between the collagen fibers, usually extending to the connective tissue septa between fat lobules, which exhibit delicate bipolar or tripolar dendritic processes. The coagulative factor XIIIa is a transglutaminase identified in the cytoplasm of these DDFXIIIa.^{7–11}

Another skin dendritic cell is plasmacytoid dendritic cell (PDC) with a questionable antigen-presenting function.¹² They are also bone marrow derived and specialized in secreting type 1 interferon, and for this reason are considered to be the initial agents.³ They also secrete IL12, IL6 e, and TNF- α .¹³ PDCs can be identified by immunohistochemistry technique with anti-CD123.

Most studies of LCs in leprosy contemplate the polar forms of the disease and show an increase of these cells in the tuberculoid form and marked decrease in the Virchowain form.^{4,14–19}

To our knowledge, there is no previous research on DDFXIIIa and PDC in IL. There are few studies concerning DDFXIIIa in leprosy, one of which compared the tuberculoid and Virchowain, and their results showed a significant increase in the number of these cells in tuberculoid leprosy.⁴

To improve knowledge on DC in the immune response of early leprosy, we performed a quantitative analysis of APCs (LCs and DDFXIIIa), a comparative analysis of these results with a normal skin control group, and a quantification of PDC in the IL lesions.

MATERIALS AND METHODS

Eighteen cases with histopathological diagnosis of IL were selected from the files of the Pathology Department of Lauro Souza Lima Institute at Bauru (São Paulo, Brazil). The medical records of these patients were collected. All of them

From the *Laboratório de Patologia de Moléstias Transmissíveis, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; and †Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) grant 2011/06778-8.

The authors declare no conflicts of interest.

Reprints: Marcia Lanzoni de Alvarenga Lira, MD, Laboratório de Patologia de Moléstias Transmissíveis, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo, SP 01246-903, Brasil (e-mail: marcia.la@uol.com.br).

Copyright © 2014 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

FIGURE 1. Perineurium delamination by inflammatory cells in case 7 (hematoxylin and eosin, $\times 400$).

had hypochromic macules, varying from 1 to 5 lesions, with hyposthesia and were household contacts of patients with leprosy. The investigation of the presence of bacilli was made by the histochemical method of Ziehl-Neelsen. In cases where the bacillus was absent by this technique, we performed an immunohistochemical technique to search for bacille Calmette-Guérin (BCG) antigen.

Immunohistochemistry reaction was performed according to a previously described protocol,²⁰ partially modified,²¹ using anti-CD1a (Serotec MCA 1657, dilution 1:1), anti-FXIIIa (Biogenex PU337P, dilution 1:4000), anti-CD123 (eBioscience 14-1239-82, dilution 1:100), and anti-BCG (Dako B 124, dilution 1:20,000) antibodies. For comparison of these initial lesions, we used a control group of FXIIIa and CD1a expression in normal skin from the archives of the Pathology Laboratory of Infectious Diseases where the reactions were performed.^{22,23}

The quantification of FXIIIa and CD123 cells was made considering the number of positive cells in seven to twelve randomized high-power fields ($\times 400$) in the dermis, using a square grid of 0.0625 mm². CD1a-positive cell count was

evaluated by determining the epidermal area fraction with positivity for CD1a in the square grid. The results were expressed as a number of cells per square millimeter. The anti-BCG analysis was expressed as positive or negative staining in a search of all fields at $\times 400$. The microscope used was Nikon Eclipse E200.

Statistical analysis was performed comparing mean values of groups by Student *t* test using the software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Screening was performed with a data analysis software system Statistica (StatSoft, Tulsa, OK). Differences were considered significant when the probability of similar mean values was less than 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Most patients were female (77%) and age ranged from 14 to 64 years. Histological evaluation of IL cases stained by hematoxylin and eosin histochemical method showed mononuclear inflammatory infiltrate around the superficial vessels (100% of cases), deep vessels (83%), nerves (83%), eccrine

TABLE 1. Demographic Data, Bacilli Investigation by Ziehl-Neelsen, and Immunohistochemical Counts in the IL Cases

