

**FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

ANA ELISA KISZEWSKI BAU

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E EXPRESSÃO DE CICLOOXIGENASE
NA ETAPA ULCERATIVA DA DOENÇA DE BURULI**

PORTO ALEGRE, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA ELISA KISZEWSKI BAU

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E EXPRESSÃO DE
CICLOOXIGENASE NA ETAPA ULCERATIVA DA DOENÇA DE BURULI**

Tese de Doutorado apresentada como requisito para a obtenção de título de Doutor em Patologia. Área de concentração: Patologia Geral e Experimental

Orientadora:

Dra. Ivonyr I. T. Abdel Kader

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, FFFCMPA

Colaboradores:

Dr. Rogélio Hernández Pando

Departamento de Patologia Experimental Instituto Nacional de Ciências Médicas e Nutrição “Salvador Zubirán”. México D.F., México.

Dra. Françoise Portaels

Instituto de Medicina Tropical, Antwerp, Bélgica.

Dr. Wayne Mayers

Departamento de Patologia, Divisão de Microbiologia, Instituto de Patologia das Forças Armadas. Washington D.C., EUA

PORTO ALEGRE, 2007

AGRADECIMENTOS

A todos os que acreditaram na realização deste trabalho e me apoiaram.

À professora Dra. Ligia Barbosa Coutinho, por acreditar na importância deste projeto de pesquisa e por seu fundamental apoio.

Ao Dr. Rogélio Hernández-Pando, pelo apoio em todas as etapas do trabalho, inclusive o fornecimento das amostras. Sem a sua participação, esse trabalho não haveria nem mesmo iniciado.

À minha orientadora Dra Ivonyr I. T. Abdel Kader, por aceitar o desafio deste trabalho e por manter a perseverança apesar das dificuldades.

Ao meu marido Claiton Henrique Dotto Bau pelo apoio durante todo o doutorado e pela revisão final da tese.

Aos meus pais, porque sempre incentivarem meus estudos.

Às funcionárias da pós-graduação Teresinha, Rosalva e Nice, pela eficiência e pela amizade.

SUMÁRIO

	Página
1- LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
2- RESUMO.....	6
3- INTRODUÇÃO.....	8
4- REVISÃO DA LITERATURA.....	10
4.1- Aspectos históricos.....	10
4.2- Agente etiológico.....	10
4.3- Micolactona.....	12
4.4- Epidemiologia.....	14
4.4.1- Modo de transmissão.....	17
4.4.2- Fatores sócio-econômicos.....	20
4.4.3- Variações sazonais da DB.....	20
4.5- Aspectos Clínicos.....	21
4.6- Aspectos Histológicos.....	22
4.7- Critérios para diagnóstico de DB pela OMS.	24
4.8- Resposta tipo Th1 e Th2 e células CD4/CD8 e macrófagos.....	25
4.9- Fator de crescimento transformante beta (TGFβ)	27
4.10- As ciclooxigenases.....	30
4.11- Resposta imunológica na doença de Buruli.....	32
4.11.1- Resposta imunológica celular.....	33
4.11.2- Resposta imunológica humoral.....	37
4.11.3- Modulação imunológica do hospedeiro por <i>M. ulcerans</i> e ação da Micolactona.....	37
4.11.4- Infecção experimental.....	38
5- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	40
5.1- Justificativa.....	40
5.2- Objetivos.....	41
6- REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	42
7- ARTIGO 1 - The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease... ..	54
7.1- Versão em português.....	62
8- ARTIGO 2 - Cyclooxygenase type 2 expression in the ulcerative stage of Buruli Disease.....	80
8.1- Versão em português.....	92
9- DISCUSSÃO GERAL.....	103
10- REFERÊNCIAS DA DISCUSSÃO.....	106
11- ANEXOS.....	109
11.1- Anexo 1 - Material e métodos – detalhamento.....	109
11.2- Anexo 2 - Iniciativa global para a úlcera de Buruli: esclarecimentos sobre Bioética.....	115
11.3- Anexo 3 - Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy.....	125
11.4- Anexo 4 - Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions.....	133

1- LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR - Bacilos álcool-ácidos resistentes

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CD4 - Marcador de superfície de linfócito T auxiliar

CD8 - Marcador de superfície de linfócito T citotóxico

DB – Doença de Buruli

IgG - Imunoglobulina de isotipo G

IgM - Imunoglobulina de isotipo M

IFN γ - Interferon Gama

IL - Interleucina

OMS / WHO - Organização Mundial da Saúde

PPD - Proteína purificada da tuberculina

TGF β - Fator de crescimento transformante Beta

Th1 – Linfócito T auxiliar com padrão de liberação de citocinas citotóxicas, pró-inflamatórias

Th2 - Linfócito T auxiliar com padrão de liberação de citocinas antiinflamatórias

TNF α - Fator de necrose tumoral Alfa

UB – Úlcera de Buruli

ZN - Ziehl–Neelsen

2- RESUMO

A Doença de Buruli (DB) é uma doença ulcerativa, necrótica e progressiva da pele e tecido celular subcutâneo, causada pelo *Mycobacterium ulcerans*. O maior fator de virulência no *M. ulcerans* é uma toxina necrotizante chamada micolactona, com efeitos citotóxicos, analgésicos e imunossupresores. Estudos *in vitro* e *ex-vivo* indicam resultados conflitantes quanto a produção de interferon γ (IFN γ), interleucina 10 (IL10) e fator de necrose tumoral Alfa (TNF α) na DB. Além disso, há poucos trabalhos sobre a imunopatologia local, *in vivo* destes pacientes e não há relatos que correlacionem a expressão destas citocinas com a resposta inflamatória local. Embora a expressão local de célula CD4, CD8, CD68 e fator de crescimento transformante Beta (TGF β) sejam conhecidos na hanseníase, faltam estudos para estes marcadores na DB.

A PGE2 está envolvida na regulação das respostas Th1/Th2, diminuindo a produção de citocinas Th1 tais como IL2, IFN γ e IL12. A ciclooxigenase 2 (COX2) é uma enzima induzível responsável pela produção de PGE2. Estudos em hanseníase e tuberculose indicam que altas concentrações de prostaglandina E2 (PGE2) têm importante efeito imunossupressivo no sistema imunológico. Por este motivo, consideramos a hipótese de que COX2 poderia estar envolvida nos mecanismos de supressão da imunidade celular na fase ulcerativa da DB.

Foram utilizados blocos de parafina contendo fragmentos de pele e tecido celular subcutâneo de 11 pacientes com diagnóstico de DB. Todos os fragmentos eram provenientes de Benin, África e foram obtidos como parte do tratamento (debridamento cirúrgico) dos pacientes. Os casos foram confirmados pelo estudo histopatológico e pelo menos um entre os seguintes testes: BAAR positivo, cultura ou PCR. Os 11 casos foram estudados para expressão de IFN γ , TNF α , IL10, TGF β e células CD4, CD8 e

CD68. Oito pacientes foram estudados também para a expressão de COX2. As expressões destas citocinas e da COX2 foram correlacionadas com a resposta inflamatória local (presença ou ausência de granulomas) avaliada pela histopatologia.

A análise histopatológica dos 11 casos mostrou extensa necrose de coagulação na pele e tecido celular subcutâneo com número variável de BAAR. Os casos foram divididos histologicamente em dois grupos: 5 casos apresentaram granulomas bem formados, constituídos por macrófagos, linfócitos e células gigantes e 6 casos que não continham granulomas, apresentando somente necrose extensa e macrófagos vacuolados. Um número significativamente maior de bacilos extras e intracelulares foi encontrado no grupo ulcerativo sem granulomas, com predomínio extracelular. Pacientes com granulomas demoraram em média 150 dias para a busca de atendimento médico e tiveram 180 dias de hospitalização, enquanto pacientes com úlceras sem granulomas demoraram 45 dias e permaneceram hospitalizados 36 dias, em média ($p < 0.003$). Isso sugere que os granulomas apareceram tardiamente nas úlceras. A análise da expressão dos marcadores de imunohistoquímica *in situ* revelou diferenças nos grupos de úlcera com e sem granulomas. De uma maneira geral, houve um predomínio de linfócitos CD8 sobre os linfócitos CD4. Também houve maior expressão de linfócitos CD8 em úlceras com granulomas quando comparadas a úlceras sem granulomas ($p=0.038$). Uma alta percentagem de macrófagos foi observada em ambos os tipos lesões ulcerativas de DB (45 – 47%). O IFN γ foi significativamente mais expresso (três vezes mais) nas úlceras com granulomas ($p=0.017$), enquanto IL10 e TGF β apresentaram uma tendência não significativa para maior expressão nas úlceras sem granulomas. As percentagens de células positivas para TNF α e COX2 foram bastante similares entre os dois grupos de lesões histológicas. Esse conjunto de resultados sugere que a presença de granulomas na histologia das lesões se associa a

níveis elevados de IFN- γ o qual induz proteção imunológica e menor carga bacilar em DB.

3- INTRODUÇÃO

A doença de Buruli (DB) é causada por uma micobactéria (*Mycobacterium ulcerans*) e caracteriza-se pela presença de uma úlcera cutânea crônica de crescimento lento e progressivo, acompanhada ou não por osteomielite e sintomas sistêmicos mínimos. Ao contrário das outras doenças micobacterianas, a infecção por *M. ulcerans* é caracterizada pela presença do bacilo extracelular, infiltrado inflamatório escasso e necrose extensa no local da infecção (Gooding *et al.*, 2001; Pahlevan *et al.*, 1999; Van der Werf *et al.*, 1999). As seqüelas são comuns e incluem cicatriz extensa, contraturas, osteomielite, perda de extremidades e cegueira. É a terceira causa mais comum de doença micobacteriana em pacientes imunocompetentes, depois da tuberculose e da hanseníase (Gooding *et al.*, 2001,2002,2003; World Health Organization, 2002; Van der Werf *et al.*, 1999; Weir, 2002). Por outro lado, em algumas áreas endêmicas, a DB pode substituir a tuberculose e a hanseníase como a doença micobacteriana mais prevalente, afetando mais de 22% da população em algumas comunidades de Gana (Hayman e Asiedu, 2000). Até 2004, a doença não respondia adequadamente aos tratamentos com os antibióticos testados. Por este motivo, as estratégias para o controle da DB até então, estavam limitadas à detecção precoce e intervenção cirúrgica, buscando assim a redução do tempo de hospitalização, extensão da cirurgia, seqüelas, morbidade, mortalidade e gastos (World Health Organization, 2002).

Em 1998, após uma conferência internacional organizada pela Organização Mundial da Saúde sobre o controle e pesquisa em DB realizada em Yamoussoukro, Costa do Marfim, teve início a Iniciativa Global para a Úlcera de Buruli. A iniciativa é

mantida até hoje, incluindo vários projetos de pesquisa em diferentes países africanos onde a DB é endêmica.

Não existem dados do Ministério da Saúde sobre a *M. ulcerans* no território brasileiro. No entanto, existem evidências de casos de DB na divisa com a Guiana Francesa (World Health Organization, 2007) e recentemente foi publicado o caso de um paciente atendido em Brasília (dos Santos *et al.*, 2007).

O projeto “Resposta imunológica local na etapa ulcerativa da Doença de Buruli” realizado na FFFCMPA com a colaboração de outras 3 instituições estrangeiras (Bélgica, EUA e México) faz parte da iniciativa global mencionada acima. Esse trabalho visa colaborar para o conhecimento dos aspectos imunopatológicos da DB, mais especificamente a expressão local de citocinas e de ciclooxigenase.

4- REVISÃO DE LITERATURA

4.1- ASPECTOS HISTÓRICOS

Alguns casos de úlceras crônicas sugestivas de DB foram descritos por Albert Cook, em Uganda em 1897 (Apud: Huygen, 2003; World Health Organization, 2004a). Em 1937, Alsop e Sears, dois médicos australianos, encontraram bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em pacientes com uma forma de úlcera crônica, sugerindo que a infecção fosse uma forma de tuberculose ou hanseníase. Este achado só veio a ser publicado em 1972 (Alsop, 1972). Por esta razão, Maccallum *et al.*, que publicaram em 1948 um estudo de seis pacientes australianos com lesões ulcerativas nos braços ou pernas, são considerados os primeiros a descreverem o bacilo. Neste estudo, os bacilos retirados da lesão foram inoculados em animais, reproduzindo as úlceras. Os autores perceberam tratar-se de um novo agente infeccioso, nomeado provisoriamente como Bacilo de Bairnsdale, região em que 5 dos 6 pacientes viviam. Posteriormente, a micobactéria teve o seu nome modificado para *Mycobacterium ulcerans* (van der Werf *et al.*, 1999).

Apesar do fato de que o agente etiológico foi identificado inicialmente na Austrália, um número maior de casos foi posteriormente descrito na África. O nome atual da doença se deve à incidência elevada na região próxima ao rio Nilo chamada Buruli, em Uganda, nos anos 50 e 60 (Huygen, 2003).

3.2- AGENTE ETIOLÓGICO

O *M. ulcerans* é um BAAR de predomínio extracelular e de crescimento lento. O agente pode ser cultivado nos meios de cultura utilizados para micobactérias, mas o meio sólido que oferece um melhor cultivo é o de Löwenstein-Jensen. As condições ideais para o cultivo envolvem uma temperatura entre 30-33°C, ambiente microaerófilo

com tensão de oxigênio mais baixa que a atmosférica (entre 2,5 e 5% de O₂) e pH entre 5,4–7,4 (Portaels *et al.*, 2001). A cultura demora de 6 a 12 semanas para tornar-se positiva, em algumas situações pode levar mais tempo (van der Werf *et al.*, 2003). Ainda assim, o cultivo do *M. ulcerans* a partir de espécimes clínicos resulta negativa em aproximadamente metade dos casos (van der Werf *et al.*, 1999). Sequências específicas de DNA do *M. ulcerans* podem ser amplificadas por meio de PCR (Portaels *et al.*, 1997). Duas seqüências alvo (IS2404 e IS2606) têm sido utilizadas para detecção do *M. ulcerans*. A análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) identificou diferentes cepas na Austrália, África e América. Não se sabe se estes diferentes genótipos estão associados a diferenças na virulência (van der Werf *et al.*, 1999). Um projeto foi concluído este ano no Instituto Pasteur, em Paris, o qual determinou o genoma completo do *M. ulcerans* (Stinear *et al.*, 2007). Algumas descobertas acerca do genoma do *M. ulcerans* são de especial interesse para os cientistas, como uma grande quantidade de seqüências IS2404 (213 cópias) e IS2606 (91 repetidas, com 213 e 91 cópias, respectivamente (Stinear *et al.*, 2007). Parece existir uma relação direta entre a virulência e a presença de cópias IS2404 (Chemlal *et al.*, 2002). O tamanho do genoma desta micobactéria é de 5,8 Mb, sendo 5632 Kb no cromossomo e 174 Kb no plasmídeo. Cerca de 10% do genoma estaria envolvido no processo de replicação. As seqüências de DNA encarregadas da duplicação são curtas (1-5 kb) e estão presentes a intervalos regulares. O significado biológico da grande quantidade de elementos repetidos não está de todo esclarecido, porém é bastante provável que isso permita ao microorganismo maior susceptibilidade a mutações (van der Werf *et al.*, 2003). *Mycobacterium marinum* e *M. ulcerans* são micobactérias próximas do ponto de vista filogenético, podendo compartilhando de 98 a 99,8% do seu material genético (Stinear *et al.*, 2007). O granuloma das piscinas (causado pelo *M.*

marinum) e a DB são doenças micobacterianas com similaridades fisiopatológicas, pois ambas causam lesões cutâneas necrotizantes e apresentam um reservatório aquático (Dobos *et al.*, 1999). Por outro lado, as alterações histopatológicas que acompanham o *M. ulcerans* diferem amplamente das que ocorrem pela infecção pelo *M. marinum*. O achado molecular que mais claramente separa as duas espécies é a presença da micolactona (Chemlal *et al.*, 2002).

4.3- MICOLACTONA

O *M. ulcerans* produz uma família de moléculas tóxicas lipofílicas, as micolactonas, envolvidas na destruição tecidual (necrose e ulceração) e imunossupressão local (George *et al.*, 1999; van der Werf *et al.*, 1999, 2003; Stinear *et al.*, 2004). A toxina parece penetrar nas células por difusão e acumula-se no citosol (Snyder e Small, 2003). A micolactona é um complexo polipeptídico derivado macrolídeo estável ao calor. Os macrolídeos são divididos em grupos de acordo com o número de carbonos presentes no anel lactona. A molécula da micolactona tem um anel macrolídeo de 12 carbonos, pertencendo ao grupo de macrolídeos com a menor lactona. Neste anel duas cadeias de polipeptídeos (R1 e R2) são anexadas (George *et al.*, 1999) (Figura 1).

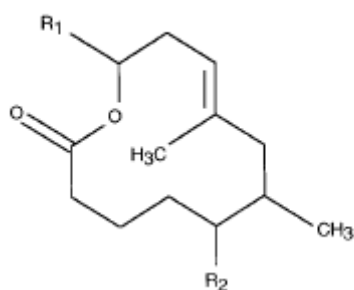


Figura 1- Estrutura molecular da micolactona

O isolamento de um núcleo de micolactona é a primeira evidência para a existência de uma molécula precursora. Outra observação importante é que o núcleo da micolactona é suficiente para sua citopatogenicidade. A diferença de potências encontrada entre o núcleo da micolactona e a molécula completa sugere que a função da cadeia lateral de ácidos graxos (R2) é permitir a entrada da molécula na célula ou fazê-la interagir com alguma molécula alvo intracelular (Mve-Obiang *et al.*, 2003).

As diferentes cepas de *M. ulcerans* produzem uma família de macrolídeos com atividades biológicas idênticas, mas com potências diferentes (George *et al.*, 2000). A micolactona A/B foi o primeiro tipo de macrolídeo na UB. Posteriormente foi identificada uma família de variantes desta toxina (micolactonas C, D e E) as quais diferem primariamente no número de grupos hidroxilas e ligações duplas (Towsend, 2004). Chemlal *et al.* (2002) estudaram cepas de *M. ulcerans* provenientes de diferentes continentes (América, Ásia, África e Oceania) e verificaram que a micolactona A/B foi a mais potente dos macrolídeos, e somente não foi encontrada em uma cepa proveniente do México. As cepas africanas e uma cepa originária da Malásia foram as que produziram a maior quantidade de variantes de micolactonas (pelo menos 4 variantes além dos tipos A/B). Como todas as micolactonas são citopáticas, a presença de múltiplas variantes poderia contribuir para uma maior citopatogenicidade da cepa em questão (Mve-Obiang *et al.*, 2003). Portanto, o número e o tipo de micolactonas produzido podem ter implicações na virulência. Por exemplo, casos de DB com maior extensão e disseminação são observados com maior frequência na África onde as micolactonas A e B são mais abundantes. Em contraste, na Austrália, a micolactona C aparece em maior frequência quando comparada a micolactonas A e B. In vitro, a micolactona C é 10.000 vezes menos ativa do que as micolactonas A e B. O *M. ulcerans* é a única micobactéria cuja virulência é mediada por um plasmídeo. Este

plasmídeo de 174-kb (pMUM001) é composto por 6 genes, sendo que três deles codificam polipeptídeo-sintetases (Townsend,2004). Duas polipeptídeo-sintetases produzem o núcleo da micolactona e uma polipeptídeo-sintetase é responsável pelas cadeias laterais (Stinear *et al.*, 2004). Além destas enzimas, é necessária uma enzima acil-transferase para combinar as cadeias de ácidos graxos (Towsend, 2004).

Experimentos *in vitro* mostraram que a toxina é citotóxica para fibroblastos murinos (George *et al.*, 1998, 1999; Pimsler *et al.*, 1988) e também produz apoptose e necrose de diferentes células humanas (Marsollier *et al.*, 2002; Portaels *et al.*, 2001). George *et al.* (2000) demonstraram que macrófagos expostos a micolactona morrem por apoptose após 3 a 5 dias e que o uso de um inibidor de caspases protege as células da apoptose mas não da necrose. Ainda em seu experimento, ele demonstrou que a injeção de micolactona na pele do porquinho da Índia (cobaia) resulta na morte celular via apoptose.

4.4- EPIDEMIOLOGIA

Aparentemente, as populações de risco para a DB são as residentes em climas tropicais e expostas a águas paradas (van der Werf *et al.*, 1999; World Health Organization, 2002; Weir, 2002). A maioria da população atingida pela DB é pobre e vive em zona rural, próxima a zonas pantanosas, com acesso limitado aos serviços de saúde (van der Werf *et al.*, 1999; World Health Organization, 2002). Outros problemas importantes são as crenças e atitudes da população afetada. Muitos pacientes, mas também pessoas não afetadas, que vivem em regiões endêmicas acreditam que a bruxaria e a maldição são as causas desta doença. O estigma resultante dessa crença leva os pacientes a evitar os serviços médicos. Além disso, o medo dos tratamentos, principalmente o medo de amputações causa o atraso na procura dos hospitais.

