

**JAISON ANTÔNIO BARRETO**

Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

São Paulo  
2005

**JAISON ANTÔNIO BARRETO**

Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

**Área de Concentração: Pesquisas  
Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Raul Negrão Fleury**

São Paulo  
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barreto, Jaison Antônio

Manifestações *de* padrão tuberculóide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imunoistoquímico comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia / Jaison Antônio Barreto. – São Paulo, 2005.

Dissertação (mestrado)—Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientador: Raul Negrão Fleury

1. Hanseníase Dimorfa 2. Antibióticos Combinados 3. Granuloma 4. Contagem de Células 5. Citocinas 6. Sintase de Óxido Nítrico

SES/CCD/CD-059/05

# Dedicatória

À minha mãe, Rosa, pelo amor incondicional, exemplo de garra, coragem, honestidade e caráter, que fizeram de mim o que sou;

Às minhas tias Olga, Dilma e ao meu tio Hans, pois sem eles provavelmente eu não chegaria até aqui;

A Cristiane, companheira inseparável, pelo amor e cumplicidade dedicados.

# Agradecimentos

## Especiais

Ao Dr. Diltor Vladimir Araújo Opromolla, in memoriam, exemplo de dedicação, amor e respeito pelos pacientes; amigo incondicional, mestre paciente, pesquisador incansável, cuja luta contra a Hanseníase tornou este mundo melhor.

Ao Dr. Raul Negrão Fleury, mestre sábio e paciente, muitas vezes paternal, por iniciar-me na Dermatopatologia e por dividir comigo este trabalho.

A Dra. Andréa de Faria Fernandes Belone, pelas muitas horas compartilhadas em discussões científicas, indispensáveis na realização desta dissertação.

# Agradecimentos

A Deus, que me deu a vida e tudo o que tenho.

À Equipe Técnica de Imunologia, em especial à Dra. Esther e Dra. Fátima, pelo auxílio na discussão imunológica.

À Equipe Técnica de Patologia, pelo auxílio na confecção das lâminas e na digitação de várias partes deste trabalho.

Ao Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond, que permitiu a realização deste projeto no Instituto Lauro de Souza Lima.

À Paula Araújo Opromolla, que sempre me atendeu com boa vontade e prontidão.

Às funcionárias da Biblioteca do Instituto Lauro de Souza Lima, Cidinha, Rosana, Lucimara, Goretti, Leninha, Alice e Zélia, pela atenção e auxílio.

À Maria Helena Correa, pela prontidão, interesse e ajuda na revisão bibliográfica.

Aos pacientes, que forneceram material biológico para a realização deste estudo.

Ao Dr. Luiz Carlos de Melo, colega de turma e amigo, pelo apoio na fase das viagens Bauru - São Paulo.

Aos Docentes da CIP — CPG, pela inestimável contribuição na edificação do saber e da pesquisa.

Às queridas "meninas" da Secretaria da área de PLSP, Tirces, Líria e Dra. Claydes, pela dedicação e prontidão, principalmente por possibilitar a resolução dos problemas à distância.

A Emiliana Simões Toledo Corrêa, Secretária da CPG-CIP, pelo importantíssimo apoio nas fases iniciais.

"Observei o conjunto da obra de Deus e percebi que o homem não consegue descobrir tudo o que acontece debaixo do sol. Por mais que o homem afadiguese em pesquisar, não chega a compreendê-la. E mesmo que o sábio diga que a conhece, nem por isso é capaz de entendê-la".