Patient Number	Sex	Age, yr	FXIIIa, cells/mm ²	CD1a, cells/mm ²	CD123, cells/mm ²	Bacilli (Ziehl-Neelsen Technique)
1	F	57	358.276	0.1672	0	Absent
2	F	23	184.2546	0.0982	—	Present
3	M	57	173.7076	0.1552	0	Present
4	F	31	201.074	0.2791	—	Present
5	F	32	78.9358	0.1621	0	Absent
6	M	26	270.8803	0.1306	4.36	Present
7	F	55	317.9953	0.1125	0	Absent
8	F	42	266.5482	0.1333	0	Absent
9	M	45	281.2413	0.0524	4.8	Present
10	F	?	210.0077	0.1218	2.66	?
11	F	64	195.2827	0.0582	0	Absent
12	M	41	234.0374	0.0381	0	Absent
13	F	23	138.3812	0.123	0	Present
14	F	28	159.8981	0.0524	6	Present
15	F	47	127.0553	0.0295	0	Absent
16	F	?	132.3672	0.1756	0	Absent
17	F	14	324.7243	0.0546	0	Absent
18	F	31	232.7514	0.1529	0	Present

—, it was not possible to count because of scarce material in paraffin-embedded tissue; ?, unknown.

FIGURE 2. Comparison of factor XIIIa (in cells per square millimeter) frequency between normal skin (circles), confirmed IL lesions (squares), and suspected IL lesions (triangles).

glands (33%), and pilosebaceous units (16%). In all topographies, inflammatory infiltrate was mild in most cases. Perineurium delamination was seen in 4 cases (22%) (Fig. 1).

The Ziehl-Neelsen staining revealed the presence of bacilli in 8 of 18 cases (44%). In the remaining 10 cases where no bacillus was found by Ziehl-Neelsen technique, BCG antigen was positive in 2 cases (cases 10 and 12). Therefore, a total of 10 cases were confirmed as IL and the remaining 8 (where the bacillus is absent by any of the used techniques) can be regarded as highly suspicious of IL because of suggestive clinical, histopathological, and epidemiological aspects. The demographic data, bacilli investigation by Ziehl-Neelsen, and immunohistochemical counts are shown in Table 1.

The quantification of FXIIIa-positive cells in confirmed and suspected IL lesions was particularly high in these

groups compared with normal skin ($P < 0.05$). The number of FXIIIa-positive cells in the suspected IL group was similar to the confirmed IL group, with no statistical difference between them (Fig. 2). DDFXIIIa were mainly arranged around superficial dermal vessels and showed a characteristic spindle-shaped morphology (Fig. 3).

In contrast, the CD1a-positive cell amount in confirmed and suspected IL lesions did not differ significantly from normal skin (Fig. 4). There was also no statistical difference in CD1a amount between the groups of confirmed and suspected IL lesions (Fig. 5). Expression of CD123 was zero in most cases (66%) and negligible in the remainder, when compared with the expression of FXIIIa and CD1a.

DISCUSSION

This article provides novel evidence of high levels of FXIIIa-positive dermal dendrocytes in 18 IL cases, suggesting a role for these cells in the initial phase of the disease. Of the 18 cases, 10 were considered confirmed because of the demonstration of mycobacterial antigen, either by bacillus presence per se with Ziehl-Neelsen histochemical technique or positivity for anti-BCG by immunohistochemistry technique. Mycobacterial antigens can be demonstrated in leprosy tissues by anti-BCG immunohistochemical technique because *M. leprae* and BCG show extensive antigenic cross-reactions, and this can enhance the histopathological diagnosis of IL.²⁴⁻²⁷ The suspected cases ($n = 8$) were from patients who lived with leprosy patients, presented hypochromic macules with hypoaesthesia, and with mononuclear infiltrate around vessels and appendages or nerves at histopathological analysis. These confirmed and suspected groups had similar quantities of FXIIIa and CD1a expression, with no statistical difference between them.

FIGURE 3. Immunohistochemistry for anti-FXIIIa (x400). A, Case 3. B, Normal skin.

FIGURE 4. Immunohistochemistry for anti-CD1a (×400). A, Case 13. B, Normal skin.