Nas séries de casos analisadas, crianças entre 2 e 15 anos são o grupo mais afetado, sendo que mais de 50% dos casos são crianças abaixo dos 15 anos (van der Werf *et al.*, 1999; World Health Organization, 2002; Weir, 2002). Não há influência do sexo na distribuição da doença em crianças. Entre adultos, a incidência é maior entre as mulheres. As úlceras ocorrem com maior frequência nas extremidades e lesões em extremidades inferiores são quase duas vezes mais comuns que em membros superiores. Menos de 8% dos casos apresentam a úlcera em cabeça e tronco (Hayman e Asiedu, 2000). A razão para a distribuição etária com predomínio na infância é desconhecida, mas provavelmente certos aspectos do comportamento infantil e a ausência de imunidade adquirida contribuem para o aumento no risco (World Health Organization, 2002). Por outro lado, é interessante o fato de que a infecção pelo HIV não é um fator de risco. (Hayman e Asiedu, 2000).

Casos de DB têm sido relatados em pelo menos 27 países, a maioria em áreas tropicais (figura 2). A DB ocorre principalmente na África Ocidental e Central e Oceania, mas também foram relatados casos na América (Bolívia, México, Peru, Suriname e Guiana Francesa) e Ásia (China, Índia, Indonésia, Japão) (Hayman e Asiedu, 2000). Na África, a história da DB pode ser dividida em dois períodos principais: antes e após 1980, ano em que houve um grande incremento na prevalência e disseminação da doença (Hayman e Asiedu, 2000). A inexistência de dados sobre a prevalência e incidência exata desta doença se deve a vários fatores, entre eles ocorrência tipicamente em áreas remotas onde a população afetada tem pouco contato com o sistema de saúde (World Health Organization, 2002). Nas poucas comunidades onde a prevalência da doença tem sido estudada, o impacto é alto. A prevalência da DB em Uganda tem sido estimada entre 2 a 5% da população. No entanto, a prevalência pode ser bem maior em algumas comunidades específicas da Costa do Marfim (16%) e

em Gana (22%). A prevalência estimada varia de acordo as regiões afetadas, mas pode ser tão elevadas quanto 150–280/100.000 habitantes em alguns distritos de Gana. Prevalências similares têm sido reportadas na Costa do Marfim (van der Werf *et al.*, 2005). Em Benin, mais de 2300 casos foram relatados entre 1988 e 1997 (Hayman e Asiedu, 2000), e 1630 entre 1997 e 2001 (Debacker *et al.*, 2004). Neste país, entre 1997 e 2001, houve um aumento da incidência da DB no grupo entre 69 e 89 anos. Estes resultados poderiam ser explicados por uma piora do status imunológico, permitindo uma reativação de infecção latente. Outra possibilidade é que os resultados reflitam uma mudança de atitude neste grupo etário a partir de campanhas da OMS (Debacker *et al.*, 2004). No Brasil, a DB pode estar sendo negligenciada. Observadores internacionais indicam que DB pode ser endêmica na região fronteira com a Guiana Francesa (World Health Organization, 2007). Recentemente, médicos brasileiros das forças armadas publicaram um caso de uma mulher com DB atendida em Brasília (dos Santos *et al.*, 2007).

A experiência terapêutica adquirida em cerca de 300 pacientes de Benin, Camarões e Gana revelou que a administração de rifampicina e estreptomicina durante 8 semanas, conforme as diretrizes da OMS (World Health Organization, 2004b), produziu a cura completa de cerca de 50% das lesões. Além disso, pacientes com lesões extensas apresentaram redução de aproximadamente 50% da úlcera, o que permitiu excisões cirúrgicas menores e menos seqüelas. Também foi verificado que as recidivas com o tratamento antibiótico (somados à cirurgia quando necessário) ocorreram em menos de 2% dos casos, em comparação com 16-30% com o tratamento exclusivamente cirúrgico (Chemlal *et al.*, 2002). Estes dados estão modificando a estratégia de controle e tratamento da úlcera de Buruli, que até 2004 estava limitada ao tratamento cirúrgico.

ingerida. Então, estes bacilos se reativariam em áreas de temperatura corporal mais baixa, freqüentemente traumatizadas. A primeira hipótese parece ser a mais provável (Duker *et al.*, 2006).

O. M. ulcerans foi detectado nas glândulas salivares de insetos aquáticos pertencentes ao gênero *Naucoris* (família Naucaridae) e *Diplonychus* (família Belostomatidae) (Hayman e Asiedu, 2000; Marsollier *et al.*, 2002) (Figura 3). Marsollier *et al.* (2002) demonstraram que a picada destes insetos contaminados transmite a doença ao rato. Por esta razão, existe uma forte evidência de que estes insetos possam estar envolvidos na transmissão da doença. No entanto, poucos pacientes com DB referiram picada por insetos aquáticos antes do surgimento da úlcera. Uma explicação para isso talvez seja o tempo de incubação suficientemente longo, que permite ao paciente esquecer da picada (van der Werf *et al.*, 2003).



DOI: 10.1571/journal.pmed.0020108.g004

figura 3- Insetos transmissores da DB. Acima, *Macrocoris sp* (família *Naucaridae*). Abaixo, *Appasus sp* (família *Belastomatidae*). À esquerda visão ventral e à direita visão dorsal dos insetos. Fonte: Johnson et al, 2005.

O DNA do *M. ulcerans* foi detectado por PCR em outros predadores aquáticos (Odonata e Coleóptera), assim como em pequenos peixes, cobras aquáticas e biofilme de plantas aquáticas (Eddyani *et al.* 2004, Marsollier *et al.* 2004 a,b). Portaels *et al.* (2001) formularam uma hipótese para o modo de transmissão do *M. ulcerans* dos animais para o homem. Esta hipótese propõe que micobactérias do meio ambiente encontradas no leito de áreas pantanosas podem ser mecanicamente concentradas por organismos filtradores de água (por ex.: peixes, cobras, larvas de mosquitos, pequenos crustáceos, moluscos e protozoários) e a seguir liberadas novamente no ambiente onde seriam ingeridas por certos insetos aquáticos, tais como o besouro e o percevejo da água. Estes insetos, por sua vez, poderiam transmitir a doença aos humanos através da picada. Alguns peixes, predadores destes insetos aquáticos, poderiam concentrar ainda mais a micobactéria. Infecção natural foi observada somente na Austrália, em koalas, gambás e alpacas de cativeiro. As lesões são clinicamente idênticas às observadas em humanos (Portaels *et al.*, 2001). Talvez o meio mais freqüente pelo qual o *M. ulcerans* penetre na pele seja o trauma físico em meio à água contaminada. O maior contato com a água explicaria ao menos em parte, porque crianças abaixo dos 15 anos são mais afetadas que adultos e porque, entre adultos, a mulher é mais freqüentemente afetada (Huygen, 2003).

Não está demonstrada a transmissão entre humanos, embora alguns casos intrafamiliares tenham sido relatados (Hayman e Asiedu, 2000). A mortalidade é relativamente baixa, porém o sofrimento é prolongado e seqüelas graves são freqüentes (World Health Organization, 2002; Huygen, 2003).

A infecção por *M. ulcerans* é uma doença rapidamente emergente em alguns países tropicais em desenvolvimento. Esta emergência pode estar relacionada a fatores ambientais e socioeconômicos. O avanço de áreas desmatadas, aumentando a incidência

de alagamentos, e a expansão populacional sem um aprimoramento das técnicas agrícolas e de saneamento contribuem para dificultar a erradicação da DB (Portaels *et al.*, 2001). Após um episódio de alagamento a micobactéria pode ser levada de rios ou lagos a áreas urbanas e em condições favoráveis tais como estagnação relativa e temperatura adequada (27°C), infectar esta população.

4.4.2- *Fatores sócio-econômicos*

A desnutrição enfraquece as defesas do hospedeiro, diminuindo a função das células T e a imunidade mediada por células. Por outro lado, a desnutrição protéico-calórica pode conseqüentemente causar deficiência de micronutrientes como o zinco e resultar na susceptibilidade a toxinas produzidas pelas bactérias. Foi sugerido um sinergismo entre a pobreza, ignorância, higiene precária, abastecimento inadequado de água, habitação precária, falta de recursos médicos, práticas culturais de risco, nutrição inadequada e aumentando da exposição a patógenos agressores. Os pacientes com DB têm sido diagnosticados com hipoproteinemia, anemia, e outras doenças relacionadas com a desnutrição (Ducker *et al.*, 2006).

4.4.3- *Variações sazonais da DB*

Alguns autores têm referido uma sazonalidade na DB. Na Austrália, a doença foi notificada no final do outono ou inverno e na Nova Guiné e Camarões a incidência foi aumentada durante a estação seca. Em Uganda, estudos mostraram picos de incidência ocorrendo na estação de pouca chuva. Isso se repetiu em Gana e Costa do Marfim. Então, parece haver uma tendência de aumento de DB em períodos relativamente secos (Duker *et al.*, 2006).

4.5- ASPECTOS CLÍNICOS

Três fases clínicas da doença foram descritas: 1-pré-ulcerativa (que pode apresentar-se como um nódulo, pápula, placa ou edema), 2-ulcerativa e 3-cicatricial (Guarner *et al.*, 2003) (figura 4). A DB ocorre mais freqüentemente nas extremidades (Hayman e MacQueen, 1985; van der Werf *et al.*, 1999; Weir, 2002). Na maior parte dos pacientes africanos com DB, o tecido subcutâneo é o foco primário da infecção. Um nódulo firme não doloroso indica a primeira fase da doença. Neste caso as lesões são formadas por uma área extensa de pele endurecida e edema. Na Austrália, a apresentação da DB difere da África, provavelmente devido à presença de diferentes micolactonas. A doença freqüentemente inicia como uma pápula firme que pode ser semelhante a uma picada de inseto, sem envolvimento do tecido subcutâneo. Menos comumente, a lesão inicial pode ser um nódulo subcutâneo (Hayman, 1993; Van der Werf *et al.*, 1999). No segundo estágio, a ulceração toma lugar. Após um período de semanas, a úlcera aumenta em tamanho e profundidade (van der Werf *et al.*, 1999). A base da úlcera tem aspecto mucóide e freqüentemente é exudativa (Hayman e MacQueen, 1985). A necrose coalesce no tecido subcutâneo com oclusão vascular resultando em ulceração secundária da pele. Muitos BAAR estão presentes, mas a necrose se estende muito além dos locais onde a *M. ulcerans* pode ser isolada. A úlcera, se não for tratada aumenta progressivamente em tamanho, embora a cicatrização espontânea tenha sido descrita. O paciente, em geral, não apresenta sintomas sistêmicos. A cicatrização geralmente inicia no bordo proximal e se estende ao bordo distal, deixando uma cicatriz atrófica com grave deformidade (Guarner *et al.*, 2003). A cicatriz lembra uma queimadura de terceiro grau. Secundariamente podem surgir anquiloses, contraturas e linfedema. Outra apresentação da infecção, embora menos freqüente, é a

osteomielite (Hayman e MacQueen, 1985; Hayman, 1993; van der Werf *et al.*, 1999; Weir, 2002).



Figura 4. Fases clínicas da UB. A - fase pré ulcerativa, B - fase ulcerativa e C - fase cicatricial.

Denomina-se caso novo um paciente sem história prévia de DB ou tratado somente com cirurgia. Um caso recorrente é um paciente que apresenta nova lesão no período de 3 meses após ter finalizado o tratamento com antibioticoterapia e cirurgia (WHO Technical Advisory Group, 2007).

4.6- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

É possível dividir a DB em quatro estágios evolutivos do ponto de vista histopatológico (Portaels *et al.*, 2001):

Estágio necrótico não ulcerado: epiderme intacta, mas freqüentemente hiperplásica. A derme superior é geralmente preservada, mas pode mostrar graus variados de degeneração do colágeno e infiltração de pequeno número de células inflamatórias. Na derme inferior encontra-se necrose por coagulação, tecido subcutâneo e fáscia. Há edema, porém poucas células inflamatórias. Células adiposas edematosas podem

perder o núcleo e manter a membrana constituindo as “células fantasmas”. Bacilos são encontrados no centro da lesão, profundamente (derme profunda e pânículo adiposo). Vasculite, com oclusão de vasos por trombos, também pode estar presente.

Estágio necrótico ulcerado: ocorre perda da epiderme e tentativa de reepitelização nos bordos da úlcera. A epiderme adjacente geralmente é hiperplásica. A base da úlcera expõe a derme com material necrótico e fibrose. A necrose do tecido subcutâneo e do colágeno dérmico é acompanhada por edema, inflamação mínima e presença de numerosos BAAR (Guarner *et al.*, 2003; Hayman, 1993; Hayman e MacQueen, 1985). A necrose por coagulação se continua ao tecido celular subcutâneo e fáscia de forma similar à fase não ulcerativa. AFBs estão localizados na base do centro da úlcera e tecido celular subcutâneo. Parece haver uma associação significativa entre AFBs e a presença de neutrófilos no material necrótico (Guarner, 2003). Vasculite e calcificação também podem estar presentes.

Estágio cicatricial inicial (de organização e granulomatoso) – está caracterizado pelo início de uma resposta granulomatosa na derme e tecido celular subcutâneo. Compreende células epitelióides, células gigante tipo Langhans e linfócitos. Estas eventualmente se organizam e formam granulomas tuberculóides. Macrófagos espumosos, linfócitos e células plasmáticas são algumas vezes vistos nas margens do tecido necrótico. AFBs são escassos ou ausentes. O surgimento do tecido de granulação antecede a fase cicatrização das úlceras.

Cicatrização Tardia- Fibrose e cicatrização atrófica.

4.7- CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE DB PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (World Health Organization, 2000):

Critério clínico: Presença de 1 ou mais dos itens que seguem.

Presença de ferida crônica (varias semanas ou meses),

Lesão cutânea edematosa, placa ulcerada ou nódulo.

Uma ou mais lesões ulceradas não dolorosas com bordos mal definidos ou cicatriz atrófica,

Edema articular doloroso, sugestivo de envolvimento ósseo.

Critério laboratorial: qualquer um dos itens que seguem são suficientes para a positividade no diagnóstico de UB:

BAAR em secreção pela coloração de Ziehl–Neelsen (ZN),

Cultura positiva para *M. ulcerans* (6 – 8 semanas ou mais),

Estudo histopatológico de biópsia de pele,

PCR para *M. ulcerans*

São critérios auxiliares:

Ausência de febre ou linfadenopatia satélite,

Pacientes menores de 15 anos,

Pacientes que vivem ou viajaram para áreas endêmicas.

4.8- RESPOSTA TIPO Th1 E Th2, CÉLULAS CD4/CD8 E MACRÓFAGOS

Os conhecimentos aqui descritos estão baseados nos estudos *in situ* e *in vitro* (em modelos animais e também em humanos) realizados com *M. leprae* e *M. tuberculosis*.

A imunidade protetora anti-micobacteriana depende da coordenação da atividade de linfócitos e macrófagos, sendo mediada por citocinas bacteriostáticas e bactericidas liberadas por macrófagos ativados (Moore *et al.*, 1993). A resposta imunológica de tipo Th1, com altos níveis de IFN γ , é considerada crucial para a defesa do organismo contra as micobactérias (Newport *et al.*, 1996). O IFN γ é o maior fator em ativação macrofágica (Hayman e MacQueen, 1985; Goulart *et al.*, 2000; Guarner *et al.*, 2003). A importância do IFN γ para a imunidade contra infecções micobacterianas está demonstrada pelo aumento da susceptibilidade a infecções micobacterianas ambientais de crianças portadoras de deficiência no receptor 1 para IFN γ . Além disso, as células T CD4, as células T $\gamma\delta$, as células natural killer, T CD1 e células T CD8 são potentes recursos na produção de IFN γ (Infante-Duarte e Kamradt, 1999).

Por sua vez, os macrófagos ativados matam e degradam as micobactérias ingeridas e sintetizam e secretam citocinas como IL1, IL6, IL12 e TNF α . O TNF α é freqüentemente referido como uma citocina inflamatória, enfatizando o seu papel principal no início da cascata de citocinas (junto à IL1) e a liberação de outros fatores que compõem a resposta do sistema imunológico à infecção (Cherwinski *et al.*, 1987).

Na tuberculose, o sinergismo entre o TNF α e o IFN γ aumenta a produção de metabólitos do óxido nítrico, os quais contribuem para a morte das micobactérias (Pahlevan *et al.*, 1999). O TNF α , produzido principalmente por macrófagos, favorece a atividade microbicida dos monócitos e macrófagos contra a micobactéria (Hernández-Pando *et al.*, 1997, Bean *et al.*, 1999). Por outro lado, quando atinge grandes

concentrações locais e sistêmicas, o TNF α é prejudicial à cascata de eventos, sendo parcialmente responsável pelas manifestações tóxicas da tuberculose (Fiorenza *et al.*, 2005). O TNF α é essencial no mecanismo de proteção contra micobactérias e ratos deficientes em TNF α quando inoculados com *M. tuberculosis* são altamente suscetíveis à infecção, fracassando em montar uma resposta granulomatosa protetora nos órgãos afetados (Bean *et al.*, 1999).

Os macrófagos expõem uma diversidade de epítopos microbianos nas suas membranas celulares no contexto das moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade I ou II. Estes epítopos expostos na membrana dos macrófagos são reconhecidos pelas células T reativas (CD4 ou CD8), as quais, sob influência de fatores derivados de macrófagos (IL1, IL6 e IL12), proliferam e secretam citocinas (Rojas-Espinosa e Lovik, 2001). Dependendo da reação das células T, a resposta resultante pode ser humoral, mediada por células, citotóxica ou supressora. A ativação de células T CD4⁺ cooperadoras (helper) 1 (Th1) induz a proliferação e secreção de IFN γ e IL2, entre outras citocinas, enquanto que a ativação de células T CD4⁺ cooperadoras 2 (Th2) resulta na proliferação e secreção de IL4, IL5, IL6, IL10 e outras citocinas (Cherwinski *et al.*, 1987; Kaplan e Cohn, 1991; Mosmann *et al.*, 1991; Mosmann e Moore, 1991). O desenvolvimento da resposta Th1 ou Th2 é determinado por citocinas presentes no microambiente durante a ativação das células T na resposta primária ao antígeno. A IL12 e o IFN γ são importantes na decisão da adoção do fenótipo Th1 (Infante-Duarte e Kamradt, 1999).

In vitro, o IFN γ inibe a proliferação de células Th2 (Gajewski e Fitch, 1998), enquanto que IL4 e IL10 inibem a proliferação de células Th1 (Rook *et al.*, 2004). A IL12 derivada de macrófagos é chave como molécula co-estimuladora das células Th1,

ativando a síntese de IFN γ e outras citocinas. Por sua vez, o IFN γ estimula a síntese de TNF α pelos macrófagos, ativando assim a produção de óxido nítrico por estas células.

O óxido nítrico é um potente metabólito citotóxico, capaz de matar os microorganismos intracelulares fagocitados, incluindo o *M. leprae* (Liew e Cox, 1991). Por outro lado, as citocinas secretadas no perfil de tipo Th2 (IL4,IL6,IL10) estimulam as células B a proliferarem e se diferenciarem em células plasmáticas. As células plasmáticas passam, então, a produzir níveis elevados de anticorpos, especificamente de imunoglobulinas IgG e IgE (Coffman *et al.*, 1988; Rook *et al.*, 2004). Turner *et al.* (2002) demonstraram de forma convincente de que IL10 é a mais importante citocina imunossupressora em infecção pulmonar crônica ou progressiva.

4.9- FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

O TGF- β é uma proteína dimérica com peso molecular de 25 kDa. Foi descoberto em 1978, sendo então chamado de “fator de crescimento de sarcoma”. Desse peptídeo são conhecidas 5 isoformas, sendo que 3 delas existem nos mamíferos (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) (López-Castillas, 1998). As 3 isoformas de TGF β são codificadas em cromossomos humanos distintos, como segue: TGF- β 1 no 19q13, TGF- β 2 no 1q41 e TGF- β 3 no 14q24. Por outro lado, são conhecidos ao menos 3 diferentes tipos de receptores para TGF- β : T β -RI, T β -RII, T β -RIII (López-Castillas *et al.*, 1991, 1993; Wrana *et al.*, 1994; López-Casillas, 1998). Os receptores de TGF- β tipos I e II são receptores de sinalização. A propagação intracelular do sinal de TGF- β se inicia quando o T β -RII forma um complexo mediado pelo ligando com o T β -RI. Esta associação permite ao receptor de tipo II fosforilar os resíduos da região GS do receptor I, causando a ativação da quinase do último (López-Casillas, 1998; López-Castillas *et al.*, 1991, 1993; Wrana *et al.*, 1994). A quinase ativada do receptor 1 fosforila membros

da família SMAD e forma um complexo que é capaz de ativar a transcrição de genes induzíveis pelo TGF- β (Wrana e Pawson, 1997).

O papel do T β -RIII está na regulação, pois é capaz de modular o excesso do fator em relação aos receptores de tipos I e II (López-Castillas *et al.*, 1991, 1993; Wrana *et al.*, 1994). Um aspecto importante é que sua forma membranal serve como precursor da forma solúvel. Por sua vez, quando se encontra unido à membrana é um potencializador dos efeitos do TGF- β , e quando se encontra na forma solúvel é um antagonista de seus efeitos (López-Casillas, 1998; López-Castillas *et al.*, 1991).