Eclesiastes 8, 17

## RESUMO

A hanseníase dimorfa é a forma clínica mais freqüentemente associada à ocorrência de reações de hipersensibilidade mediada por células (reações tipo 1), que podem ocorrer antes, durante ou depois do tratamento específico. Há várias teorias a respeito da patogênese dessas reações, as quais estão diretamente ligadas ao dano neural e às sequelas. Visando-se compreender melhor a fisiopatologia das reações tipo 1, foram estudadas 10 biópsias cutâneas de indivíduos com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional não tratados e 10 de indivíduos dimorfos em reação reversa (após o início do tratamento específico), comparando-se os parâmetros morfológicos e imunoistoquímicos. Observou-se, no grupo em tratamento, maior positividade das células para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e menor quantidade de linfócitos T CD8+ ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas na baciloscopia e positividade para antígenos micobacterianos nos dois grupos, e nem na quantidade de células IL-10+, apesar de ter sido observada correlação negativa entre esta citocina e a proporção CD4/CD8 nos pacientes em tratamento ( $p < 0,05$ ). Notou-se, também, tendência à redução do infiltrado específico (linfócitos T e B) e aumento do número de células citotóxicas inespecíficas (NK) no grupo em tratamento. Estes resultados são concordantes com trabalhos recentes, que sugerem que a reação tipo 1 representaria um desequilíbrio imunológico entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Na presença de muitos bacilos viáveis e no contexto de um paciente sem imunidade celular plena, haveria uma tendência à piora no sentido do pólo virchoviano (*downgrading*), porém o tratamento específico, reduzindo a carga bacilar, favoreceria uma melhora da imunidade efetiva, caracterizada por um quadro histológico mais tuberculóide, com posterior desvio progressivo da imunidade adquirida para a inespecífica (resposta Th3 ou reguladora), interrompendo a reação e levando à cura.

## ABSTRACT

Borderline leprosy is the most frequent clinical type of the disease associated with the occurrence of type 1 reactions, which can occur before, during or after the multidrugtherapy. There are several theories about the pathogenesis of these reactions, which are closely related to nerve damage. In order to better understand these reactions, we studied 10 skin biopsies of borderline tuberculoid patients with type 1 reaction without treatment and 10 skin biopsies from borderline patients with reversal reactions (under treatment). Morphological and immunohistochemical parameters were compared. In biopsies of patients with reversal reactions, stronger immunostaining for iNOS inside the cells' infiltrate and decreased amount of CD8+ T lymphocytes were noticed ( $p < 0,05$ ). There weren't significant differences in the bacilloscopy and immunostaining for mycobacterial antigens between these two groups, neither in the amount of IL-10+ cells. Nevertheless, a negative relationship between this cytokine and the ratio CD4/CD8 T lymphocytes was observed in the group with reversal reactions ( $p < 0,05$ ). It was also noticed a trend to reduction in the specific infiltrate (B and T lymphocytes) and an increase in the number of non specific cytotoxic cells (NK cells) in this group. These results are similar to the recent studies that suggest the type 1 reaction could be an immunological imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The presence of several viable bacilli in a patient without full cellular immunity could progressively and temporarily change the clinical and immunological status towards the lepromatous pole (downgrading). Once started the multidrugtherapy, bacillary load falls, restoring the cellular immunity, which is characterized by a more tuberculoid infiltrate that slowly becomes more non specific (a shift to innate immunity) under the action of regulatory T cell response (Th3 type), stopping the reaction and evolving to cure.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC — complexo avidina-biotina

ADCC — citotoxicidade dependente de anticorpo

AMP — adenosina monofosfato

BAAR — bacilo álcool-ácido resistente

BCG — bacilo de Calmett-Guérin

CAA — célula apresentadora de antígeno

CD — marcador celular (cluster of differentiation)

CMI — imunidade mediada por células

DAB — diaminobenzidina

DD — dimorfo-dimorfo

D-RR — dimorfo em reação reversa

DT — dimorfo-tuberculóide

DTR — dimorfo-tuberculóide reacional

DT-RR — dimorfo-tuberculóide em reação reversa

DV — dimorfo-virchoviano

DV-RR — dimorfo-virchoviano em reação reversa

GM-CFS — fator estimulante de crescimento de colônias de granulócitos  
e monócitos