DDFXIIIa were first characterized in normal and inflammatory skin about 25 years ago when phagocytic and antigen-presentation properties were attributed to them.^{9,28,29} These cells are increased in quantity in several diseases such as psoriasis,⁹ fibrous papule, dermatofibroma, morphea, lichen sclerosus, pyogenic granuloma, and Kaposi sarcoma.⁸ In granulomatous diseases such as American cutaneous leishmaniasis, chromoblastomycosis, and mycobacteriosis, FXIIIa-positive cells are hypertrophic and are arranged around the granuloma. Parasitism of these cells was observed in cases of American cutaneous leishmaniasis, histoid leprosy, and other infectious diseases.^{30,31}

The location of the increased amount of DDFXIIIa around the capillaries is a noteworthy finding, suggesting a sentinel, strategic position of these cells, and permits inferring that the bacillus first entered the skin through dermal capillaries in our sample. If the bacillus reached the skin through the epidermis (transmission theory by direct contact between 2 persons), an increase in the number of Langerhans would be expected, an event not observed in this and other studies.^{12,14,32} Thus, the air-borne transmission hypothesis becomes reinforced.³³

With respect to LCs in the indeterminate phase of Hansen disease, there are scarce articles about it, dating back over 20 years.^{14,18,19} Narayanan et al¹⁸ and Gimenez et al¹⁴

found no difference in LC count between IL and normal skin, but the selection of cases in the first study was made only by clinical criteria, and the patients of the second study were all in treatment. Alvarenga et al¹⁹ found no correlation between the clinical forms and the amount of LCs but evaluated only 3 cases of IL, without a control group of normal skin. Our finding that LC count did not differ between normal and IL skin lesions corroborates previous reports,^{14,18} with the advantage that we used clinical and histological criteria to select the cases, we did not use in treatment patients, and our sample encompassed more patients. One possible explanation for equal levels of CL between IL and normal skin might be that LC activation is a later event in the leprosy pathogenesis. LCs may be specially recruited in tuberculoid forms as shown in several studies with high levels of these cells at this stage.^{4,14–17} This result however needs to be interpreted with caution. Any possible functional alteration in LCs should be investigated, such as expression of Toll-like receptors and lectins, before stating that they do not participate in this phase.

The insignificant expression of CD123 found in our cases is consistent with the findings of Massone et al³⁴ where none of the BL, LL, BT, and TT cases was positive for the marker. Our findings reinforce theirs that PDC does not participate in the immune response to *M. leprae*.

The equivalent expression of LC in IL and normal skin and the negligible expression of PDC in IL support the notion that these cells do not have a major role or do not contribute in the pathogenesis of early leprosy. Finally, DDFXIIIa remains as the more numerous APCs in skin at this initial phase of the disease. Based on these findings, DDFXIIIa may be the main APC in IL. Further study is required to establish this.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Raul Negrão Fleury, MD, PhD (in memoriam), and Andrea F. F. Belone, PhD (Laboratório de Patologia, Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil) for kindly providing the paraffin blocks, slides, and data files.

REFERENCES

1. Jopling WH. Indeterminate leprosy. *Proc R Soc Med*. 1959;52:370–371.
2. Weedon D. Bacterial and rickettsial infection. In: Weedon D, ed. *Weedon's skin pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2010:547–572.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, eds.

FIGURE 5. Comparison of CD1a epidermal area fraction between normal skin (circles), confirmed IL lesions (squares), and suspected IL lesions (triangles).