O TGF- β desempenha um importante papel na imunoregulação, com ação anti e pró-inflamatória. Algumas atividades pró-inflamatórias incluem atividades quimiotáticas para monócitos, neutrófilos e linfócitos; estímulo sobre a expressão de integrinas e recrutamento e ativação de monócitos, que por sua vez, secretam os mediadores inflamatórios IL-1, IL6, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF α e o próprio TGF- β (controle autócrino) (Hernández-Pando *et al.*, 1996; Wahl *et al.*, 1987).

Por outro lado, seus efeitos imunossupressores são bem conhecidos: regulação negativa na expressão do receptor de IL-1 e expressão simultânea do antagonista do receptor de IL-1; e supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias por vários tipos celulares. Além disso, o TGF- β 1 apresenta a capacidade de inibir a atividade lítica dos macrófagos pela supressão da produção de fatores que medeiam reações do oxigênio e nitrogênio, conduzindo à progressão da infecção (Goulart *et al.*, 1996). Talvez seu maior efeito imunossupressor esteja na capacidade de inibir a proliferação de linfócitos T (via supressão de IL2 e/ou depressão na expressão do receptor de IL2) e B (a IL2 promove a proliferação de células B, na presença da IL4). Em modelos experimentais, foi demonstrado que a liberação de TGF- β 1 durante a infecção macrofágica resulta na

inibição de seu efeito citotóxico e co-estimula a proliferação de células CD8⁺ (Roberts, 1998).

O TGF β é produzido pelos macrófagos e mostrou ter uma ação negativa no controle da proliferação micobacteriana (Hernández-Pando *et al.*, 1996,1997; Kiszewski *et al.*, 2003a). Em um modelo experimental, o aumento dos níveis de TGF β tem sido associado com um aumento da gravidade da doença (Rangel-Moreno *et al.*, 2002). Vários estudos foram realizados em pacientes com tuberculose pulmonar para determinar os níveis de TGF β . Níveis elevados foram encontrados no plasma de pacientes com tuberculose ativa quando comparados a controles e a pacientes curados (Hwang, 1989; 2002; Huygen, 2003). Estudos em hanseníase encontraram resultados semelhantes (Goulart *et al.*, 1996, 2000; Kiszewski *et al.*, 2003a). No Brasil, Goulart *et al.* (1996) analisaram 41 biopsias de diferentes formas clínicas de hanseníase através de imunohistoquímica para TGF- β 1. Eles verificaram que nas formas lepromatosas e borderline lepromatosas, as células do infiltrado eram fortemente positivas, enquanto a reação não foi detectada nas formas borderline tuberculóide e tuberculóide polar. Concluíram então que os mecanismos supressores da imunidade celular na hanseníase lepromatosa poderiam ser mediados por TGF- β 1. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores (Goulart *et al.*, 2000), foi avaliada a concentração de TGF- β 1 nas células mononucleares do sangue de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase e indivíduos saudáveis. Encontraram-se concentrações mais elevadas na forma lepromatosa e na borderline lepromatosa, enquanto que na forma classificada como tuberculóide, os níveis foram mais baixos inclusive que os encontrados nos controles (Goulart *et al.*, 2000). Kiszewski *et al.* (2003a) também estudaram a expressão *in situ* de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 e seus 3 receptores em pacientes com formas polares de hanseníase e verificaram que a expressão das moléculas e dos seus

receptores foi mais elevada na forma lepromatosa da doença quando comparada à forma tuberculóide. Estes resultados confirmam que, em altas concentrações, o TGF- β causa efeito antiinflamatório e supressão da imunidade mediada por células (Wahl *et al.*, 1989).

4.10- AS CICLOOXIGENASES (COXs)

As enzimas do tipo COXs estão envolvidas na produção das prostaglandinas, que por sua vez podem induzir a uma modificação do perfil de resposta imunológica de tipo 1 para tipo 2.

A Ciclooxigenase 2 (COX2) está envolvida na produção de prostaglandinas. O primeiro passo na síntese das prostaglandinas é a liberação do ácido araquidônico pela enzima fosfolipase A2 (Serhan *et al.*, 1996). Este ácido está normalmente presente nas membranas celulares, conectado a fosfolípidios, sendo ele o principal substrato para a produção dos eucosanóides. Esses últimos interferem em muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo processados por duas classes principais de enzimas (ciclooxigenases e lipooxigenases) as quais produzem prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (Phipps *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 1993). A produção de prostaglandinas é mediada por duas enzimas que possuem pesos moleculares similares (70Kda) (Mitchell *et al.*, 1993), sendo a COX1 constitutiva e a COX2 induzida. Essas enzimas são codificadas por seqüências gênicas localizadas em cromossomos diferentes. A informação genética da COX2 está contida em 10 exons (Mitchell *et al.*, 1993). O promotor contém uma caixa TATA e muitos elementos regulatórios (Wang *et al.*, 1993; Serhan *et al.*, 1996). A enzima COX2 se encontra ausente em condições basais, mas sua produção pode ser induzida em algumas populações celulares (polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais) em resposta a

vários estímulos, tais como mitógenos, citocinas, lipopolissacarídeos, hormônios, produtos bacterianos, soro e pela transformação oncogênica (Mitchell *et al.*, 1993; Kurumbail *et al.*, 1996).

As prostaglandinas da série E (PGE) têm uma posição de destaque na resposta imune (Phipps *et al.*, 1991). Existe uma relação entre a PGE e os agentes que promovem um aumento da concentração do AMPc intracelular, o qual está relacionado com uma diminuição drástica na expressão de interleucinas do perfil tipo Th1 como IFN γ e IL2 (Mitchell *et al.*, 1993; Serhan *et al.*, 1996; Endo *et al.*, 1998; Gajewski e Fitch, 1998; Niiri *et al.*, 1998). Em concentrações elevadas a PGE2 têm efeitos imunossupressores importantes, incluindo a diminuição da proliferação linfocítica, da atividade das células “natural killer”, da expressão do complexo histocompatibilidade maior de classe II e da supressão da produção de TNF α e IL1 (Snyder *et al.*, 1982; Goto *et al.*, 1983; ; Mitchell *et al.*, 1993; Kurumbail *et al.*, 1996). Essa última atividade pode ser muito importante em doenças produzidas por micobactérias.

Em nível imunológico, a síntese de COX 2 é promovida pela presença no microambiente de citocinas proinflamatórias (TNF α , IL1) ou pela presença de produtos bacterianos (LPS) (Maloney *et al.*, 1998). A IL17 e a COX1 também são potentes indutoras da produção de PG (Fossiez *et al.*, 1996). Geralmente, a regulação negativa da síntese de COX2 é favorecida pela presença no microambiente de citocinas de caráter antiinflamatório, como IL4, IL10, IL13 (Endo *et al.*, 1998; Gajewski e Fitch, 1998; Niiri *et al.*, 1998). Por outro lado, as PGs afetam negativamente a produção de IFN γ , eliminando os efeitos antagônicos de tal citocina na produção de IL4 e IL1. Esse mecanismo poderia promover a síntese de PGE e polarizar a resposta em direção ao perfil Th2. Rangel-Moreno *et al.* (2002) em seu trabalho sobre imunopatogênese da PGE2 na tuberculose pulmonar experimental evidenciaram dois achados principais: (1)

a produção de PGE2 e a expressão de COX aumentam progressivamente durante o curso da infecção e (2) há diferentes efeitos na resposta patológica e imunológica quando a produção de PG é suprimida durante estágios recentes e tardios da infecção. Concentrações baixas e estáveis de PGE2 durante a fase inicial da infecção contribuem para a produção de óxido nítrico. No entanto, em fases avançadas de infecção, há uma alta concentração de PGE2, levando à supressão da resposta celular e permitindo a progressão da infecção (Rangel-Moreno *et al.*, 2002).

Em modelos experimentais com ratos, Sibley e Krahenbuhl (1988) verificaram que macrófagos de granulomas infectados por *M. leprae* produziam níveis elevados de prostaglandina E2 in vitro, a qual foi suprimida por indometacina. Por outro lado, um estudo feito com cobaias, não detectou PGE nos sobrenadantes de cultivo de células de granulomas (Montreewasuwat *et al.*, 1987).

Misra *et al.* (1995) verificaram que os monócitos infectados de pacientes lepromatosos (mas não naqueles de Hanseníase tuberculóide) liberavam fatores solúveis contendo IL-10 e PGE2. Kiszewski *et al.* (2003b) compararam os níveis de COX2 na pele de pacientes com Hanseníase tuberculóide (que apresentam uma resistência natural à doença) e Hanseníase lepromatosa (forma anérgica da doença). Nesses últimos, os níveis eram cerca de 10 vezes maiores do que os encontrados nas formas tuberculóides. Pelos estudos citados, concentrações elevadas de PGE2 poderiam implicar na manutenção da resposta tipo Th2 e facilitar as infecções micobacterinas.

4.11- RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DE BURULI

Embora os aspectos imunológicos da infecção pelo *M. tuberculosis* e do *M. leprae* sejam bem conhecidos, o mesmo não acontece com a infecção pelo *M. ulcerans*. É possível que a infecção inicial pelo *M. ulcerans*, de forma similar ao que ocorre nas

infecções pelo *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, seja controlada pelas defesas imunológicas inatas ou adquiridas e somente um pequeno número de pessoas desenvolvam a doença (Huygen, 2003; van der Werf *et al.*, 2005; Duker *et al.*, 2006). Na maioria dos pacientes as úlceras cicatrizam espontaneamente, após tomarem grandes dimensões (Huygen, 2003). O curso crônico da DB e a presença de abundantes bacilos extracelulares, relativa escassez de infiltrado inflamatório, ausência de sintomas sistêmicos e de linfadenopatia regional sugerem depressão ou ausência de resposta imune mediada por células T (van der Werf *et al.*, 1999). Nos indivíduos que desenvolvem a doença, as bactérias são fagocitadas de forma ineficiente ou escapam dos macrófagos antes de serem mortas, processadas e apresentadas aos linfócitos T (Gooding *et al.*, 2001). O desenvolvimento da DB poderia decorrer de um desvio imunológico resultante da supressão da resposta tipo Th1 ou ainda decorrer da incapacidade do sistema imunológico em montar uma resposta adequada a antígenos micobacterianos. Esta incapacidade poderia estar relacionada a maior expressão de outras citocinas supressivas da imunidade celular ou concentração elevada da toxina micolactona (Gooding *et al.*, 2001; Gooding *et al.* 2002; Duker *et al.* 2006; van der Werf *et al.*, 2005).

4.11.1- Resposta Imunológica Celular

Pacientes com lesões iniciais seguidamente apresentam teste cutâneo negativo para o antígeno derivado do *M. ulcerans* (burulina). Mais tarde, durante a fase de cicatrização, quando aparecem os granulomas, há uma conversão para o teste de burulina (torna-se positivo), indicando o desenvolvimento da resposta imune celular (Dobos *et al.*, 2000; Huygen, 2003). Por outro lado, o teste cutâneo à proteína purificada da tuberculina (PPD) em crianças que sofreram da doença pode ter uma frequência

elevada de reações positivas quando comparado aos não afetados (Gooding *et al.*, 2002; Huygen, 2003). Um estudo realizado em Benin mostrou que o BCG poderia proteger os pacientes de formas mais severas, principalmente a osteomielite (Portaels *et al.*, 2004). Outro estudo mostrou que a vacinação pela BCG daria proteção imunológica de aproximadamente 6 meses para a DB (van der Werf *et al.*, 2005).

Como na tuberculose e na hanseníase, nos casos de DB, o IFN γ produzido pelos linfócitos Th1 parece ter um papel fundamental no controle da infecção (Huygen, 2003). Existem controvérsias de qual é o verdadeiro perfil de citocinas nos diferentes estágios clínico-patológicos da DB. Gooding *et al.* (2001) analisaram pacientes na sua maioria com lesões cicatriciais ou no pós-operatório e observaram que estes exibiam profunda anergia sistêmica ao *M. ulcerans* e ao *M. bovis*, fato evidenciado por uma baixa produção de IFN γ por suas células mononucleares. Em outro estudo, os mesmos autores demonstraram que pacientes com lesões cicatriciais apresentavam um predomínio de resposta imunológica de tipo Th2 (IL4,IL5,IL6 e IL10) (Gooding *et al.*, 2002). Estes achados, no entanto, não foram confirmados por outros pesquisadores. Phillips *et al.* (2006) constataram uma maior produção de IL10 em pacientes com úlceras e uma produção similar de IFN γ em pacientes com úlceras e lesões cicatriciais. Níveis mais baixos de IFN γ em úlceras também foram encontrados no estudo de 13 pacientes realizado por Yeboah-Manu *et al.* (2006). Infelizmente, uma importante limitação dos estudos de Philips *et al.* (2006A) e de Yeboah-Manu *et al.* (2006) foi a não determinação do tempo de duração da doença. Westenbrink *et al.* (2005) estudaram 23 pacientes com úlceras recentes e 16 úlceras em fase de cicatrização (lesões tardias). Os pacientes com úlceras recentes apresentaram níveis mais baixos de IFN γ , sendo estes mais elevados na fase de cicatrização. Os níveis de IL10 e IL4 não foram diferentes em

pacientes com DB e controles, contrariando a idéia de que a IL10 pudesse ser responsável pela diminuição do IFN γ na fase ativa da doença.

Yeboah-Manu *et al.* (2006) analisaram a secreção de IL12 e verificaram que a mesma estava significativamente elevada nos pacientes, quando comparada aos controles. A IL12 induz as células T e NK a produzirem várias citocinas, inclusive IFN γ (Trinchieri, 2003). Este achado poderia refletir um mecanismo compensatório do sistema imune na tentativa de restaurar a produção de IFN γ e indica que a redução na produção de IFN γ destes pacientes não é causada pela diminuição de IL12 (Yeboah-Manu *et al.*, 2006).

Também existem controvérsias quanto ao perfil de citocinas que predominam nos estágio pré-ulcerativo, comparadas ao estágio ulcerativo. Prévot *et al.* (2004), analisando citocinas liberadas a partir da estimulação de células mononucleares periféricas de indivíduos com DB, verificaram que os níveis de IFN γ foram elevados e para IL10 foram baixos em lesões nodulares, enquanto que em lesões ulcerativas os níveis de IFN γ foram baixos e de IL10 foram altos. Por outro lado, este achado não foi confirmado por Phillips *et al.* (2006), que constataram maior produção de IFN γ e IL10 em lesões ulcerativas quando comparadas a lesões nodulares.

A redução na produção de IFN γ poderia ser conseqüência de uma anormalidade genética na função das células T, o que predisporia a infecções micobacterianas. No entanto, há evidências de que na DB, a redução na produção de IFN γ seja adquirida e não inata. Gooding *et al.* (2003), acompanharam a evolução imunológica de 1 paciente e constataram que, antes da infecção, as células mononucleares de sangue periférico respondiam *in vitro* à estimulação com *M. ulcerans* e produziam citocinas do perfil Th1. Após o desenvolvimento da úlcera, a resposta foi dirigida à produção de citocinas do perfil Th2. Yeboah-Manu *et al.* (2006) também demonstraram que, meses após o

tratamento cirúrgico de 13 pacientes com DB, houve um aumento significativo na produção de IFN γ , apoiando a idéia de um efeito adquirido.

Gooding *et al.* (2002) compararam indivíduos com ou sem DB que viviam na mesma casa. Os indivíduos que não apresentavam lesões tiveram uma maior produção de citocinas do Th1 (IFN γ e IL12) em resposta ao estímulo com *M. bovis*. Estes achados foram replicados por Yeboah-Manu *et al.*(2006), utilizando estímulo com PPD e por Phillips *et al.* (2006) utilizando estímulo com *M. ulcerans* e *M. bovis*.

Tendo em conta ser a IL10 um importante regulador negativo na produção de IFN γ (Moore *et al.*, 1993), não se poderia excluí-la como um dos possíveis fatores responsáveis pela baixa resposta do IFN γ na DB. A micolactona também apresenta efeitos imunossupressores que poderiam levar à inibição do estímulo e proliferação das células T. Segundo uma hipótese ainda não comprovada, a micolactona poderia estimular a produção de IL10 que por sua vez inibiria a produção de IFN γ (Huygen, 2003, Prévot *et al.*, 2004).

Além da IL10 e da micolactona, o TGF β poderia participar da inibição da resposta celular. O aumento dos níveis de TGF β está associado com a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias por vários tipos celulares, supressão da proliferação das células T e com a regulação negativa do receptor de IL1. Além disso, há evidências de que a maior produção de TGF β tem relação direta com o aumento da gravidade da tuberculose (Allen *et al.* 2004). No entanto, ainda não foi esclarecido o possível papel do TGF β na DB.

Não há dados disponíveis sobre células CD4 e CD8 em pacientes com DB, tampouco dados sobre COX2.

4.11.2- *Resposta Imunológica Humoral*

Enquanto que na tuberculose e na hanseníase são produzidos anticorpos na etapa de infecção avançada (Huygen, 2003), na DB a produção de anticorpos de tipo IgG contra o *M. ulcerans* ocorre desde as etapas iniciais da doença. Notadamente, a produção de anticorpos também ocorre em contatos familiares não afetados (Gooding *et al.*, 2002). Dobos *et al.* (2000), analisando amostras de pacientes africanos, verificaram que a maioria dos indivíduos apresentava anticorpos para *M. ulcerans* (70,5% dos pacientes e 37% dos controles), não encontrando correlação entre o estágio clínico da doença e o início da produção de anticorpos. Por outro lado, a produção de IgM contra *M. ulcerans* pode ser detectada em 85% dos pacientes e em somente 4,5% dos contatos familiares. Os pacientes com anticorpos IgM apresentam-se clinicamente na fase nodular e ulcerativa da doença (Huygen, 2003).

Gooding *et al.* (2001), estudando indivíduos australianos, encontraram que 9 de 11 pacientes (2 com doença ativa e 9 com doença cicatricial) apresentaram anticorpos contra o *M. ulcerans*. Os autores também observaram que a natureza dos antígenos bacterianos era incerta, pois foram encontrados diferentes pesos moleculares e poderiam corresponder a proteínas parcialmente degradadas, glicolipídios de superfície ou ambos.

4.11.3- *Modulação da resposta imune do hospedeiro pela M. ulcerans e a contribuição da micolactona*

Coutanceau *et al.* (2005) demonstraram através de um modelo experimental em ratos, que na fase inicial da infecção, a *M. ulcerans* é capturada por células fagocíticas e seu predomínio é intracelular. A passagem para a segunda fase (extracelular) ocorreria pela ação da enzima micolactona, induzindo a morte das células infectadas após alguns dias de infecção. A passagem intracelular (transitória) poderia contribuir para o

estabelecimento da infecção crônica. As propriedades antifagocíticas e citotóxicas da micolactona (suprimindo a apresentação antigênica) poderiam ajudar a micobactéria a escapar do sistema imunológico. Ainda nesse estudo foi observada uma elevada produção de IFN γ nas duas primeiras semanas pós-infecção, seguida por um defeito na produção de IFN γ no estágio ulcerativo. A micolactona suprime a produção de interleucina-2 produzida por célula T, a produção de TNF α por monócitos e induz a apoptose dos macrófagos (Coutanceau *et al.*, 2005; George *et al.*, 1998; Pahlevan *et al.*, 1999; Pimsler *et al.*, 1988), além de estimular as citocinas inflamatórias MIP-2 e MCP-1 (Coutanceau *et al.*, 2005). Além dos efeitos mencionados, a micolactona parece ter um papel inibitório no recrutamento de células inflamatórias (George *et al.*, 2000).

4.11.4- Infecção Experimental

A infecção experimental com *M. ulcerans* em camundongos, ratos, cobaias e tatu de nove bandas mostra observações contraditórias em relação à indução da resposta inflamatória. Em alguns estudos a resposta inflamatória foi importante (Krieg *et al.*, 1974; Read *et al.*, 1974), enquanto em outros a inflamação foi minimamente observada (George *et al.*, 1999; George *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 1999). Além disso, o processo dinâmico da infecção e a resposta do hospedeiro em diferentes estágios da infecção com *M. ulcerans* são pouco compreendidos. Oliveira *et al.* (2005) estudaram a resposta inflamatória de diferentes cepas de *M. ulcerans* em coxinete plantar de camundongos. Eles verificaram que cepas produtoras de micolactona tiveram atividade citotóxica e proliferativa, enquanto que cepas não produtoras perdiam a atividade citotóxica e a virulência. Também constataram que o *M. ulcerans* induz uma resposta inflamatória neutrofílica precoce, que é independente da virulência, seguida por uma resposta celular prolongada que difere de acordo a cepa.

As cepas negativas para micolactona não produzem infecção crônica, sendo que a resposta inflamatória inicial neutrofílica muda para um infiltrado mononuclear crônico associado a estruturas similares a granulomas, na ausência de necrose. Também foi demonstrado neste estudo que, ao contrário das outras infecções micobacterianas, a mudança de uma resposta neutrofílica inicial para uma resposta crônica mononuclear associada com células gigantes e epitelióides não está completa na infecção pelo *M. ulcerans*. Os autores concluem que a presença de áreas de processo inflamatório celular mínimo ou ausente em infecção avançada com cepa virulenta de *M. ulcerans* não se devia à perda do recrutamento de células inflamatórias, mas sim à destruição do infiltrado inflamatório pré-existente. Os mesmos autores sugeriram que a destruição do infiltrado inflamatório se deva à atividade citotóxica da micolactona, através da indução de apoptose e necrose.

5- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

5.1- JUSTIFICATIVA

A DB é uma infecção emergente do século XXI que afeta 4 dos 5 continentes (África, América, Austrália e Ásia) e tem preocupado cientistas em todo o mundo. Nas últimas décadas, a DB tem se tornado um problema de saúde pública principalmente nos países africanos, onde a doença está longe de ser controlada. Neste contexto, a DB é considerada uma doença negligenciada. Em 1998, teve início uma iniciativa global da OMS com o objetivo de oferecer o apoio de pesquisadores internacionais e laboratórios de referência e treinamento de médicos e paramédicos no diagnóstico e tratamento dos pacientes, além de incentivar pesquisas em DB. A iniciativa motivou os participantes desse projeto em colaborar para gerar conhecimentos na área da imunopatologia da DB. Outro fator motivador para a realização desse trabalho é o relato de evidências sobre a presença da DB no Brasil.

Quanto ao tratamento, a única possibilidade efetiva até 2004 era a extirpação cirúrgica precoce da lesão. Naquele ano, passou a ser preconizado um esquema terapêutico envolvendo o uso conjunto de antibióticos e cirurgia, diminuindo o sofrimento e as seqüelas, especialmente nos casos em que o tratamento é precoce. Este foi, sem dúvida, um importante avanço, mas esta doença continua causando incapacidades nos indivíduos afetados, motivo pelo qual as pesquisas devem continuar. Este projeto visa esclarecer o perfil imunológico local (*in situ*) encontrado na DB, já que os estudos nesta área são poucos e contraditórios. O conhecimento obtido pelo estudo da expressão de citocinas *in situ* na DB visa contribuir no processo de identificação de mecanismos fisiopatogênicos da doença. Também poderá contribuir no futuro para o desenvolvimento e seleção de medicamentos imunomoduladores, e na avaliação da

eficácia dos antibióticos. Vale destacar que o conhecimento obtido com a DB também pode vir a ser útil na compreensão de outras doenças provocadas por micobactérias, especialmente a hanseníase e a tuberculose, doenças de grande prevalência e impacto social no Brasil.

5.2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os diferentes aspectos da resposta imunopatológica local, através da técnica de imunohistoquímica, em biópsias de pele de pacientes com doença de Buruli na fase clínica ulcerativa da doença, porém em dois diferentes estágios histológicos: estágio necrótico ulcerado e estágio de organização com granulomas.

Objetivos Específicos

- a- Identificar a expressão e distribuição de linfócitos CD4 e CD8 e do marcador de macrófagos CD68;
- b- Avaliar a expressão das citocinas $IFN\gamma$, IL10, $TNF\alpha$, $TGF\beta$;
- c- Identificar a expressão da enzima COX2;
- d- Analisar as diferenças encontradas na expressão de todos os marcadores acima no estágio necrótico ulcerado e no estágio de organização com granulomas.
- e- Comparar a contagem de bacilos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen no estágio necrótico ulcerado e no estágio de organização com granulomas.

6- REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Alsop DG. The Bairnsdale ulcer. *Aus NZ J Surg* 1972;41:317-9.

Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton WJ. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol*. 1999;162:3504-11.

Chemlal K, Huys G, Laval F, Vincent V, Savage C, Gutierrez C, Laneelle MA, Swings J, Meyers WM, Daffe M, Portaels F. Characterization of an unusual *Mycobacterium*: a possible missing link between *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2370-80.

Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper Tcell clone. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Experim Med* 1987;166:1229-44.

Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW, *et al.* The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988;102:5-28.

Coutanceau E, Marsollier L, Brosch R, Perret E, Goossens P, Tanguy M, Cole ST, Small PL, Demangel C. Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of *Mycobacterium ulcerans*: the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cell Microbiol*. 2005;7:1187-96.

- Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Scott JT, Dramaix M, Portaels F. Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity. Trop Med Int Health. 2004;9:1297-304.
- Dobos KM, Quinn FD, Ashford DA, Horsburgh CR, King CH. Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases. Emerg Infect Dis. 1999;5:367-78.
- Dobos KM, Spotts EA, Marston BJ, Horsburgh CR Jr, King CH. Serologic response to culture filtrate antigens of Mycobacterium ulcerans during Buruli ulcer disease. Emerg Infect Dis. 2000;6:158-64.
- dos Santos VM, Noronha FL, Vicentina EC, Lima CC. Mycobacterium ulcerans infection in Brazil. Med J Aust. 2007;187:63-4.
- Duker AA, Portaels F, Hale M. Pathways of Mycobacterium ulcerans infection: a review. Environ Int. 2006;32:567-73.
- Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, De Weirdt D, Boakye D, Meyers WM, Portaels F. Potential role for fish in transmission of Mycobacterium ulcerans disease(Buruli ulcer): an environmental study. Appl Environ Microbiol. 2004;70:5679-81.
- Endo T, Ogushi F, Kawano T, Sone S. Comparison of the regulations by Th2-type cytokines of the arachidonic-acid metabolic pathway in human alveolar macrophages and monocytes. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;19:300-7.
- Fiorenza G, Rateni L, Farroni MA, Bogue C, Dlugovitzky DG. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity. Immunol Lett. 2005;98:45-8.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein

P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183:2593-603.

Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol.* 1988;140:4245-52.

George KM, Barker LP, Welty DM, Small PL. Partial Purification and characterization of biological effects of lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 1998;66:587-93.

George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, Small PL. Mycolactone: A Polyketide Toxin from *Mycobacterium ulcerans* Required for Virulence. *Science* 1999;283:854-7.

George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL. A *mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in Guinea Pig *ulcerans* and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000;68:877-83.

Gooding TM, Johnson PD, Campbell DE, Hayman JA, Hartland EL, Kemp AS, Robins-Browne RM. Immune response to infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun.* 2001;69:1704-7.

Gooding TM, Johnson PD, Smith M, Kemp AS, Robins-Browne RM. Cytokine profiles of patients infected with *Mycobacterium ulcerans* and unaffected household contacts. *Infect Immun.* 2002;70:5562-7.

Gooding TM, Kemp AS, Robins-Browne RM, Smith M, Johnson PD. Acquired T-helper 1 lymphocyte anergy following infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Infect Dis.* 2003;36:1076-7.

- Goto TR, Herberman RB, Maluish A, Strong DM. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol* 1983;130:1350-5.
- Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol*. 1996;148:911-7.
- Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin Exp Immunol*. 2000;122:330-4.
- Guarner J, Bartlett J, Whitney EA, Raghunathan PL, Stienstra Y, Asamo K, Etuaful S, Klutse E, Quarshie E, van der Werf TS, van der Graaf WT, King CH, Ashford DA. Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:651-6.
- Hayman J, Asiedu K. Epidemiology. In: Asiedu K, Scherpbier R, Raviglione M (Eds.) *Buruli ulcer: Mycobacterium ulcerans* infection. 2000; Geneva: World Health Organization.
- Hayman J, McQueen A. The pathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Pathology*. 1985;17:594-600.
- Hayman J. Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Clin Pathol*. 1993;46:5-9.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1997;90:607-17.

- Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996;89:26-33.
- Huygen K. Prospects for vaccine development against Buruli disease. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:561-9.
- Hwang D. Essential fatty acids and immune response. *FASEB J*. 1989;3:2052-61.
- Johnson PD, Stinear T, Small PL, Pluschke G, Merritt RW, Portaels F, Huygen K, Hayman JA, Asiedu K. Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med*. 2005; 2:e108.
- Kaplan G, Cohn ZA. Leprosy and Cell Mediated Immunity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:91-6.
- Kiszewski A, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernandez-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand J Immunol*. 2003a;57:279-85.
- Kiszewski AE, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernandez Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol*. 2003b;148:795-8.
- Krieg RE, Hockmeyer WT, Connor DH. Toxin of *Mycobacterium ulcerans*. Production and effects in guinea pig skin. *Arch Dermatol*. 1974;110:783-8.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 1996;384:644-8.

Liew FY, Cox FE. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today*. 1991;12:A17-21.

López-Casillas F. El lado oscuro y el lado brillante del TGF β . *Mensaje Bioquímico* 1998;22:137-61.

López-Castillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Wassague J. Structure and expression of membranes proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 1991;67:785-95.

López-Castillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-44.

MacCallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons HA. A new mycobacterial infection in man. *J Pathol Bacteriol* 1948;60:92-122. Apud: van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, Asiedu K. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet*. 1999;354:1013-8.

Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol*. 1998;160:1402-10.

Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahaza C, Carbonnelle B. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:4623-8.

Marsollier L, Severin T, Aubry J, Merritt RW, Saint Andre JP, Legras P, Manceau AL, Chauty A, Carbonnelle B, Cole ST. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol*. 2004a;70:6296-8.

Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint Andre JP, Robert R, Legras P, Manceau AL, Audrain C, Bourdon S, Kouakou H, Carbonnelle B. Aquatic plants stimulate the growth of and

- biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2004b;70:1097-103.
- Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, Nath I. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett.* 1995;48:123-28.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11693-7.
- Montreewasuwat N, Curtis J, Turk JL. Interleukin 1 and prostaglandin production by cells of the mononuclear phagocyte system isolated from mycobacterial granulomas. *Cell Immunol.* 1987;104:12-23.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.
- Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today.* 1991;12:A49-53.
- Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, Budd R, O'Garra A, Fong TA, Bond MW, Moore KW, Sher A, Fiorentino DF. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells. *Immunol Rev.* 1991;123:209-29.
- Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PL. Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun.* 2003;71:774-83.
- Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996;335:1941-9.

- Nihiro H, Otsuka T, Ogami E, Yamaoka K, Nagano S, Akahoshi M, Nakashima H, Arinobu Y, Izuhara K, Niho Y. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:200-5.
- Oliveira MS, Fraga AG, Torrado E, Castro AG, Pereira JP, Filho AL, Milanezi F, Schmitt FC, Meyers WM, Portaels F, Silva MT, Pedrosa J. Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. *Infect Immun.* 2005;73:6299-310.
- Pahlevan AA, Wright DJM, Andrews C, George KM, Small PLC, Foxwell BM. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF- κ B function. *J Immunol.* 1999;163:3928-35.
- Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today.* 1991;12:349-52.
- Phillips R, Horsfield C, Kuijper S, Sarfo SF, Obeng-Baah J, Etuaful S, Nyamekye B, Awuah P, Nyarko KM, Osei-Sarpong F, Lucas S, Kolk AH, Wansbrough-Jones M. Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with *Mycobacterium ulcerans* disease compared to that from patients with tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2006A; 13:253-7.
- Phillips R, Horsfield C, Mangan J, Laing K, Obeng-Baah J, Awuah P, Nyarko K, Osei-Sarpong F, Butcher P, Lucas S, Wansbrough-Jones M. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. *Infect Immun* 2006B; 74:2917-2924.
- Pimsler M, Sponnsler TA, Meyers WM. Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. *J Infect Dis* 1988;157:577-80.

- Portaels F, Aguilar J, Debacker M, Guédénon A, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM. *Mycobacterium bovis* BCG vaccination as prophylaxis against *Mycobacterium ulcerans* osteomyelitis in Buruli ulcer disease. *Infect Immun* 2004;72:62-5.
- Portaels F, Aguilar J, Fissette K, Fonteyne PA, De Beenhouwer H, de Rijk P, Guedenon A, Lemans R, Steunou C, Zinsou C, Dumonceau JM, Meyers WM. Direct detection and identification of *Mycobacterium ulcerans* in clinical specimens by PCR and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1097-100.
- Portaels F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PD, Hayman JA, Hibble J, Kirkwood R, Meyers WM. *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. *Rev Sci Tech*. 2001;20:252-64.
- Portaels F, Johnson P, Meyers W. Histopathological methods for diagnosis of *M. ulcerans* disease. *Buruli ulcer: Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease*. 2001; Geneva: World Health Organization.
- Prevot G, Bourreau E, Pascalis H, Pradinaud R, Tanghe A, Huygen K, Launois P. Differential production of systemic and intralésional gamma interferon and interleukin-10 in nodular and ulcerative forms of Buruli disease. *Infect Immun*. 2004;72:958-65.
- Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2002;106:257-66.
- Read JK, Heggie CM, Meyers WM, Connor DH. Cytotoxic activity of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 1974; 9:1114-22.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*. 1998;24:111-9.

- Rojas-Espinosa O, Lovik M. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infections in domestic and wild animals. *Rev Sci Tech.* 2001;20:219-51.
- Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol.* 2004;25:483-8.
- Rook GA, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:259-84.
- Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* 1996;10:1147-58.
- Sibley LD, Krahenbuhl JL. Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 1988;56:1912-9.
- Snyder DS, Beller DI, Unanue ER. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature* 1982;299:163-5.
- Snyder DS, Small PL. Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Micobacterium ulcerans*. *Microb Pathog* 2003;34:91-101.
- Stinear TP, Mve-Obiang A, Small PL, Frigui W, Pryor MJ, Brosch R, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK, Lee RE, Adusumilli S, Garnier T, Haydock SF, Leadlay PF, Cole ST. Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:1345-9.
- Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, Garnier T, Meurice G, Simon D, Bouchier C, Ma L, Tichit M, Porter JL, Ryan J, Johnson PD, Davies JK, Jenkin GA, Small PL, Jones LM, Tekaiia F, Laval F, Daffé M, Parkhill J, Cole ST. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res.* 2007;17:192-200.

- Townsend CA. Buruli toxin genes decoded. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1116-7.
- Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, Cooper AM. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2002;169:6343-51.
- van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC, Phillips R, Adjei O, Fleischer B, Wansbrough-Jones MH, Johnson PD, Portaels F, van der Graaf WT, Asiedu K. Mycobacterium ulcerans disease. *Bull World Health Organ*. 2005; 83:785-91.
- van der Werf TS, Stinear T, Stienstra Y, van der Graaf WT, Small PL. Mycolactones and Mycobacterium ulcerans disease. *Lancet*. 2003;362:1062-4.
- van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, Asiedu K. Mycobacterium ulcerans infection. *Lancet*. 1999;354:1013-8.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:5788-92.
- Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta. *Immunol Today* 1989;10:258-61.
- Walsh DS, Meyers WM, Krieg RE, Walsh GP. Transmission of Mycobacterium ulcerans to the nine-banded armadillo. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61:694-7.
- Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, Loose-Mitchell D, Wu KK. Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;190:406-11.
- Weir E. Buruli ulcer: The Third most common mycobacterial infection. *CMAJ* 2002;166:1691.

Westenbrink BD, Stienstra Y, Huitema MG, Thompson WA, Klutse EO, Ampadu EO, Boezen HM, Limburg PC, van der Werf TS. Cytokine responses to stimulation of whole blood from patients with Buruli ulcer disease in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:125-9.

WHO Technical Advisory Group. Summary report of the WHO annual meeting on Buruli ulcer. 2007. http://www.who.int/buruli/events/Report_2007_meeting_FINAL.pdf

World Health Organization. Buruli ulcer. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75:106-8.

World Health Organization. Buruli ulcer disease. *Wkly Epidemiol Rec* 2002;32:271-275.

World Health Organization. Buruli ulcer disease. *Wkly Epidemiol Rec* 2004a;20:194-200.

World Health Organization. Provisional guidance on the role of specific antibiotics in the management of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). 2004b; WHO: Geneva.

World Health Organization. Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* infection). Fact sheet N° 199. 2007. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs199/en/>

Wrana J, Pawson T. Signal transduction. Mad about SMADs. *Nature.* 1997;388:28-9.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994;370:341-7.

7- ARTIGO 1

The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease

7.1- Versão em português do artigo 1

RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL EM LESÕES ULCERATIVAS DA DOENÇA DE BURULI

A.E. Kiszewski,^{*†} E. Becerril,^{*} L.D. Aguilar,^{*} I.T.A. Kader,[†] W. Meyers,[‡], F. Portaels,[§]
R. Hernández Pando^{*}

^{*}Setor de Patologia Experimental, Departamento de Patologia, Instituto Nacional de Ciências Médicas e Nutrição “Salvador Zubirán”, Mexico

[‡]Setor de Micobacteriologia, Patologia do Instituto das Forças Armadas, Washington, USA.

[§]Instituto de Medicina Tropical, Antuérpia, Bélgica.

[†]Centro de Pós-graduação e Pesquisa “Prof. Heitor Cirne Lima”, Setor de Patologia, FFFCMPA, Porto Alegre, Brazil.

Correspondência:

Dr. Rogelio Hernandez Pando,

^{*}Setor de Patologia Experimental, Departamento de Patologia,
Instituto Nacional de Ciências Médicas e Nutrição “Salvador Zubirán”,

Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México City, CP-14000, México

E-mail: rhpando@quetzal.innsz.mx

RESUMO

A doença de Buruli (DB) é uma doença necrótica progressiva e ulcerativa da pele e tecido celular subcutâneo, causada pelo *Mycobacterium ulcerans*. A DB é considerada a terceira doença micobacteriana mais freqüente após a tuberculose e hanseníase. Três estágios clínicos das lesões cutâneas têm sido descritos em DB: pré ulcerativo, ulcerativo e lesões cicatriciais. Neste estudo nós utilizamos imunohistoquímica e morfometria automatizada para determinar a porcentagem de macrófagos e de linfócitos CD4/CD8 e sua expressão de interferon γ (IFN γ), interleucina 10 (IL10), fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator de crescimento transformante β (TGF β). A expressão destas citocinas foi correlacionada com a resposta inflamatória avaliada pela histopatologia. Todos os casos ulcerativos de DB mostraram extensa necrose e inflamação crônica. A característica mais importante foi a presença ou ausência de granulomas coexistindo com um balanço misto de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Na presença de granulomas encontramos um aumento significativo na expressão de IFN γ , enquanto que em lesões ulcerativas sem granulomas houve um aumento na expressão de IL10 e uma quantidade significativamente maior de bacilos. Estas características se correlacionaram com a cronicidade das lesões, pois lesões com longa evolução apresentaram granulomas. Além disso, lesões de úlceras relativamente recentes apresentaram ausência de granulomas, pouca expressão de IFN γ e maior quantidade de bacilos, sugerindo que neste estágio da doença, uma supressão forte da imunidade celular protetora facilitaria a proliferação dos bacilos.

Palavras-Chave: Doença de Buruli, citocinas, imunopatologia, *Mycobacterium ulcerans*

INTRODUÇÃO

Mycobacterium ulcerans é a causa da doença de Buruli (DB), uma doença ulcerativa necrótica progressiva da pele e tecido celular subcutâneo, considerada a terceira doença micobacteriana mais comum depois da tuberculose e hanseníase (1). O *M. ulcerans* tem sido identificado em águas paradas ou com baixo movimento de águas, tais como lagos ou pântanos, em muitas partes do mundo de clima tropical e temperado, particularmente países da África ocidental e Austrália (2). A infecção é adquirida quando água contaminada penetra através de lesões cutâneas (3) ou poderia talvez ser introduzida por picadas de insetos aquáticos (*Naucoridae*). O *M. ulcerans* pode invadir as glândulas salivares dessas espécies (4,5). A DB é uma doença primária da pele que frequentemente inicia como uma placa ou nódulo subcutâneo nas extremidades superiores ou inferiores, que aumenta com o passar do tempo. Finalmente a pele que cobre o nódulo ou a placa é perdida e o tecido subcutâneo torna-se necrótico, formando úlceras profundas (2). O paciente com frequência não apresenta sintomas sistêmicos ou dor na úlcera. Pode ocorrer cicatrização espontânea, com frequência produzindo uma cicatriz deprimida que se contrai podendo causar uma deformidade grave (2). Os métodos de diagnóstico laboratorial incluem cultura, reação em cadeia da polimerase (PCR) e exame histológico com coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (6).

O fator de maior virulência no *M. ulcerans* é uma toxina necrotizante chamada micolactona, um macrolídeo composto de uma cadeia lateral de policetídeo fixada a um núcleo de 12 carbonos, codificado por genes dispostos em um grande plasmídeo (7). Esta toxina tem atividades citotóxicas, analgésicas e imunossupressoras (8-9).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que as atividades imunossupressoras da micolactona incluem inibição da produção de citocinas Th1 (interleucina 2, INF γ) e

supressão da produção de $TNF\alpha$ pelos monócitos (10). Estes efeitos da micolactona sobre o sistema imunológico são importantes porque a infecção micobacteriana é controlada principalmente por citocinas Th1 e $TNF\alpha$, enquanto que citocinas Th2 (IL4,IL13) e citocinas anti-inflamatórias como IL10 e $TGF\beta$ têm um efeito deletério no controle da proliferação bacteriana (11-14). Estudos recentes ex-vivo usando RT-PCR em biópsias de pele e de células de sangue periférico de pacientes com DB ulcerativa demonstraram uma expressão mais baixa de $IFN\gamma$ e IL10 que indivíduos controles vacinados com o bacilo Calmette-Guérin ou pacientes com DB com lesões pré-ulcerativas nodulares (15). Entretanto, até onde sabemos, não há estudos publicados sobre a imunopatologia local, *in vivo* em pacientes com DB. Assim, o objetivo principal deste estudo foi definir a expressão local de citocinas pró-inflamatórias ($IFN\gamma$ e $TNF\alpha$) e anti-inflamatórias (IL10, $TGF\beta$), assim como a porcentagem de macrófagos e linfócitos CD4 e CD8, em biópsias de pele de pacientes com DB na fase ulcerativa. Nós utilizamos imunohistoquímica com morfometria automatizada para correlacionar a expressão destas citocinas com a resposta inflamatória avaliada pela histopatologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material histológico

Foram estudados fragmentos de pele e tecido celular subcutâneo de 11 pacientes na etapa ulcerativa da DB, fixados em formaldeído e incluídos em parafina, provenientes do Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas, em Washington, DC, USA. Todos os fragmentos de tecido eram originários de Benin, África, e foram obtidos como parte do tratamento (debridamento cirúrgico). Todos os casos foram confirmados por no mínimo dois dos testes positivos: detecção dos BAAR por coloração de ZN, cultura *in vitro*, PCR para IS-2004 e histopatologia (6). Os cortes

de tecido foram separados dos bordos das úlceras, evitando amostras de diferentes partes da mesma lesão.