HE — hematoxilina — eosina

HLA — antígeno leucocitário humano

hsp — proteína do choque térmico

IFN — interferon

IL — interleucina

iNOS — óxido nítrico sintase-induzível

LAM — lipoarabinomanana

LPS — lipopolissacarídeo

MHC — complexo maior de histocompatibilidade

mRNA — ácido ribonucléico mensageiro

NK — célula exterminadora natural

NO — óxido nítrico

NT - nitrotirosina  
OMS — Organização Mundial da Saúde  
ONOO<sup>-</sup> — peroxinitrito  
PBS — solução de tampão fosfato  
PGL — glicolípido fenólico  
PQT — poliquimioterapia  
RNI — radicais intermediários do nitrogênio  
ROI — radicais intermediários do oxigênio  
TCR — receptor de células T  
TGF — fator transformador de crescimento  
Th1 — resposta imune celular ou tipo I  
Th2 — resposta imune humoral ou tipo II  
Th3 — resposta imune reguladora ou tipo III  
TNF — fator de necrose tumoral  
TR — tuberculóide reacional  
TT — tuberculóide polar  
VV — virchoviano

## LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1— Identificação, local da biópsia, idade e sexo dos pacientes com hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do tratamento específico (DTR).....	49
Quadro 2— Identificação, local da biópsia, idade, sexo, tempo de tratamento e diagnóstico inicial dos pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR) .....	49
Quadro 3 - Avaliação semiquantitativa dos achados histopatológicos das biópsias de indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do tratamento específico (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+) .....	50
Quadro 4 — Avaliação semiquantitativa dos achados histopatológicos das biópsias de indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase dimorfa em reação reversa (DRR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+).....	51
Tabela 1— Análise semiquantitativa baciloscópica e de antígenos micobacterianos em biópsias cutâneas de pacientes DTR. Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1987). .....	52
Tabela 2- Análise semiquantitativa baciloscópica e de antígenos micobacterianos em biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1987). .....	52
Tabela 3— Avaliação quantitativa da população de linfócitos T por mm <sup>2</sup> nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas dos pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação.....	53
Tabela 4 - Avaliação semiquantitativa da população de linfócitos B nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas,	

em biópsias cutâneas dos pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação. Valores expressos em + (Escala de 0 a 4+) .....	54
Tabela 5- Avaliação quantitativa da população de células NK (CD 57+) por mm <sup>2</sup> nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação.....	55
Tabela 6 - Avaliação quantitativa da população de células IL-10+ por mm <sup>2</sup> nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR.....	56
Tabela 7 - Avaliação semiquantitativa da população de células iNOS+ por mm <sup>2</sup> nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR.....	57
Figura 1- Biópsia B04-2826 - Quadro histológico característico: dimorfo-tuberculóide em reação reversa, mostrando granulomas de padrão tuberculóide extensos e confluentes (HE — 50x).....	58
Figura 2 — Detalhe da figura 1: Granulomas de padrão tuberculóide com células epitelióides, linfócitos e célula gigante tipo Langhans (HE — 400x). .....	58
Figura 3 — Detalhe da figura 1: Granulomas de padrão tuberculóide com células epitelióides predominando e acúmulo focal de linfócitos (HE — 400x).....	59
Figura 4 — Biópsia B04-2826 - Baciloscopia da biópsia típica de quadro dimorfo em reação reversa: grumos de bacilos granulosos em macrófagos vacuolizados em meio a células epitelióides (3+ na escala de Ridley) (Faraco-Fite — 1000x).....	59
Figura 5 — Reação granulomatosa ao redor de ramos nervoso com delaminação do perineuro. Os linfócitos T CD8 coram-se em marrom e vermelho e os CD4 apenas em vermelho. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 — 200x).....	60