- Imunologia celular e molecular (Tradução de Claudia Reali e outros).* Rio de Janeiro, Brazil: Elsevier; 2008:113–136.
4. Simões Quaresma JA, de Oliveira MF, Ribeiro Guimarães AC, et al. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. *Am J Dermatopathol*. 2009;31:527–531.
 5. McKee PH, Calonje E, Granter SR. The structure and function of skin. In: McKee PH, Calonje E, Granter SR, eds. *Pathology of the Skin With Clinical Correlations*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2005:1–36.
 6. Murphy GF. Histology of the skin. In: Elder DE, Elenitsas R, Johnson BJ Jr, et al, eds. *Lever's Histopathology of the Skin*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005:9–58.
 7. Cerio R, Spaul J, Oliver GF, et al. A study of factor XIIIa and MAC 387 immunolabeling in normal and pathological skin. *Am J Dermatopathol*. 1990;12:221–233.
 8. Estrada JA, Pierard GE. Factor-XIIIa-positive dendrocytes and the dermal microvascular unit. *Dermatologica*. 1990;180:51–53.
 9. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, et al. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol*. 1989;121:421–431.
 10. Cerio R. Dermal dendrocytes and factor XIIIa in normal and pathological skin. *Ann Dermatol Venereol*. 1993;120:53–57.
 11. Gibran NS, Nickoloff BJ, Holbrook KA. Ontogeny and characterization of factor XIIIa+ cells in developing human skin. *Anat Embryol*. 1996;193:35–41.
 12. Sandgren KJ, Smed-Sörensen A, Forsell MN, et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently capture HIV-1 envelope glycoproteins via CD4 for antigen presentation. *J Immunol*. 2013;191:60–69.
 13. Swieckiand M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev*. 2010;234:142–162.
 14. Gimenez MF, Gigli I, Tausk FA. Differential expression of Langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. *Br J Dermatol*. 1989;121:19–26.
 15. Mathur NK, Mangal HN, Mathur D, et al. Langerhans cell and leprosy. *Lep India*. 1983;55:22–28.
 16. Collings LA, Waters MF, Poulter LW. The involvement of dendritic cells in the cutaneous lesions associated with tuberculoid and lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1985;62:458–467.
 17. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*. 1990;137:749–753.
 18. Narayanan RB, Natarajan M, Katoch K, et al. CD1 positive epidermal Langerhans cells in indeterminate leprosy. *Acta Leprol*. 1988;6:29–34.
 19. Alvarenga FB, Sarno EN, Figueiredo AA, et al. Distribution of Langerhans cells in the skin of patients with Hansen's disease. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1985;13:187–191.
 20. Hsu SM, Raine L, Fagner H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:577–580.
 21. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK Cells activity. *Virology*. 2006;345:22–30.
 22. Pagliari C, Sotto MN. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. *Med Mycol*. 2002;40:407–410.
 23. Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol*. 2003;25:107–112.
 24. Mshana RN, Belchu A, Stoner GL, et al. Demonstration of mycobacterial antigens in leprosy tissues. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1982;50:1–10.
 25. Barbosa Júnior Ade A, Silva TC, Patel BN, et al. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. *Pathol Res Pract*. 1994;190:782–785.
 26. Natrajan M, Katoch K, Katoch VM, et al. Enhancement in the histological diagnosis of indeterminate leprosy by demonstration of mycobacterial antigens. *Acta Leprol*. 1995;9:201–207.
 27. Schettini AP, Ferreira LC, Milagros R, et al. Enhancement in the histological diagnosis of leprosy in patients with only sensory loss by demonstration of mycobacterial antigens using anti-BCG polyclonal antibodies. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2001;69:335–340.
 28. Nemes Z, Thomázy V. Factor XIIIa and the classic histiocytic markers in malignant fibrous histiocytoma: a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol*. 1988;19:822–829.
 29. Cerio R, Spaul J, Jones EW. Identification of factor XIIIa in cutaneous tissue. *Histopathology*. 1988;13:362–364.
 30. Sotto MN, Halpern I, Kaufman MR, et al. Factor XIIIa+ dermal dendrocyte parasitism in American tegumentary leishmaniasis skin lesions. *Am J Dermatopathol*. 2010;32:15–18.
 31. Santos J, Contreras F, McNutt NS. Multibacillary leprosy: lesions with macrophages positive for S100 protein and dendritic cells positive for factor 13a. *J Cutan Pathol*. 1998;25:530–537.
 32. Sepulveda-Merrill C, Mayall S, Hamblin AS, et al. Antigen-presenting capacity in normal human dermis is mainly subserved by CD1a+ cells. *Br J Dermatol*. 1994;131:15–22.
 33. Transmission of leprosy. Available at: <http://www.who.int/lep/transmission/en/>. Accessed July 28, 2013.
 34. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in Hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol*. 2010;32:251–256.