Imunohistoquímica e morfometria automatizada

Cortes de 5 μ m foram corados com hematoxilina e eosina e ZN para a detecção de BAAR. Para imunohistoquímica, cortes de 5 μ m foram fixados em lâminas tratadas com poly-L-lisina. Depois de desparafinados, os cortes foram imersos em solução para recuperação antigênica (Dako, Denmark) durante 40 min à temperatura de 98°C. A peroxidase endógena foi bloqueada utilizando 3% de H₂O₂ diluído em metanol absoluto, seguido pela imersão em uma solução de bloqueador universal (Powerblock, Biogenex, CA, USA) durante 10 min. Os cortes foram incubados toda a noite em temperatura ambiente. Anticorpos monoclonais contra IFN γ , TNF α e IL10 (Santa Cruz Lab., CA, USA) foram diluídos em 1:30, 1:200 e 1:100, respectivamente. Anticorpos policlonais de coelho contra TGF β (Santa Cruz Lab.) foram diluídos 1:50 em PBS, enquanto que anticorpos policlonais de coelho anti-CD4, CD8 e CD68 (um marcador para macrófago) foram diluídos 1:100 (Dako,USA). Os anticorpos ligados foram detectados com IgG de coelho anti-rato ou IgG de cabra anti-coelho marcados com peroxidase diluída 1:150 em PBS e diaminobenzidina. As lâminas foram a seguir coradas com hematoxilina para contraste (14). A porcentagem de células imunocoradas para cada citocina foi determinada pelo analisador de imagens automatizado (Q-Win Leica), após a contagem das células positivas e negativas em cinco campos aleatórios sobre o infiltrado inflamatório localizado na derme ou tecido celular subcutâneo, num aumento de 200X (14). O mesmo procedimento, porém com um aumento de 1000X (área total de 2763 μ ²), foi realizado para determinar a número de BAAR, comparando o número de bactérias dentro e fora das células inflamatórias.

Todos os casos estudados mostraram extensa necrose e inflamação crônica. A maior diferença foi a presença ou ausência de granulomas. Então, nós dividimos as lesões em dois grupos: puramente ulcerativas, sem granulomas e ulcerativas com granulomas. Nós comparamos a porcentagem de células imunocoradas e número de bacilos nos dois grupos. A comparação da expressão das citocinas foi realizada utilizando o teste t para amostras independentes, já que todas variáveis estudadas apresentaram distribuição normal. Consideramos uma significância de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Características clínicas e histopatológicas

A tabela 1 mostra o perfil clínico e patológico dos pacientes com DB estudados. Onze casos foram analisados, 5 pacientes do sexo masculino e 6 do feminino. Todos os pacientes tinham úlceras cutâneas profundas localizadas em membros superiores ou inferiores. Seis pacientes tinham também osteomielite. O diagnóstico clínico de osteomielite foi confirmado por pelo menos dois resultados positivos a partir de coleta direta de secreção para pesquisa de BAAR, cultura, PCR para IS2424 e histopatologia (6).

Em todos os casos estudados, a análise histopatológica mostrou necrose por coagulação extensa da pele e tecido subcutâneo com quantidade variável de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos, vistos ao redor e dentro das áreas necróticas (fig.1). Em cinco casos observamos no tecido celular subcutâneo granulomas bem formados, constituídos por linfócitos, macrófagos e células gigantes. Os outros seis casos não continham granulomas, mas havia extensa área de necrose por coagulação, com numerosos macrófagos, alguns dos quais com citoplasmas vacuolados (fig. 1) Foi interessante encontrar um número significativamente maior de BAAR extracelular e

alguns intracelulares nos casos ulcerativos não granulomatosos (Fig.1b). Em contraste, poucos BAAR foram vistos em lesões granulomatosas, as quais também mostraram hiperplasia epidérmica com formação de tecido de granulação focal nos bordos da úlcera. Estas características histopatológicas foram correlacionadas com o atraso na procura da assistência médica e maior duração do período de hospitalização (Tabela 1). Pacientes com granulomas tiveram uma média de 150 dias de atraso e 180 dias de hospitalização, enquanto que pacientes com úlceras sem granulomas tiveram um atraso de 45 e 36 dias de atraso e hospitalização, respectivamente ($P < 0.003$). Assim, os granulomas estavam presentes em lesões de muito longa evolução.

Análise imunohistoquímica da expressão local de citocinas e de linfócitos CD4 CD8 em úlceras na DB

A percentagem de células imunocoradas para CD4 foi de $5.0\% \pm 5$ em casos granulomatosos e $3.4\% \pm 1.7$ em casos não granulomatosos ($P=0.5$) (fig 2). A percentagem de células CD8 imunocoradas foi de $17.2\% \pm 2.7$ em casos granulomatosos e $10.1\% \pm 6.7$ em casos não granulomatosos ($P=0.038$). Portanto, uma percentagem significativamente maior de linfócitos CD8 foi observada em lesões ulcerativas de DB (Fig. 1 e 2). Uma elevada percentagem de macrófagos foi observada nos dois grupos de DB (45 a 47%). Lesões não granulomatosas mostraram macrófagos com citoplasma vacuolado e alguns bacilos intracelulares (Fig. 1).

A percentagem de células imunocoradas, usando anticorpos específicos para detectar $IFN\gamma$, IL10, $TNF\alpha$ e $TGF\beta$, foi comparada em lesões de DB com e sem granulomas (Fig. 1 e Fig 3). Os casos de DB com granulomas mostraram numerosas células inflamatórias $IFN\gamma$ positivas, infiltrando a derme ($43.5\% \pm 22$). Muitas das células positivas eram linfócitos, mas macrófagos e algumas células gigantes

localizadas nos granulomas e / ou infiltrado inflamatório, também foram positivas. Em contraste, os casos não granulomatosos mostraram uma porcentagem significativamente menor de células imunocoradas para o IFN γ ($12.8\% \pm 12$; $P < 0.017$). A análise da IL10 e TGF β mostraram uma porcentagem maior de células imunocoradas nos casos não granulomatosos (32.5 ± 17 e 40.1 ± 6 , respectivamente) que nos casos granulomatosos (23.2 ± 14 e 38.2 ± 7 , respectivamente). As células positivas foram macrófagos e linfócitos infiltrando a derme e tecido celular subcutâneo. A porcentagem de células imunocoradas para TNF α foi muito similar nos dois grupos estudados. Assim, em termos de expressão de citocinas, nós encontramos diferenças significativas entre úlceras granulomatosas e não granulomatosas na DB. Embora ambos os tipos de lesões mostrem um modelo misto de citocinas, lesões granulomatosas possuem uma porcentagem significativamente mais alta de IFN γ (3 vezes), quando comparadas com as lesões não granulomatosas (Fig. 3). Em contraste, úlceras da DB sem granulomas revelam uma tendência para citocinas anti-inflamatórias, mostrando 30% mais células imunocoradas para IL10, com porcentagens similares para células imunocoradas para TGF β e TNF α . Estes modelos de expressão de citocinas se correlacionaram com o número de bacilos encontrados por área de superfície utilizando morfometria automatizada. Este método mostrou um número significativamente maior de bacilos em lesões ulcerativas, sem granulomas (fig. 1 e 2). Este estudo também demonstra uma concentração significativamente superior de bacilos no meio extracelular quando comparado com o intracelular. Alguns macrófagos vacuolados eram as células infectadas (Fig.3).

DISCUSSÃO

A DB é uma infecção primária da pele e tecido celular subcutâneo. Três estágios clínicos das lesões cutâneas têm sido descritos: pré-ulcerativo (nódulo, placa ou edema), ulcerativo e cicatricial (2). As características clínicas destas lesões não são específicas, particularmente durante o estágio pré-ulcerativo. Devido à apresentação clínica não específica e porque os pacientes, em geral, procuram atendimento médico após as lesões ulcerarem, é difícil obter biópsias representativas de lesões pré-ulcerativas e/ou lesões cicatrizadas (16). Por isso, no presente estudo, estudamos somente lesões ulcerativas. Esta é a forma da doença mais frequentemente sujeita a estudo histopatológico (16) e todos os nossos casos mostraram BAAR, confirmando o diagnóstico.

As características histopatológicas foram similares a aquelas descritas previamente (16,17). Nos bordos da lesão encontramos hiperplasia epidérmica, assim como extensa necrose por coagulação, afetando tecido celular subcutâneo, com quantidade variável de células inflamatórias com e sem granulomas. Nós verificamos que a característica mais distintiva foi a presença de granulomas, o que permitiu classificar os casos em dois grupos: úlceras com granulomas e exclusivamente úlceras. Curiosamente, nós encontramos diferenças na resposta imune local em ambos os tipos de lesões ulcerativas.

Os dois grupos de lesões ulcerativas foram associadas com uma expressão similar de TNF α , mas a presença de granulomas foi associada com uma expressão significativamente maior de IFN γ . Lesões ulcerativas sem granulomas foram associadas com uma expressão mais elevada de IL10 e TGF β , embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Então, parece que a presença de granuloma indica uma

melhor proteção imunológica, já que foi associada a maior quantidade de $IFN\gamma$ e menor carga bacilar.

O perfil de citocinas que nós detectamos em úlceras ativas da DB foi similar ao encontrado na tuberculose progressiva ativa, na qual pode ocorrer alguma depressão da função das células Th1, acompanhada por um aumento da atividade Th2, juntamente com uma produção mais elevada de IL10 e $TGF\beta$ (12,13,18). Uma resposta imunológica similar tem sido descrita em hanseníase polar, na qual um predomínio de citocinas Th1 se associa a uma resposta imunológica resistente predominante na hanseníase tuberculóide, enquanto que citocinas Th2 e $TGF\beta$ são predominantes em pacientes com hanseníase lepromatosa, com resposta imune celular ineficiente (14,19). De forma similar, estudos *in vitro* têm demonstrado que sujeitos com infecção por *M. ulcerans* quando comparado com controles expostos têm uma produção significativamente mais baixa de $IFN\gamma$ e IL12, com uma produção mais elevada de IL4, IL5, IL6 e IL10 em resposta a *M. ulcerans* e BCG (20). De maneira similar, análise da expressão de genes de citocinas por RT-PCR em biópsias de pele de pacientes com DB ulcerativa, ou análise de perfil de citocinas produzidas em células de sangue periférico estimuladas por antígenos imunodominantes micobacterianos específicos, revelam baixa produção de $IFN\gamma$ e elevada produção de IL10 quando comparados com controles vacinados com BCG ou pacientes com DB em estágio nodular pré-ulcerativo (15). Além disso, linfócitos periféricos de pacientes antes da infecção responderam a estimulação *in vitro* com *M. ulcerans* por produção de citocinas Th1, mas após a úlcera ser instalada a resposta foi mudada em direção a um predomínio de citocinas Th2 (21). Os nossos resultados confirmam e estendem estas observações *in vitro*, mostrando que no local das lesões ulcerativas há um modelo misto de citocinas pró-inflamatórias/anti-inflamatórias. Lesões ulceradas recentes têm um predomínio do perfil de citocinas

imunossupressivas, acompanhadas de elevada carga bacilar, enquanto que úlceras antigas mostram uma mistura de citocinas com predomínio de IFN γ , acompanhadas por baixa carga bacilar e granulomas característicos. Então, parece que a formação de granulomas representa um evento tardio do estágio ulcerativo, provavelmente próximo ao estágio de cicatrização espontânea. Além disso, os granulomas nestas úlceras antigas coexistem com hiperplasia pseudo-epiteliomatosa e tecido de granulação, os quais são freqüentemente associados com inflamação crônica (16).

O maior fator de virulência da *M. ulcerans* é a toxina micolactona. Há uma heterogeneidade considerável nos congêneres produzidos por cepas de *M. ulcerans* provenientes de diferentes áreas geográficas, as quais diferem, em potência, embora a atividade biológica seja conservada (22). Todos os nossos casos foram provenientes da África ocidental, onde as cepas de *M. ulcerans* compartilham padrões de micolactona idênticos, produzem uma quantidade maior de toxina e causam a forma mais severa da doença (22). Por isso, nós assumimos que a virulência das cepas envolvidas nos pacientes estudados foi similar.

Em ambos os tipos de lesões ulcerativas nós encontramos massas de bactérias extracelulares imersas em tecido necrótico. Em lesões ulcerativas não granulomatosas foi comum que bactérias estivessem revestindo as células, mas em algumas áreas periféricas distantes às áreas de necrose, nós encontramos poucos bacilos dispersos; nestas áreas, alguns macrófagos mostraram BAAR intracelulares bem definidos, sugerindo a fagocitose de micobactérias. Esta observação está de acordo com estudos recentes in vitro, que demonstraram que os macrófagos eventualmente podem ser infectados pelo *M. ulcerans* (23) e com o conceito de que o *M. ulcerans* tem uma fase intracelular que é necessária para a indução da resposta imunológica Th1 (24,25). Tem sido demonstrado recentemente que a micolactona é anti-fagocítica, mas macrófagos

podem fagocitar o *M. ulcerans* nos estágios iniciais da infecção experimental e transportar o bacilo para nódulos linfáticos regionais (26). *M. ulcerans* mutantes incapazes de produzir micolactona são fagocitados facilmente pelos macrófagos e induzem a formação de granulomas bem formados em modelos animais experimentais (23,25,26). Por isso, os poucos bacilos que nós detectamos no citoplasma de macrófagos poderiam corresponder a bacilos mortos ou a bactérias que perderam a produção da toxina, facilitando sua fagocitose.

Concluindo, nós caracterizamos a imunopatologia local de lesões ulcerativas da DB em 11 casos da África Ocidental. As características histopatológicas mais consistentes foram necrose subcutânea extensa e inflamação crônica, acompanhadas por um balanço misto de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As lesões mais antigas mostram granulomas bem formados, com predomínio da expressão de IFN- γ , enquanto que lesões ulcerativas recentes mostraram uma produção mais acentuada da citocina imunossupressora IL10, com contagem bacilar maior, e lesões exclusivamente ulcerativas sem granulomas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado parcialmente pelo CONACyT, México; Fundação Damien, Bélgica; CAPES, Brasil e Registro Americano de Patologia, USA. A.E. Kiszewski realizou seu doutorado como bolsista da CAPES. Os autores agradecem ao Professor G. A.W. Rook pela leitura do manuscrito e importantes sugestões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Asiedu K, Sherpbier R, Raviglione MC. Buruli ulcer *Mycobacterium ulcerans* infection. WHO. Global Buruli Ulcer Initiative. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000.
- 2- van der Werf TS, van der Graff WTA, Tappero JW, Asiedu K. *Mycobacterium ulcerans* infection. The Lancet 1999; 354: 1013-18
- 3- Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK. Human *Mycobacterium ulcerans* infections developing at sites of trauma to skin. Am J Trop Med Hyg 1974; 23: 919-23.
- 4- Marsollier I, Robert R, Aubry J *et al.* Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 4623-28.
- 5- Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E *et al.* Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmocytes and a macrolide toxin, mycolactone. Cell Microbiol 2005;7:935-43.
- 6- Portaels F, Johnson P, Meyers WM. Buruli ulcer: diagnosis of *Mycobacterium ulcerans*. In: Portaels F, Johnson P, Meyers WM, eds. Buruli ulcer: a manual for health care providers. WHO/CDS/GBUI, 2001:4-92.
- 7- Stinear T, Mve-Oblang A, Small PLC *et al.* Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. Proc Natl Acad Sci 2004; 101: 1345-9.
- 8- George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, Small PL. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. Science 1999; 283: 854-7.

- 9- George KM, Pascopella L, Welty M, Small PL. A *Mycobacterium ulcerans* toxin mycolactone causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000; 68: 877-83.
- 10- Pahlevan A, Wright DJ, Andrews C, George KM, Small PL, Foxwell BM. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J Immunol* 1999; 163: 3928-35.
- 11- Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development tuberculosis (Edinb) 2004;84:93-101.
- 12- Lienhardt, C., Azzurri, A., Amedei, A. *et al.* Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 2002. 32: 1605-13.
- 13- Tossi Z, Ellner J. The role of TGF β in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:107-14.
- 14- Kiszewski AEC, Aguilar LD, Becerril E, Baquera J, Hernández Pando R. Expresión of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003; 128:279-85.
- 15- Prévot G, Bourreau E, Pascalis h, Pradinaud R, Tanghe Am Huygen K, Launois P. Differential production of systemic and intralesional gamma and intralesional gamma interferon and interleukin 10 in nodular and ulcerative forms of Buruli disease. *Infect Immun* 2004;72:958-65.
- 16- Guarner J, Bartlett J, Spotts Whitney E *et al.* Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:651-6.
- 17- Hayman J. Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Clin Pathol* 1993; 46:5-9.

- 18- van Crevel, R., Karyadi, E., Preyers, F *et al.* Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 2000; 181:1194-7.
- 19- Yamamura M, Uyemura K, Deans R *et al.* Defining protective response to pathogens cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;254:277.
- 20- Gooding TM, Johnson P, Campbell D *et al.* Immune response to infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 2001; 69:1704-7.
- 21- Gooding T, Kemp A, Robins Browne M, Johnson P. Acquired T-helper 1 lymphocyte anergy following infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1076-7.
- 22- Mve-Obiang A, Lee R, Portaels F, Small PLC. Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications of virulence. *Infect Immun* 2003; 71:774-83.
- 23- Adusumillis S, Mve-Obiang A, Sparer T, Meyers W, Hayman J, Small PL. *Mycobacterium ulcerans* toxin macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of *M.ulcerans* in vitro and in vivo. *Cell Microbiol* 2005; 7:1295-304.
- 24- Stienstra Y, van der Graff W, Meerman G, de Leij J. Susceptibility to development of *Mycobacterium ulcerans* disease, review of possible risk factors. *Trop Med Int Health* 2002; 7:554-2.
- 25- Oliveira MS, Fraga AG, Torado *et al.* Infection by *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. *Infect Immun* 2005;73:6299-310.
- 26- Coutanceau E, Marsollier L, Brosch R *et al.* Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of *Mycobacterium ulcerans* the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cell Microbiol* 2005;7:1187-96.

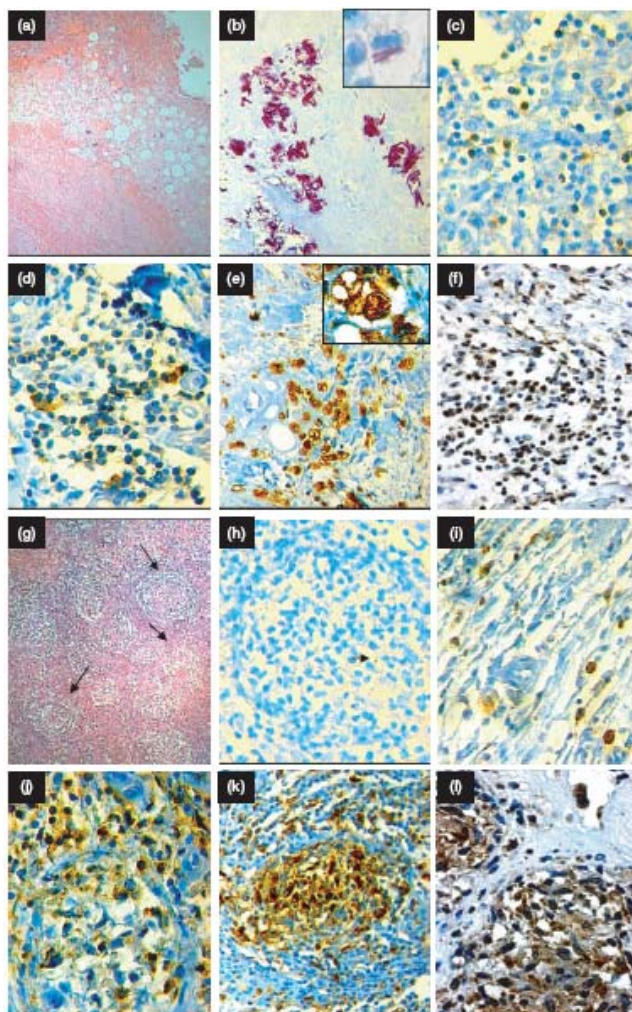


Fig 1. Características da histopatologia e imunohistoquímica das úlceras na doença de Buruli. a) fotomicrografia em pequeno aumento (40X) de uma lesão representativa de Doença de Buruli (DB) ulcerativa. Extensa necrose por coagulação no tecido subcutâneo envolvendo tecido adiposo e muscular. B) Esta lesão tem numerosos BAAR extracelular e ocasionalmente intracelular pela coloração de Ziehl-Neelsen (400X). Na seta, bacilos intracelulares são mostrados em macrófagos vacuolados (1000X). c) Este tipo de lesão tem relativamente poucos linfócitos T CD4 (200X) d) mais linfócitos T CD8 estão presentes nesta lesão ulcerativa sem granulomas (200X) e) numerosos macrófagos CD68 positivos estão presentes nesta lesão (100X). Na seta, forte positividade em um macrófago vacuolado (1000X). f) algumas células positivas para IFN γ são visualizadas nas lesões ulcerativas de DB sem granulomas (X100). g) Fotografia em pequeno aumento (40X) de um caso de DB com úlcera e granulomas bem formados (seta). h) Esta lesão granulomatosa mostra escassos BAAR (seta) (200X). i) Da mesma forma, as lesões granulomatosas mostram poucas células CD4, com numerosas células CD8 (j) e numerosos macrófagos (k). l) Estes granulomas mostram distribuição difusa de células imunocoradas para IFN γ quando comparadas com lesões puramente ulcerativas (compare com (f)) (400X).