Figura 6 — Reação granulomatosa extensa mostrando linfócitos T CD4 e CD8 entremeados, com acúmulo de linfócitos B (não corados) na região central. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 — 200x).....	60
Figura 7—Infiltrado inflamatório mostrando linfócitos T CD4 e CD8 entremeados agredindo ramo nervoso. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 —200x).....	61
Figura 8 — Reação inflamatória granulomatosa mostrando linfócitos B em acúmulos e dispersos em meio ao granuloma. Imunoistoquímica (CD20 — 400X).....	61
Figura 9 — Acúmulo de linfócitos B em localização perivascular na periferia de granulomas. Imunoistoquímica (CD20 — 400X).....	62
Figura 10 — Acúmulos de linfócitos B ativados e plasmócitos no derma reticular profundo. Imunoistoquímica (CD 79 — 200X). ....	62
Figura 11 — Linfócitos B ativados e plasmócitos formando acúmulos na periferia de granuloma. Imunoistoquímica (CD79 — 400X). ....	63
Figura 12 — Células NK dispersas em meio à reação granulomatosa. Imunoistoquímica (CD57 — 400X) .....	63
Figura 13 — Reação granulomatosa mostrando células marcadas positivamente para a enzima óxido nítrico sintase induzível (3+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (iNOS — 400X).....	64
Figura 14 — Reação granulomatosa perivascular mostrando menor intensidade na marcação para iNOS (1+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (iNOS — 400X).....	64
Figura 15 — Macrófagos contendo grande quantidade de lipoarabinomanana no derma superficial (5+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (LAM — 200X).....	65
Figura 16 — Detalhe da figura 15: Macrófagos contendo grande quantidade de lipoarabinomanana superficial (5+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (LAM — 400X).....	65
Figura 17 — Ramo nervoso do derma profundo mostrando forte marcação para anticorpo anti-Mycobacterium bovis (6+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (BCG — 200X).....	66

Figura 18 — Detalhe da figura acima mostrando intensa marcação dentro do ramo nervoso. Imunoistoquímica (BCG — 400X). .....	66
Figura 19 – Células mononucleares imunomarcadas para IL-10 em meio ao infiltrado linfo-histiocitário perivascular. Imunoistoquímica (IL-10 — 400X). .....	67

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
1.1. Aspectos gerais .....	20
1.2. Antígenos micobacterianos.....	22
1.3. Imunidade inata .....	24
1.4. Imunidade adaptativa na hanseníase .....	25
1.5. Padrão de citocinas na hanseníase .....	27
1.6. O papel da IL-10 na hanseníase .....	28
1.7. A função do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na hanseníase .....	29
1.8. Tratamento da hanseníase .....	31
1.9. Reação tipo 1 .....	33
1.10. Tratamento das reações reversas.....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
3.1. Casuística.....	42
3.2. Anticorpos monoclonais.....	42
3.3. Anticorpos policlonais .....	43
3.4. Estudos imunoistoquímicos.....	43
3.5. Avaliação dos cortes histológicos submetidos a imunoistoquímica .....	44
3.6. Análise estatística .....	45

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>98</b>

**Anexo 1 — Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Número total de linfócitos T/mm2 distribuídos na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase hanseníase-dimorfa tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR) .....**

**98**

**Anexo 2 — Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Número total de linfócitos T/mm2 distribuídos na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase hanseníase-dimorfa em reação reversa (D-RR).....**

**99**

**Anexo 3 — Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79+). Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-4+) .....**

**100**

**Anexo 4 — Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79+). Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores expressos em + (Escala de 0-4+).....**

**101**

**Anexo 5 — Análise quantitativa de células NK (CD57+). Número total de células NK/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR).....**

**102**

**Anexo 6- Análise quantitativa de células NK (CD57+). Número total de células NK/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR)..... 103**

**Anexo 7- Análise quantitativa de células expressando IL-10. Número total de células IL10+/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). .....104**

**Anexo 8- Análise quantitativa de células expressando IL-10. Número total de células IL10+/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR).....105**

**Anexo 9- Análise semiquantitativa de células expressando INOS. Imunomarcção positiva de células inflamatórias nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+)..... 106**

**Anexo - 10 Análise semiquantitativa de células expressando NOS. Imunomarcção positiva de células Inflamatórias nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+).....107**