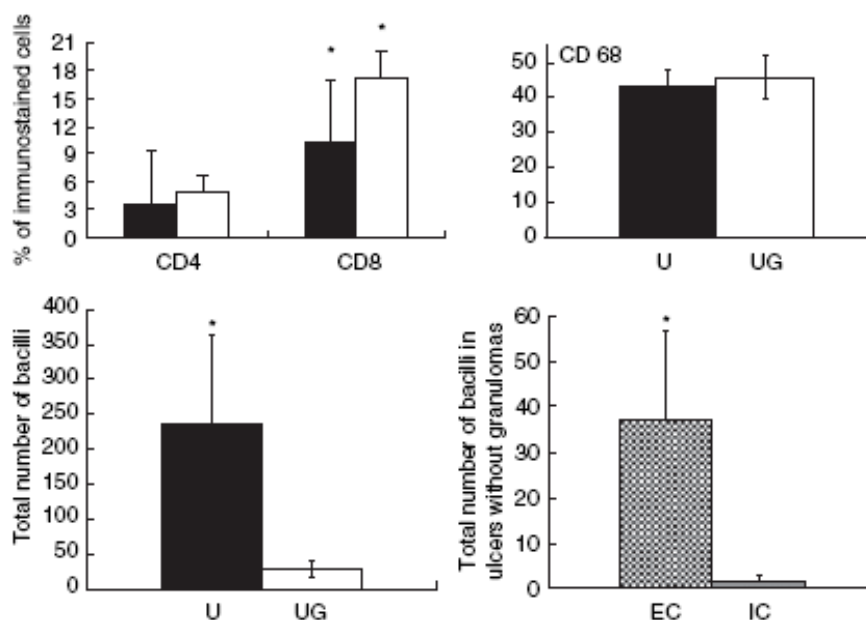


Fig 2. Painel superior, direita e esquerda mostram as porcentagens de células CD4, CD8 e macrófagos (CD68) determinadas por imunohistoquímica e morfometria automatizada no infiltrado inflamatório subcutâneo de lesões ulcerativas não granulomatosas (barras escuras) ou úlceras com granulomas (barras claras). Cinco campos escolhidos aleatoriamente em aumento de 200 vezes foram estudados em cada um dos 11 casos de DB.

O painel inferior esquerdo mostra o número de BAAR em lesões ulcerativas não granulomatosas (U, barras escuras) ou úlceras com granulomas (UG, barras claras), enquanto o painel inferior direito apresenta o número de bacilos extracelulares (EC) e intracelulares (IC) em macrófagos de úlceras sem lesões granulomatosas. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. O asterisco significa significância estatística.

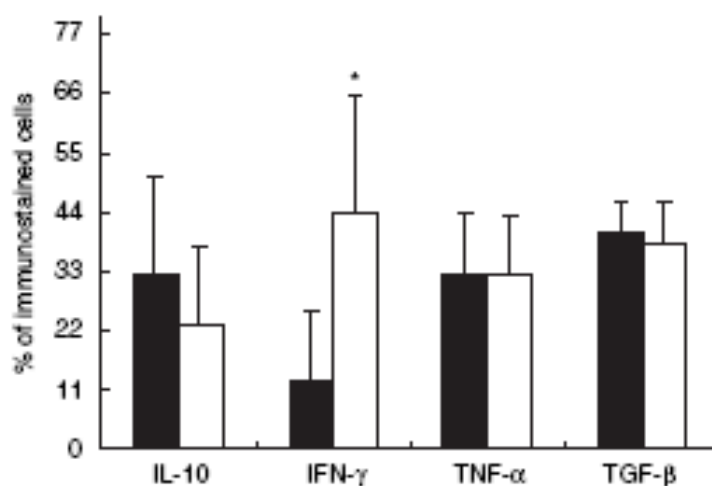


Fig 3. Porcentagem de células imunocoradas para interleucina (IL)-10, interferon (IF) – γ , fator de necrose tumoral (TNF) – α e Fator de crescimento transformante (TGF) – β no infiltrado inflamatório localizado no tecido subcutâneo de lesões ulcerativas não granulomatosas (barras escuras) ou úlceras com granulomas (barras claras). Foram estudados cinco campos escolhidos aleatoriamente com aumento de 200 XX através de uma análise automatizada de imagens em cada um dos 11 casos de doença de Buruli. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. O asterisco representa significância estatística.

Tabela 1. Características clínicas e histopatológicas dos casos estudados

caso	sexo	Idade (anos)	Atraso (dias)	Hospitalização (dias)	Características clínicas e patológicas
1	feminino	9	45	52	Úlcera de pele em região inguinal, edema grave, sem granulomas
2	masculino	10	30	11	Nódulos ulcerados em coxa direita, sem formação de granulomas
3	feminino	16	90	84	Forma ulcerada severa na mão direita, osteomielite, gravidez, sem granulomas
4	masculino	30	30	9	Nódulo ulcerado inicial na coxa direita, sem granulomas
5	feminino	4	45	37	Placa ulcerada na perna esquerda, osteomielite, sem granulomas
6	feminino	7	36	35	Úlcera e nódulos na perna esquerda, sem granulomas
7	masculino	20	180	14	Úlcera na perna direita, osteomielite, com granulomas
8	masculino	5	120	234	Úlcera na perna esquerda, osteomielite, com granulomas
9	masculino	5	120	234	Doença disseminada, osteomielite, com granulomas
10	feminino	10	150	180	Úlcera no braço esquerdo, osteomielite, com granulomas
11	feminino	23	180	60	Úlcera na perna esquerda, infecção secundária, com granulomas

8- ARTIGO 2**Cyclooxygenase Type 2 Expression in the Ulcerative Stage of Buruli Disease**

A.E. Kiszewski,^{*†} E. Becerril,^{*} I.T.A. Kader,[†] C.G. Kurmann[†] W. Meyers,[‡], F. Portaels,[§] R. Hernández Pando^{*}

^{*}Experimental Pathology Section. Department of Pathology. National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubirán”. Mexico

[‡]Mycobacterology Section. Armed Forces Institute of Pathology. Washington. USA.

[§]Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

[†]Pathology Section. Postgraduate and Research Center “Prof. Heitor Cirne Lima”. FFFCMPA. Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Dra. Ana Elisa Kiszewski
Rua Barão do Amazonas, 412/704
90670-000 Porto Alegre, RS
Brazil
e-mail: kiszewski@yahoo.com.br

Summary

Background Buruli disease (BD) is a skin chronic ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans*. The ulcers can be divided based on the histopathology in early, with necrosis and acute inflammation, and late, with granulation tissue, fibrosis and granulomas. Evidences pointed that most patients with early ulcer cannot mount a sufficient protective Th1 cell response to *M. ulcerans*, but Th1 response restores over time. High cyclooxygenase 2 (COX2) expression is associated with local immunosuppression. We hypothesize that COX2 expression influence prostaglandin levels contributing to the local immunosuppression found in early BD ulcers.

Objectives The aim of this study is to evaluate the expression of COX2 in ulcers with and without granulomas.

Methods The expression of COX2 was analyzed by immunohistochemistry in four cases of ulcers with granulomas and four cases without granulomas.

Results In ulcers with granulomas, there was an average of 41.3 ± 6.2 % positive cells. The four cases without granulomas presented 41.1 ± 5.9 % positive cells in the infiltrate ($p= 0.97$).

Conclusion Our results suggest that in BD, COX2 doesn't seem to participate in the activation or suppression of the Th1 response.

Key words: ciclooxigenase, immunohistochemistry, Buruli Ulcer, prostaglandins

BD is an ulcerative disorder primarily affecting the skin and subcutaneous cell tissue, but it may extend to the underlying bones. It begins as a nodule or subcutaneous plaque which grows and ulcerates, and produces a deep necrotic ulcer. It is caused by *Mycobacterium ulcerans*, discovered by MacCallum et al in 1948 (1). BD is the third leading cause of mycobacterial disease in immunocompetent patients, following tuberculosis and leprosy (2, 3, 4). Mortality is low, yet suffering is long and severe sequelae are frequent, particularly amputation of the extremities (4). Populations at risk for BD include children, those living in tropical climates, and those exposed to stagnant or slowly moving water (1,4,5). Cases have been reported in at least 27 countries. The ulcers can be divided in early (histopathology with necrosis and acute inflammation) and late ulcers (histopathology with granulation tissue, fibrosis and granulomas). *M. ulcerans*' greatest virulence factor is a macrolide toxin called mycolactone, which is responsible for tissue destruction (necrosis and ulceration) and local immunosuppression through IL2 and TNF α suppression by monocytes, as well as induction of macrophage apoptosis (6,7,8,9,10). There is controversy in the clinical studies that evaluated INF γ and IL10 levels in patients with BD (11,12). The reason for the lack of consistency in the findings might be due to the absence of histopathological analysis. There is a significant correlation between the presence of granulomas (in late ulcers) and Th1 response with higher interferon- γ expression (13,14,15). On the other hand, while some studies did not find a higher IL10 expression in recent ulcers (12,13,14), Phillips *et al.* (15) obtained a significant association. The orchestration of mycolactone immunosuppressive properties and the cytokines expressed at the different stages of infection in BD are of great interest to researchers. There is strong evidence that high PGE2 concentrations have a significant immunosuppressive effect on the immune system (15,16,17,18). The main source of prostaglandins is activated

macrophages that express cyclooxygenase 2 (COX2), an induced enzyme expressed in swollen tissue (16). PGE2 is involved in the downregulation of Th1 response. According to the literature, PGE2 is released in great quantity by macrophages in patients with a lepromatous form of leprosy (17). In experimental models of murine tuberculosis and leprosy, a progressive increase in the production of PGE2 and COX2 are detected over the course of infection (18). There are no studies that evaluated the COX2 expression in DB. Based on the available information on tuberculosis and leprosy, we expected to find a greater expression of COX2 in cases of recent ulcers. Here we have carried out an immunohistochemical and automated morphometric investigation of the percentage of COX2 stained cells as an indirect indicator of PG production in the skin biopsies of patients with BD at the ulcerative stage.

Materials and methods

Biopsies

We have selected skin and subcutaneous tissue biopsies of 8 patients with a diagnosis of BD included in the archives of the Armed Forces Institute of Pathology in Washington, USA. All biopsies were from Benin, Africa, and were obtained as part of the treatment (surgical debridement) or for diagnostic reasons. The biopsies were fixed in 10% formaldehyde and included in paraffin. In all cases the diagnosis was confirmed by histopathology and at least one of the following tests: detection of the bacillus by Ziehl-Neelsen staining, culture, and IS-2404 PCR. Eight patients with ulcerative lesions were studied. The ulcers were histologically sorted in two categories: ulcerated without granulomas (early ulcers) and ulcers with granulomas (late ulcers). The evolution of the ulcers ranged from 30 to 90 days in the group without granulomas and from 120 to 180 days in those with granulomas. Patient age ranged from 5 to 20 years.

All procedures were developed in accordance with ethical standards of the Ministry of Health of Benin. The samples were collected before 2000, when the only treatment available was surgical debridement. Adults gave oral consent for participating in the study. When patients were minors, oral consent was given by a parent or a guardian.

Immunohistochemistry and automated morphometry

Five μm -thick sections were placed on silanized plates. After deparaffinization, the sections were immersed in an antigenic recovery solution (Dako) for 40 min at 100°C . Afterwards, endogenous peroxidase blockage was carried out with 3% H_2O_2 in absolute methanol followed by the universal blocker (Dako) for 10 min. The cuts were incubated overnight at 10°C with rabbit polyclonal antibody against COX2 (17), diluted at 1:300 in PBS. The reaction was detected with secondary anti-rabbit IgG antibodies diluted 1/50 in PBS and diaminobenzidine. The plates were contrasted with hematoxylin. The percentage of cells stained with COX2 was determined by an automated image analyzer (Q-Win Leica). Positive and negative cells were counted in the inflammatory infiltrate located in the deep dermis and subcutaneous cell tissue. Mann-Whitney U test was used to compare the percentage of positive cells found in the group of ulcers without granulomas and in ulcers with granulomas. The statistical significance used was set at $P < 0.05$.

Results

Most positive cells were macrophages, with occasional positive fibroblasts. In the four histologically selected cases with granulomas, there was an average of $41.3 \pm 6.2 \%$

positive cells in the infiltrate (Figure 1). The four cases without granulomas presented a mean of 41.1 ± 5.9 % positive cells in the infiltrate (Figure 2). There were no statistically significant differences between the groups ($p= 0.97$). In normal skin, no staining for the COX2 antibody was detected.

Discussion

In some mycobacterial diseases, the pro-inflammatory response is a protective inflammatory response, which depends on the participation of Th1 cells and activated macrophages, while an anti-inflammatory response is usually considered a non-protective inflammatory response with participation of Th2 cells and non-activated macrophages. INF γ and IL12 are critical for Th1 differentiation, while IL4 and IL13 are equally important for Th2 differentiation. COX2 is an inducible enzyme expressed in inflamed tissue and high concentrations have significant immunosuppressive effects, producing an anti-inflammatory response (18). Recent studies characterized the *in situ* immune profile of patients with a diagnosis of BD (13,14). INF γ is highly expressed in ulcers with granulomas, a stage that usually precedes spontaneous cicatrization (13,14). The IL10 data is not constant, but it appears that it is more expressed in ulcers with necrosis and acute inflammation (3,11,12). The other cytokines studied such as TNF α and TGF β were elevated in early and late ulcers (12,13,14,19). On the other hand, Phillips *et al.* verified a higher concentration of TNF α and IL12 at a late stage of the disease (20). We know that PGE2, TGF β and IL10 are released by macrophages in cases of advanced mycobacterial disease, which might induce immunosuppression by

inhibiting the proliferation of T cells and the production of IL12 and INF γ , TNF α (17,21). Therefore, we would expect to find a greater expression of COX2 in early ulcers. However, the level of COX2 expression was very similar in the groups studied. A strong expression of TNF α , together with the mycobacterial antigens, may be good inducers of PGE2 production (22) and could explain the strong expression of COX2 in BD. It is possible that prostaglandin concentration in late stage ulcers is not sufficient to inhibit the production of Th1 cytokines and nitric oxide (17,18). For reasons still poorly understood, in late ulcers INF γ production is able to be restored and to induce a significant decrease in the load of bacilli despite a higher expression of IL10, TGF (13) and COX2. In contrast to tuberculosis and leprosy, in BD COX2 does not seem to participate in the activation or suppression of the Th1 response. Further studies must be carried out in order to clarify the immune mechanisms controlling this infection.

Acknowledgments

A.E. Kiszewski received a scholarship from CAPES (Brazil). This work was supported partially by the CONACyT (Mexico) and by the Damien Foundation (Belgium).

References

- 1 MacCallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons HA. A new mycobacterial infection in man. *J Pathol Bacteriol* 1946;60:92-122.
- 2 Weir E. Buruli Ulcer: The Third most common mycobacterial infection. *CMAJ* 2002;166:1691.
- 3 World Health Organization. Buruli ulcer. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75(13):106-8
- 4 Van der Werf TS, van der Graaf WTA, Tappero JW, Asiedu K. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 1999;354:1013-8.
- 5 World Health Organization. Buruli ulcer disease. *Wkly Epidemiol Rec* 2002;32:271-275.
- 6 Stinear T, Mve-Oblang A, Small PLC, Frigui W, Pryor M *et al.* Giant plasmid-encoded polypeptide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:1345-1349.
- 7 George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, Small PLC. Mycolactone: A Polyketide Toxin from *Mycobacterium ulcerans* Required for Virulence. *Science* 1999; 283:854-857.
- 8 van der Werf TS, Stinear T, Stienstra Y, van der Graaf W TA *et al.* Mycolactones and *Mycobacterium ulcerans* disease. *The Lancet* 2003;362:1062-1064.
- 9 George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PLC. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in Guinea Pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000;68:877-883.
- 10 Pahlevan AA, Wright DJM, Andrews C, George KM, Small PLC, Foxwell BM. The Inhibitory Action of *Mycobacterium ulcerans* Soluble Factor on Monocyte/T Cell Cytokine Production and NF- κ B Function. *J Immunol*, 1999;163:3928-3935.

- 11 Prévot G, Bourreau E, Pascalis H, Pradinaud R *et al.* Differential production of systemic and intralésional gamma interferon and interleukin 10 in nodular and ulcerative forms of buruli disease. *Infect Immun* 2004;72:958-965.
- 12 Westenbrink BD, Stienstra Y, Huitema MG, Thompson WA, Klutse EO, Ampadu EO *et al.* Cytokine Responses to Stimulation of Whole Blood from Patients with Buruli Ulcer Disease in Ghana. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2005,12:125-129.
- 13 Kiszewski AE, Becerril E, Kader ITA, Aguilar LD, Myers W, Portaels F, Hernández Pando R. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clinical and Experimental Immunology* 2006, 143:445-451.
- 14 Schipper HS, Rutgers B, Huitema MG, Etuaful SN, Westenbrink BD, Limburg PC, Timens W, van der Werf TS. Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol.* 2007 Sep 27; [Epub ahead of print].
- 15 Phillips R, Horsfield C, Mangan J, Laing K, Etuaful S, Awuah P, Nyarko K, Osei-Sarpong F, Butcher P, Lucas S, Wansbrough-Jones M. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. *Infect Immun.* 2006,74:2917-24.
- 16 Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11693-7.
- 17 Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández-Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *British Journal of Dermatology* 2003;148:795-798.

- 18 Rangel-Moreno J, Estrada-García I, Garcia- Hernández Maria de la Luz, Aguilar-Leon D, Márquez R, Hernández-Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002, 106:257-266.
- 19 Gooding TM, Johnson PDR, Campbell DE, Hayman JÁ, Hartland EL, Kemp AS, Robins-Browne RM. Immune Response Infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect and Immun* 2001; 69:1704-1707.
- 20 Phillips R, Horsfield C, Kuijper S, Sarfo SF, Obeng-Baah J, Etuaful S, Nyamekye B, Awuah P, Nyarko KM, Osei-Sarpong F, Lucas S, Kolk AH, Wansbrough-Jones M. Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with *Mycobacterium ulcerans* disease compared to that from patients with tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:253-7.
- 21 Misra N, Selvakumar M, Singh S *et al.* Monocyte derived IL10 and PGE2 are associated with the absence of Th1 cells and *in vitro* T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* 1995;48:123-8.
- 22 Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol.* 1998;160:1402-10.

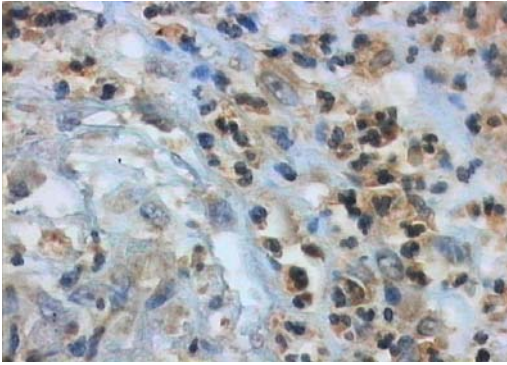


Figure 1. COX2 expression in BD in the stage of organization with granulomas.

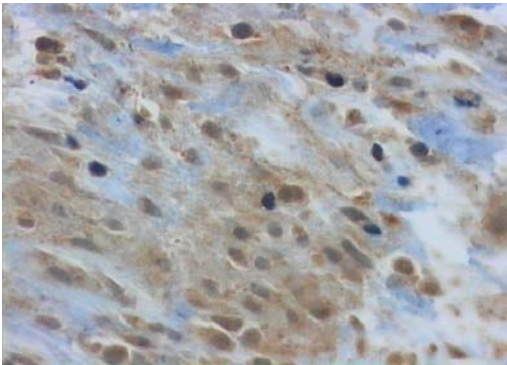


Figure 2. COX2 expression in BD in the necrotic stage without granulomas

8.1- Versão em português do artigo 2

Expressão de ciclooxigenase tipo 2 na etapa ulcerativa da doença de Buruli.

A.E. Kiszewski,^{**†} E. Becerril,^{*} I.T.A. Kader,[†] C.G. Kurmann[†] W. Meyers,[‡], F. Portaels,[§] R. Hernández Pando^{*}

^{*}Setor de Patologia Experimental, Departamento de Patologia, Instituto Nacional de Ciências Médicas e Nutrição “Salvador Zubirán”, Mexico

[‡]Setor de Micobacteriologia, Patologia do Instituto das Forças Armadas, Washington, USA.

[§]Instituto de Medicina Tropical, Antuérpia, Bélgica.

[†]Centro de Pós-graduação e Pesquisa “Prof. Heitor Cirne Lima”, Setor de Patologia, FFFCMPA, Porto Alegre, Brazil.

Autora correspondente:

Dra. Ana Elisa Kiszewski
Rua Barão do Amazonas, 412/704
90670-000 Porto Alegre, RS
Brasil
e-mail: kiszewski@yahoo.com.br

Resumo

Introdução A doença de Buruli (DB) é uma úlcera crônica de pele causada pela *Mycobacterium ulcerans*. As úlceras podem ser divididas com base na histopatologia em precoces, com necrose e inflamação aguda, e tardias, com tecido de granulação, fibrose e granulomas. Evidências indicam que a maioria dos pacientes com úlceras precoces não consegue desenvolver uma resposta celular Th1 suficiente contra a *M. ulcerans*, mas com o tempo a resposta Th1 melhora. Uma elevada expressão de ciclooxygenase 2 (COX2) está associada à imunossupressão local. A nossa hipótese é que a expressão de COX2 influencia os níveis de prostaglandinas contribuindo para a imunossupressão local encontrada nas úlceras da DB.

Objetivo O objetivo desse estudo é avaliar a expressão de COX2 em úlceras com e sem granulomas.

Métodos A expressão de COX2 foi analisada por imunohistoquímica em quatro casos de úlceras com granulomas e quatro casos sem granulomas

Resultados Nas úlceras com granulomas, havia uma média de $41,3 \pm 6,2$ % de células positivas. Os quatro casos sem granulomas apresentaram $41,1 \pm 5,9$ % de células positivas no infiltrado ($p= 0,97$).

Conclusão Os nossos resultados sugerem que na DB, a COX2 não parece participar da ativação ou supressão da resposta Th1.

Palavras chave: ciclooxygenase, imunohistoquímica, Úlcera de Buruli, prostaglandinas

A DB é uma doença ulcerativa que afeta primariamente a pele e tecido celular subcutâneo, mas pode se estender para os ossos próximos. Ela inicia como um nódulo ou placa subcutânea que cresce e ulcera, produzindo uma úlcera necrótica profunda. É causada pela *Mycobacterium ulcerans*, descoberta por MacCallum *et al.* em 1948 (1).

A DB é a terceira principal causa de doenças micobacterianas em indivíduos imunocompetentes, após a tuberculose e a hanseníase (2, 3, 4). A mortalidade é baixa, mas há um grande sofrimento e as seqüelas são graves e freqüentes, particularmente amputações das extremidades (4). As populações sob risco de DB incluem principalmente crianças, moradores de climas tropicais, e expostos a águas paradas ou de movimentação lenta (1,4,5). Já foram relatados casos em ao menos 27 países. As úlceras podem ser divididas em precoces (histopatologia com necrose e inflamação aguda) e tardias (histopatologia com tecido de granulação, fibrose e granulomas). O maior fator de virulência da *M. ulcerans* é uma toxina macrolídea chamada micolactona, a qual é responsável pela destruição tecidual (necrose e ulceração) e imunossupressão local através da supressão de IL2 e TNF α por monócitos, assim como a indução de apoptose por macrófagos (6,7,8,9,10). Existe uma controvérsia nos resultados de estudos clínicos que avaliaram os níveis de IFN γ e IL10 em pacientes com a DB (11,12). A razão para a falta de consistência nos achados poderia ser a ausência de análise histopatológica. Há uma correlação significativa entre a presença de granulomas (em úlceras tardias) e resposta Th1 com maior expressão de interferon- γ (13,14,15). Por outro lado, enquanto alguns estudos não encontram uma maior expressão de IL10 em úlceras recentes (12,13,14), Phillips *et al.* (15) verificaram uma associação significativa.

A orquestração das propriedades imunossupressoras da micolactona e as citocinas expressadas em diferentes estágios da infecção da DB são de grande interesse dos pesquisadores. Há fortes evidências de que concentrações elevadas de PGE2 têm efeitos

imunossupressores significativos (15,16,17,18). A principal fonte de prostaglandinas são macrófagos estimulados que expressam ciclooxigenase 2 (COX2), uma enzima induzida expressa em tecido inflamado (16). A PGE2 está envolvida na regulação negativa da resposta Th1. De acordo com a literatura, a PGE2 é liberada em grande quantidade pelos macrófagos em pacientes com a forma lepromatosa de hanseníase (17). Em modelos experimentais de tuberculose e lepra murina, foi detectado um aumento progressivo na produção de PGE2 e COX2 durante o curso da infecção (18). Não há estudos avaliando a expressão de COX2 em DB. Com base nas informações disponíveis em tuberculose e hanseníase, nós esperamos encontrar uma maior expressão de COX2 em casos de úlceras recentes. Este estudo realizou uma investigação imunohistoquímica e de morfometria automática da percentagem de células coradas COX2 como um marcador indireto da produção de prostaglandinas em biópsias de pele de pacientes com DB na etapa ulcerativa.

Materiais e métodos

Biópsias

Foram selecionadas biópsias de pele e tecido subcutâneo de 8 pacientes com diagnóstico de DB incluídos nos arquivos do Instituto de Patologia das Forças Armadas em Washington, USA. Todas as biópsias eram provenientes de Benin, África, e foram obtidas como parte do tratamento (debridamento cirúrgico) ou por razões diagnósticas. As biópsias foram fixadas em formaldeído a 10% e incluídas em parafina. Em todos os casos o diagnóstico foi confirmado pela histopatologia e por ao menos um dos seguintes testes positivos: detecção do bacilo pela coloração de Ziehl-Neelsen, cultura e PCR para IS-2424. Foram estudados oito pacientes com lesões ulcerativas. As úlceras foram divididas histologicamente em duas categorias: ulceradas sem granulomas (úlceras

precoces) e úlceras com granulomas (úlceras tardias). A evolução das úlceras variou de 30 a 90 dias no grupo sem granulomas e de 120 a 180 no grupo com granulomas. A idade dos pacientes variou de 5 a 20 anos.

Todos os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com os padrões éticos do Ministério da Saúde de Benin. As amostras foram coletadas antes de 2000, quando o único tratamento disponível era o debridamento cirúrgico. Os adultos deram consentimento oral para a participação no estudo. Quando os pacientes eram menores, um consentimento oral foi dado pelos pais ou responsáveis.

Imunohistoquímica e morfometria automatizada

Cortes de 5µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas. Após desparafinização, os cortes foram imersos em solução para recuperação antigênica (Dako) por 40 min a 100°C. A seguir se realizou o bloqueio da peroxidase endógena com 3% de H₂O₂ em metanol absoluto seguido pelo bloqueador universal (Dako) por 10 min. Os cortes foram incubados durante toda a noite à temperatura de 10°C com anticorpo policlonal de coelho contra COX2 (17), diluído a 1:300 em PBS. A reação foi detectada com anticorpos secundários anti-coelho IgG diluído 1/50 em PBS e diaminobenzidina. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina. A porcentagem de células coradas com COX2 foi determinada por um analisador automatizado de imagens (Q-Win Leica). As células positivas e negativas foram contadas no infiltrado inflamatório, localizado na derme profunda e tecido celular subcutâneo. O teste U de Mann Whitney foi utilizado na comparação das porcentagens de células positivas encontradas nos grupos de úlceras com e sem granulomas. A significância estatística foi definida em $P < 0.05$.

Resultados

A maioria das células positiva foi macrófagos, com fibroblastos positivos ocasionalmente. Nos quatro casos selecionados como estágio com granulomas a média foi de $41,3 \pm 6,2$ % de células positivas no infiltrado (figura 1). Os quatro casos sem granulomas apresentaram uma média de $41,1 \pm 5,9$ % de células positivas no infiltrado (figura 2). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,97$). Em pele normal não foi observada coloração para o anticorpo COX2.

Discussão

Em algumas doenças micobacterianas, a resposta pró-inflamatória é protetora, e depende da participação de células Th1 e macrófagos ativados, enquanto a resposta antiinflamatória é geralmente considerada uma resposta não protetora com participação de células Th2 e macrófagos não ativados. O IFN γ e a IL12 são críticos para a diferenciação Th1, enquanto a IL4 e a IL13 são igualmente importantes para a diferenciação Th2. A COX2 é uma enzima induzível expressada em tecidos inflamatórios e em concentrações elevadas apresenta importantes efeitos imunossupressores, produzindo resposta antiinflamatória (18). Estudos recentes caracterizaram o padrão imunológico *in situ* de pacientes com o diagnóstico de DB (13,14). O IFN γ é altamente expresso em úlceras com granulomas, um estágio que geralmente precede a cicatrização espontânea (13,14). Os dados sobre a IL10 não são consistentes, mas parece ser mais expressa em úlceras com necrose e inflamação aguda (3,11,12). As outras citocinas estudadas tais como TNF α e TGF β estavam elevadas nas úlceras precoces e tardias (12,13,14,19). Por outro lado, Phillips *et al.* verificaram uma

maior concentração de TNF α e IL12 em estágios tardios da doenca (20). Sabe-se que a PGE2, TGF β e a IL10 são liberadas por macrófagos em casos de doenca micobacteriana não controlada, o que poderia induzir a imunossupressão pela inibição da proliferação de células T e produção de IL12 e IFN γ e TNF α (17,21). Portanto, esperaríamos encontrar uma maior expressão de COX2 em úlceras precoces. No entanto, o nível de expressão de COX2 foi muito similar nos grupos estudados. Uma forte expressão de TNF α , juntamente com antígenos micobacterianos, podem ser indutores eficientes da produção de PGE2 (22) e poderia explicar a forte expressão da COX2 na DB.  possível que as concentrações de prostaglandinas em úlceras de estágio tardio não seja suficiente para inibir a produção de citocinas Th1 e óxido nítrico (17,18). Por razões ainda pouco compreendidas, a produção de IFN γ em úlceras tardias é capaz de ser restabelecida e induzir a um declínio significativo da carga bacilar apesar da expressão elevada de IL10, TGF- β (13) e COX2. Em contraste com a tuberculose e a hanseníase, na DB a COX2 não parece participar na ativação ou supressão da resposta Th1. Mais estudos devem ser realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos imunológicos que controlam essa infecção.

Agradecimentos

A.E. Kiszewski realizou seu doutorado como bolsista da CAPES. Este trabalho foi financiado parcialmente pelo CONACyT, México e Fundação Damien, Bélgica.

Referências bibliográficas

- 1 MacCallum P, Tolhurst JC, Buckle G, Sissons HA. A new mycobacterial infection in man. *J Pathol Bacteriol* 1946;60:92-122.
- 2 Weir E. Buruli Ulcer: The Third most common mycobacterial infection. *CMAJ* 2002;166:1691.
- 3 World Health Organization. Buruli ulcer. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75(13):106-8
- 4 Van der Werf TS, van der Graaf WTA, Tappero JW, Asiedu K. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 1999;354:1013-8.
- 5 World Health Organization. Buruli ulcer disease. *Wkly Epidemiol Rec* 2002;32:271-275.
- 6 Stinear T, Mve-Oblang A, Small PLC, Frigui W, Pryor M *et al.* Giant plasmid-encoded polypeptide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:1345-1349.
- 7 George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, Small PLC. Mycolactone: A Polyketide Toxin from *Mycobacterium ulcerans* Required for Virulence. *Science* 1999; 283:854-857.
- 8 van der Werf TS, Stinear T, Stienstra Y, van der Graaf W TA *et al.* Mycolactones and *Mycobacterium ulcerans* disease. *The Lancet* 2003;362:1062-1064.
- 9 George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PLC. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in Guinea Pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000;68:877-883.
- 10 Pahlevan AA, Wright DJM, Andrews C, George KM, Small PLC, Foxwell BM. The Inhibitory Action of *Mycobacterium ulcerans* Soluble Factor on Monocyte/T Cell Cytokine Production and NF- κ B Function. *J Immunol*, 1999;163:3928-3935.

- 11 Prévot G, Bourreau E, Pascalis H, Pradinaud R *et al.* Differential production of systemic and intralésional gamma interferon and interleukin 10 in nodular and ulcerative forms of buruli disease. *Infect Immun* 2004;72:958-965.
- 12 Westenbrink BD, Stienstra Y, Huitema MG, Thompson WA, Klutse EO, Ampadu EO *et al.* Cytokine Responses to Stimulation of Whole Blood from Patients with Buruli Ulcer Disease in Ghana. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2005,12:125-129.
- 13 Kiszewski AE, Becerril E, Kader ITA, Aguilar LD, Myers W, Portaels F, Hernández Pando R. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clinical and Experimental Immunology* 2006, 143:445-451.
- 14 Schipper HS, Rutgers B, Huitema MG, Etuaful SN, Westenbrink BD, Limburg PC, Timens W, van der Werf TS. Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol.* 2007 Sep 27; [Epub ahead of print].
- 15 Phillips R, Horsfield C, Mangan J, Laing K, Etuaful S, Awuah P, Nyarko K, Osei-Sarpong F, Butcher P, Lucas S, Wansbrough-Jones M. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. *Infect Immun.* 2006,74:2917-24.
- 16 Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11693-7.
- 17 Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández-Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *British Journal of Dermatology* 2003;148:795-798.

- 18 Rangel-Moreno J, Estrada-García I, Garcia- Hernández Maria de la Luz, Aguilar-Leon D, Márquez R, Hernández-Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002, 106:257-266.
- 19 Gooding TM, Johnson PDR, Campbell DE, Hayman JÁ, Hartland EL, Kemp AS, Robins-Browne RM. Immune Response Infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect and Immun* 2001; 69:1704-1707.
- 20 Phillips R, Horsfield C, Kuijper S, Sarfo SF, Obeng-Baah J, Etuaful S, Nyamekye B, Awuah P, Nyarko KM, Osei-Sarpong F, Lucas S, Kolk AH, Wansbrough-Jones M. Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with *Mycobacterium ulcerans* disease compared to that from patients with tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:253-7.
- 21 Misra N, Selvakumar M, Singh S *et al.* Monocyte derived IL10 and PGE2 are associated with the absence of Th1 cells and *in vitro* T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* 1995;48:123-8.
- 22 Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol.* 1998;160:1402-10.

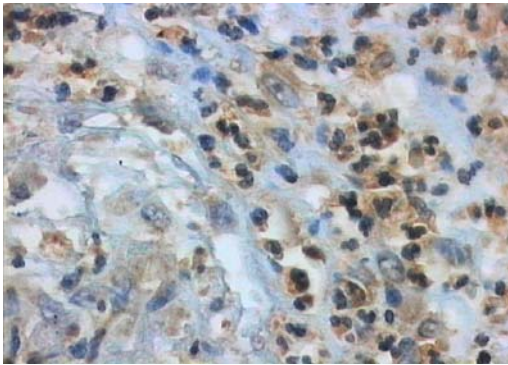


Figura 1. Expressão de COX2 em DB no estágio de organização com granulomas

s

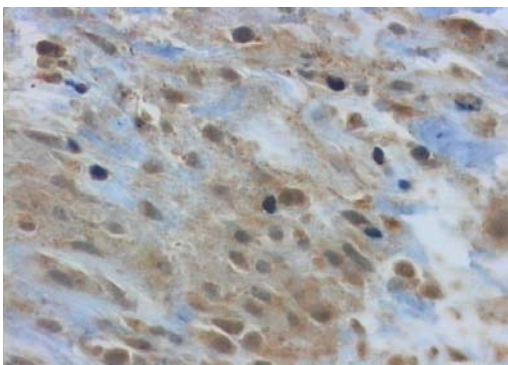


Figura 2. Expressão de COX2 em DB no estágio necrótico sem granuloma

9- DISCUSSÃO GERAL

Com os dados disponíveis até o momento na literatura, somados aos obtidos neste estudo, é possível sugerir um modelo histo-imunológico para a DB. As diferentes etapas histopatológicas da DB corresponderiam a diferenças no perfil de produção de citocinas (Phillips *et al.*, 2006, Kiszewski *et al.*, 2006, Schipper *et al.*, 2007). A produção destas citocinas seria influenciada por fatores como os estágios intra e extracelular do bacilo e a produção de micolactona. No estágio inicial da doença (estágio histológico necrótico não ulcerado), os macrófagos fagocitam os bacilos e posteriormente entram em necrose e apoptose pela ação da micolactona (Oliveira *et al.*, 2005). A lise de macrófagos liberaria bacilos que se acumulariam nas áreas vizinhas. Os bacilos passariam, então, gradualmente do ambiente intracelular para o extracelular (Coutanceau *et al.*, 2005). Neste estágio inicial, encontraríamos uma maior concentração de IFN γ e baixa produção de IL10 (Prévot *et al.*, 2004). A micolactona liberada ocasionaria a necrose massiva dos tecidos vizinhos e demais células inflamatórias adjacentes (Coutanceau *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Peduzzi *et al.*, 2007). À medida que os níveis de micolactona fossem subindo, o paciente passaria então para a fase seguinte da doença, o estágio necrótico ulcerado. Nesta etapa, ocorreria uma diminuição nos níveis de IFN γ e um aumento dos níveis de IL10. No entanto, existem divergências se a IL10 seria ou não inibidora da resposta Th1 neste momento (Prévot *et al.*, 2004; Westenbrink *et al.*, 2005; Kiszewski *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2006; Schipper *et al.*, 2007). A IL6 é outra citocina candidata nesta fase a promover a diferenciação Th2 e simultaneamente inibir a polarização Th1. Esta citocina foi identificada em altas concentrações em úlceras na DB e poderia estar relacionada com a redução da concentração do IFN γ (Peduzzi *et al.*, 2007).

A concentração elevada de IL6 também poderia ser responsável pelo achado de maior concentração de células T CD8 verificado no presente trabalho (Kiszewski *et al.*, 2006). Uma possível explicação é que a IL6 ativaria as células T induzindo sua diferenciação em células T CD8, com atividade supressora durante o estágio necrótico ulcerado e com actividade citotóxica durante o estágio de organização com granulomas (Peduzzi *et al.*, 2007). O fato de que detectamos uma grande concentração de macrófagos nas úlceras apoiaria este tipo celular como potencial recurso para a produção de IL6 (Kiszewski *et al.*, 2006). Vale destacar que, na tuberculose e na hanseníase, predominam no infiltrado inflamatório células T CD8 quando a resposta predominante é Th2 e células T CD4 quando existem granulomas e a resposta Th1 está estabelecida (Hernández-Pando *et al.*, 1996; Gonzales *et al.*, 1999; Rojas-Espinosa e Lovik, 2001).

A queda da concentração de IFN γ no estágio necrótico ulcerado poderia estar aliada às propriedades imunossupressoras da micolactona, que suprimiria IL2 e TNF α (George *et al.*, 1998; Pahlevan *et al.*, 1999; Pimsler *et al.*, 1988; Coutanceau *et al.*, 2005). A supressão na produção de TNF α resultaria na diminuição da síntese da sintetase de óxido nítrico induzível e dificultaria a organização dos granulomas, que são fundamentais para o controle da infecção. A destruição celular na periferia das áreas necróticas recrutaria novas células inflamatórias, e então novos macrófagos infectados seriam lisados e o ciclo se repetiria. A queda na produção de IFN γ nos pacientes nesta fase da doença contribuiria para a persistência extracelular do bacilo e para o curso indolente da doença. Por outro lado, a IL12 estaria sendo produzida em maior concentração na tentativa de aumentar a produção de IFN γ (Yeboah-Manu *et al.*, 2006). No estágio de tecido de organização com granulomas, ocorreria uma recuperação da reposta de tipo Th1, com aumento da produção de IFN γ e queda na produção de

IL10, facilitando a formação de granulomas imunológicos e o controle da doença. Esta resposta se manteria até a fase cicatricial tardia da doença, demonstrando a importância do IFN γ para o controle da DB (Westenbrink *et al.*, 2005, Kiszewski *et al.*, 2006, Schipper *et al.*, 2007).

A contribuição do presente trabalho no entendimento da imunopatologia da DB reside no fato de ter sido o primeiro artigo publicado na literatura internacional apresentando uma associação entre dados histológicos e citocinas. Da mesma forma que em outras micobacterioses, verificamos que é de fundamental importância a maior expressão de IFN γ para o desenvolvimento de granulomas no tecido e redução da carga bacilar, que se traduzem no controle da infecção. Este estudo já foi replicado parcialmente por Schipper *et al.* (2007), confirmando os mesmos achados. O presente trabalho é também o primeiro estudo em humanos a somar-se com estudos experimentais prévios (Coutanceau *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005) mostrando a presença do bacilo intracelular em macrófagos, além da abundância de bacilos extracelulares relatados tradicionalmente. Trata-se também da primeira investigação sobre a expressão da ciclooxigenase 2 e TGF- β em DB. Ao contrário do constatado na tuberculose e hanseníase, doenças em que a COX2 (Rangel *et al.*, 2002; Kiszewski *et al.*, 2003) e o TGF- β (Kiszewski *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2004) são fatores importantes para a infecção micobacteriana crônica, esses marcadores não se mostraram relevantes na DB. Da mesma forma, este é o primeiro trabalho a relatar na DB a expressão de células T CD4 e CD8. Tendo em conta a importância do conhecimento da imunopatologia na DB, ainda são necessárias mais pesquisas no sentido de confirmar estes achados e abrir novas fronteiras, especialmente em estratégias de tratamento para a doença.

9- REFERÊNCIAS DA DISCUSSÃO

- Allen SS, Cassone L, Lasco TM, McMurray DN. Effect of neutralizing transforming growth factor beta1 on the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Infect Immun*. 2004;72:1358-63.
- Coutanceau E, Marsollier L, Brosch R, Perret E, Goossens P, Tanguy M, Cole ST, Small PL, Demangel C. Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of *Mycobacterium ulcerans*: the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cell Microbiol*. 2005;7:1187-96.
- George KM, Barker LP, Welty DM, Small PL. Partial Purification and characterization of biological effects of lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 1998;66:587-93.
- Gonzales ACO, Silva TC, Barbosa AB, Sadigursky M. Avaliações imunohistológicas das células inflamatórias (infiltrantes) em biópsias cutâneas provenientes de pacientes jovens clinicamente suspeitos de várias formas de hanseníase. *An bras Dermatol* 1999;74:365-71.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996;89:26-33.
- Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol*. 1999;21:317-38.
- Kiszewski A, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernandez-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand J Immunol*. 2003a;57:279-85.

- Kiszewski AE, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernandez Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol.* 2003b;148:795-8.
- Kiszewski AE, Becerril E, Aguilar LD, Kader IT, Myers W, Portaels F, Hernandez Pando R. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol.* 2006;143:445-51.
- Oliveira MS, Fraga AG, Torrado E, Castro AG, Pereira JP, Filho AL, Milanezi F, Schmitt FC, Meyers WM, Portaels F, Silva MT, Pedrosa J. Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. *Infect Immun.* 2005;73:6299-310.
- Pahlevan AA, Wright DJM, Andrews C, George KM, Small PLC, Foxwell BM. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF- κ B function. *J Immunol.* 1999;163:3928-35.
- Peduzzi E, Groeper C, Schutte D, Zajac P, Rondini S, Mensah-Quainoo E, Spagnoli GC, Pluschke G, Daubenberger CA. Local activation of the innate immune system in Buruli ulcer lesions. *J Invest Dermatol.* 2007;127:638-45.
- Phillips R, Horsfield C, Mangan J, Laing K, Etuaful S, Awuah P, Nyarko K, Osei-Sarpong F, Butcher P, Lucas S, Wansbrough-Jones M. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. *Infect Immun.* 2006;74:2917-24.
- Pimsler M, Sponnsler TA, Meyers WM. Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. *J Infect Dis* 1988;157:577-80.
- Prévot G, Bourreau E, Pascalis H, Pradinaud R, Tanghe A, Huygen K, Launois P. Differential production of systemic and intralesional gamma interferon and interleukin-10 in nodular and ulcerative forms of Buruli disease. *Infect Immun.* 2004;72:958-65.

- Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2002;106:257-66.
- Rojas-Espinosa O, Lovik M. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infections in domestic and wild animals. *Rev Sci Tech*. 2001;20:219-51.
- Schipper HS, Rutgers B, Huitema MG, Etuaful SN, Westenbrink BD, Limburg PC, Timens W, van der Werf TS. Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol*. 2007 [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03506.x
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:133-46.
- Westenbrink BD, Stienstra Y, Huitema MG, Thompson WA, Klutse EO, Ampadu EO, Boezen HM, Limburg PC, van der Werf TS. Cytokine responses to stimulation of whole blood from patients with Buruli ulcer disease in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:125-9.
- Yeboah-Manu D, Peduzzi E, Mensah-Quainoo E, Asante-Poku A, Ofori-Adjei D, Pluschke G, Daubenberger CA. Systemic suppression of interferon-gamma responses in Buruli ulcer patients resolves after surgical excision of the lesions caused by the extracellular pathogen *Mycobacterium ulcerans*. *J Leukoc Biol*. 2006;79:1150-6.

11. ANEXOS

11.1- ANEXO 1

Material e métodos

Em linhas gerais, os materiais e métodos já foram descritos nos itens correspondentes nos artigos 1 e 2. Serão aqui apresentadas características do delineamento do estudo não mencionadas nos artigos, bem como o detalhamento das técnicas laboratoriais. Em particular, as técnicas de imunohistoquímica foram padronizadas pela autora em estudos prévios envolvendo a hanseníase (Anexos 3 e 4);

Delineamento do estudo: Estudo retrospectivo, observacional, comparativo, transversal.

Amostra estudada: Blocos de parafina arquivados contendo fragmentos de pele de pacientes com diagnóstico clínico de DB submetidos ao tratamento convencional para a úlcera (cirurgia). Os pacientes foram atendidos em um centro de referência para o tratamento da doença em Benin, África com o apoio da OMS. O material retirado dos pacientes foi incluído em parafina e enviado ao Laboratório de Patologia das Forças Armadas Americanas em Washington, EUA.

Crítérios de inclusão: Biópsias de pele de pacientes com diagnóstico clínico de DB, confirmados pela histopatologia e mais um dos seguintes exames: detecção de BAAR por coloração de Ziehl-Neelsen, cultura positivo para *M. ulcerans* ou PCR para *M. ulcerans* (IS-2424). Os cortes foram tomados dos bordos das lesões. Os pacientes incluídos neste estudo não receberam antibióticos, uma vez que na ocasião da coleta do material, a antibioticoterapia não fazia parte do tratamento da DB.

Critérios de exclusão: Biópsias com perda de tecido celular subcutâneo. Material constituído somente por tecido necrótico. Tecido mal conservado ou danificado. Paciente com infecção concomitante por outras micobactérias. Paciente portador do vírus HIV.

Cálculo do tamanho da amostra: O n foi calculado com base em um estudo realizado previamente pela aluna sobre a expressão do TGF β em lesões de hanseníase polar lepromatosa/tuberculóide (Anexo 3). Neste cálculo se utilizou o programa Epistat, sendo considerados o n° de casos estudados, a variância, menores diferenças entre as médias (porcentagem de células positivas), poder de 90% e $\alpha= 0,05$. Obteve-se um n resultante de 6 casos em cada grupo estudado. Embora o n estudado foi 1 indivíduo menor do que o calculado, o poder estatístico ainda pode ser considerado alto.

Métodos laboratoriais

Cortes dos blocos:

Utilizamos cortes com espessura de 5 micrômetros.

Técnica de Hematoxilina e eosina (H-E)

A seguir, está listada a seqüência de soluções nas quais as lâminas foram embebidas com os cortes histológicos para a coloração com H-E:

- 1- xilol
- 2-xilol
- 3-álcool 100%
- 4-álcool 100%
- 5- álcool 95%
- 6- álcool 95%
- 7- álcool 80%
- 8- hematoxilina (corante)
- 9- água corrente
- 10- eosina (corante)
- 11- álcool 100%
- 12- álcool 100%
- 13- álcool 100%
- 14- álcool 100%

15- xilol

16- xilol

Montagem das lâminas com bálsamo e lamínula

Método de Ziehl- Neelsen

Fixador: formalina neutra tamponada 10%

Cortes em parafina

1- Preparo das soluções:

A- Solução de Ziehl:

Fucsina básica –1gr

Álcool etílico PA- 100ml

Ácido fênico cristalizado- 5 gr

Água destilada – 100ml

Dissolver a fucsina básica no álcool, juntar o ácido fênico, posteriormente adicionar pouco a pouco a água.

B- Solução diferenciadora:

Álcool 70°- 99ml

Ácido clorídrico- 1ml

C- Solução de azul de metileno (estoque)

Azul de metileno –1,4 gr

Álcool 95- 100ml

D- Solução de azul de metileno- solução de uso

Azul de metileno (solução estoque) – 10ml

Água destilada –90 ml

Ácido acético glacial- 0,5ml

E- Solução de Reengorduramento

Vaselina líquida – 40 ml

Terebentina – 60 ml

2- Procedimento da técnica:

A- Desparafinar na estufa a 60°C, com solução de reengorduramento- 2 trocas.

B- Enxaguar com papel filtro

C- Álcool etílico 95% - 3 banhos

D- Corar na solução de Ziehl a frio durante 20 min.

F- Lavar com água corrente

G- Solução diferenciadora até os cortes ficarem rosa pálido.

H- Lavar com água corrente durante 5 min.

I- Coloração de fundo com azul de metileno – 1min.

J- Lavar com água corrente

K- Colocar a lâmina para secar (estufa a 45°C)

L- Clarificar em xilol e montar.

3- Interpretação da coloração:

Bacilo álcool ácido resistente – vermelho

Núcleo- azul intenso

Citoplasma – azul celeste

Preparação das lâminas com organossilano:

Seguem abaixo os passos utilizados para a sinalização das lâminas:

- 1-Lavar a lâmina com solução de detergente neutro Extran (Merck 7553) a 0,5% em água por 30 minutos
- 2-Lavar com água corrente para tirar o detergente (no mínimo por 2 horas)
- 3-Lavar as lâminas em água quente
- 4-Secar em estufa
- 5-Guardar as lâminas limpas em caixas, evitando deposição de poeira
- 6-As lâminas limpas devem ser manipuladas com luvas para evitar contaminação das mesmas pela oleosidade da pele
- 7-Imersão das lâminas em acetona por 2 minutos, retirando o excesso após
- 8-Imersão na solução de silano a 4% em acetona, deixando por 2 minutos e retirando o excesso após
- 9-Imersão quatro vezes em acetona, retirando o excesso
- 10-Secar em estufa, deixar esfriar e guardar em caixas limpas

Método ABC (Complexo Avidina-Biotina)

Este método aproveita a grande afinidade da avidina para unir-se a quatro moléculas de biotina e o complexo de três peroxidases. O cromógeno utilizado como revelador neste método é a diaminobenzidina (DBA); a reação positiva produz a cor ocre, a qual pode variar de intensidade e estar localizada no núcleo, no citoplasma ou na membrana celular. Os passos da técnica são os seguintes:

- As lâminas (com os cortes) devem ser colocadas no forno a 60°C durante 30 minutos.
 Desparafinar e hidratar o tecido passando por xilol, álcool absoluto, álcool 95°, álcool 80%, álcool 70%, água destilada e água corrente, cada etapa durante 30 segundos.
 Recuperação antigênica: (antigen retrieval solution –Dako, Glostrup) em banho Maria a temperatura de 98° durante 40 minutos.
 Resfriar até a temperatura ambiente.
 Lavar com PBS (pH 7.6) durante 5 min.
 Bloquear peroxidase endógena com 3% de H₂O₂ em metanol absoluto durante 1 hora.
 Decantar
 Lavar com PBS durante 5 min.
 Bloquear proteínas (universal blocking reagent – Powerblock, Biogenex) durante 10 min.
 Decantar
 Aplicar no anticorpo primário na diluição titulada e incubar durante toda a noite à temperatura ambiente
 Decantar
 Lavar com PBS (lavagem rápida).
 Lavar com PBS (durante 6 minutos).
 Adicionar o anticorpo secundário biotilado e incubar por 20 min.
 Lavar com PBS durante 6 min.

Aplicar o complexo avidina-peroxidase e incubar por 20 minutos.

Lavar com PBS durante 6 min.

Agregar o cromógeno (DBA)

Observar ao microscópio até obter a reação positiva.

Colocar em água destilada

Contrastar com Hematoxilina de Meyer durante 10 min.

Lavar com água comum

Revelar com água amoniacal

Desidratar passando por: álcool a 96°, álcool absoluto e xilol

Cobrir

Os controles positivos e negativos serão avaliados como é rotina nos procedimentos de imunohistoquímica. Neste caso foram utilizados casos polares de hanseníase (tuberculoide e lepromatoso) como controles positivos e negativos de acordo ao anticorpo estudado.

Análise Morfométrica (contagem de células positivas): Para a quantificação das células positivas utilizamos um analisador de imagens. Este consiste de um programa computadorizado específico para a contagem de células marcadas nos cortes histológicos montados em lâminas. O computador é adaptado ao microscópio por uma fibra óptica. Realizar-se-á a contagem de células positivas sob um aumento de 400X. O campo analisado neste programa computadorizado mede uma área de 7177.6 μm^2 . Para a contagem se localizará com um aumento de 200X as seguintes áreas: 1-granulomas, 2-área peri-vasculares, 3-área perianexiais. Será modificado então o aumento para 400X e se contarão as células positivas e negativas nos locais anteriormente mencionados. As células positivas serão as que estiverem marcadas com a cor marrom (seja citoplasma ou membrana celular de acordo ao anticorpo utilizado). A contagem se realizará em quinze campos aleatórios por lâmina (5 campos para cada região mencionada). Cada campo terá um número de células positivas e negativas e se avaliará as porcentagens de células positivas. Por exemplo:

Lâmina 1: Campo 1- $\frac{10+}{5-} = 66,6\%$ de células positivas
15 cél.total

A contagem de bacilos foi realizada com objetiva de imersão com aumento de 1000 vezes, em 5 campos randomizados. Os bacilos foram corados pela técnica de Z-N.

11.2- ANEXO 2 – INICIATIVA GLOBAL PARA A ÚLCERA DE BURULI: ESCLARECIMENTOS SOBRE BIOÉTICA

O presente trabalho tem uma série de peculiaridades incomuns à maioria dos projetos de pesquisa: a amostra é proveniente do continente africano; a doença só tinha quando da coleta dos dados uma única estratégia terapêutica disponível; muitos dos afetados são crianças e quando o trabalho foi iniciado, ainda não existia comitê de ética no país em que a coleta de dados foi realizada.

A “Global Buruli Ulcer Initiative” (GBUI), colaboração internacional relacionada com esse projeto, teve início em 1998, após uma Conferência Internacional organizada pela Organização Mundial da Saúde sobre o controle e pesquisa em UB realizada em Yamoussoukro, Costa do Marfim. A iniciativa é mantida até hoje, incluindo vários projetos de pesquisa em diferentes países africanos onde a UB é endêmica. O projeto “Resposta imunológica local na etapa ulcerativa da Doença de Buruli” realizado na FFFCMPA com a colaboração de outras 3 instituições estrangeiras (Bélgica, EUA e México) faz parte da GBUI. Logo após a conferência de Yamoussoukro, estabeleceram-se programas de tratamento e pesquisa em Benin, Costa do Marfim, Gana, Guiné e Togo. O documento final referente à conferência, denominado “Declaração de Yamoussoukro”, foi assinado pelo Diretor Geral da OMS e pelos então presidentes de Benin (Mathieu Kérékou), Costa do Marfim e Gana. O website da iniciativa (www.who.int/gtb-buruli) foi criado logo em seguida, e permanece ativo até hoje como uma boa fonte de informações sobre a doença e a iniciativa para a sua pesquisa e controle. Cabe aqui mencionar que a UB é a terceira mais importante doença causada por micobactérias em todo o mundo, principalmente em países africanos. A UB é provavelmente uma das mais negligenciadas entre todas as doenças negligenciadas do mundo.

A coleta de dados referente ao projeto em questão foi realizada em Benin, antes do surgimento recente de antibioticoterapia para a UB, a qual só tornou-se disponível recentemente, como resultado de pesquisas no âmbito da iniciativa (www.who.int/gtb-buruli). Assim, o material foi coletado a partir de tecidos de excisões cirúrgicas, único tratamento então disponível para a doença. Na época, não havia comitê de ética em Benin (Documento 1), razão pela qual não existe aprovação por comitê de ética daquele país. No entanto, os pais dos pacientes deram um consentimento verbal e a pesquisa seguiu os padrões do Ministério da Saúde de Benin. Essas informações são mencionadas em cartas de esclarecimento enviadas por Christian Johnson (Documento 2) e Françoise Portaels (Documentos 1 e 3). O primeiro é diretor do Programa Nacional de Luta contra a Úlcera de Buruli” do Ministério da Saúde Pública de Benin, enquanto a segunda é pesquisadora do Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica.

Sobre a coleta e envio das amostras de Benin para os Estados Unidos e Bélgica

O exame histopatológico de tecidos afetados é um dos testes laboratoriais recomendados pela OMS para confirmar a UB. Por isso, as amostras foram enviadas a um centro de referência no assunto (AFIP), aos cuidados do Dr. Wayne M. Meyers. Da mesma forma, as biópsias foram enviadas para o Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica, aos cuidados da Dra. Françoise Portaels para o diagnóstico microbiológico, centro esse também recomendado pela OMS. Os laboratórios mencionados e respectivos responsáveis foram escolhidos de comum acordo entre pesquisadores e governo de Benin, após o encontro de Yamoussoukro. Cabe ressaltar que o envio deste material ao exterior era de conhecimento das autoridades sanitárias daquele país (Documento 2). Ambas as análises (histopatológica e microbiológica) são necessárias para a confirmação da doença e foram autorizadas pelo Ministério da Saúde

de Benin. As amostras de pele e cultivos da micobactéria provenientes de Benin fazem parte hoje do arquivo do Dr. Meyers e da Dra. Portaels e visam única e exclusivamente o diagnóstico e a pesquisa científica desta doença, conforme definido na Declaração de Yamoussoukro e reafirmado em 2004 através de resolução da OMS (*Resolution WHA57.1 Surveillance and control of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer)*). In: *Fifty-seventh World Health Assembly, Geneva, 17–22 May 2004. Resolutions and decisions. Geneva, World Health Organization, 2004 (WHA57/2004/REC/1):1–2*. Os Drs. Meyers e Portaels são co-autores do artigo referente ao projeto aqui analisado.

O Dr. Meyers não mais tem se dedicado ao projeto, em função de problemas de saúde e idade avançada (Documento 4). Por esse motivo, não foi possível obter uma carta do mesmo detalhando os seus procedimentos quanto ao projeto aqui avaliado. No entanto, esses pesquisadores (Dra. Françoise e Dr. Meyers) estão autorizados pela OMS para o recebimento e pesquisa de material correspondente à úlcera de Buruli, proveniente de qualquer região do mundo (www.who.int/gtb-buruli).

No tocante especificamente à pesquisa desenvolvida na FFFCMPA, o serviço de Washington participou apenas com a doação do material (blocos de parafina). Os serviços da Bélgica e do México ajudaram na análise dos resultados e na elaboração da publicação. O serviço do México participou ainda doando alguns anticorpos para a realização deste estudo.

A participação do México e do Brasil na colaboração internacional

O Dr. Rogelio Hernández Pando foi convidado pelo Dr. Meyers e pela Dra. Portaels para desenvolver pesquisas sobre aspectos imunológicos da UB, utilizando para isso amostras de pele e dados dos cultivos dos seus respectivos arquivos. Isso porque, assim como as instituições da Bélgica e dos Estados Unidos, o Departamento de

Patologia do Instituto Nacional de Ciências Médicas Salvador Zubirán, do México, é uma referência internacional em doenças produzidas por micobactérias, especificamente no que se refere aos aspectos imunológicos. O convite ao Dr. Pando foi uma consequência natural da série de trabalhos que já haviam sido desenvolvidos em colaboração entre esses pesquisadores.

A participação brasileira neste projeto iniciou em 2003, a partir de um convite feito pelo Dr. Rogelio Hernández-Pando à Dra. Ana Elisa Kiszewski Bau para avaliar o perfil imunológico “in situ” na etapa ulcerativa da UB. A Dra. Ana Elisa já havia desenvolvido o seu mestrado sob orientação do Dr. Hernández-Pando, estudando a hanseníase com técnicas imunohistoquímicas semelhantes às aplicadas no presente projeto. Em 2004, a Dra. Ana Elisa ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da FFFCMPA, sob a orientação da Dra. Ivonyr Irene Troglio Abdel Kader. O projeto de doutorado apresentado e aprovado pela comissão coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia da FFFCMPA foi o mesmo para o qual se solicita aprovação pelo CEP: “Resposta imunológica local na etapa ulcerativa da doença de Buruli”. Infelizmente, por falta de experiência e informação prévia, o recebimento dos blocos de parafina provenientes do México não cumpriu exatamente os dispositivos legais para ingresso de material biológico no país. Uma parte do material estudado (blocos de parafina) foi trazida ao Brasil em mãos pelo Dr. Pando. Cabe mencionar que este material pode ser manipulado sem oferecer qualquer risco de contaminação para as pessoas ou o meio ambiente. Este procedimento (que segue estritamente as normas de biosegurança internacionais) é comum na viabilização de trabalhos de pesquisa que envolvem colaboração internacional. Estas informações estão contidas na carta escrita pelo Dr. Hernández-Pando (Documento 5).

O material biológico recebido compreende principalmente 22 blocos de parafina trazidos do México pelo Dr. Pando e entregues à Dra. Ana Elisa no XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia (17-20/11/2003, Florianópolis SC). Além dos blocos, também foram trazidos alguns dos anticorpos utilizados na realização da imunohistoquímica (IL4, IFN gama, TNF alfa e IL10). Em 2004, o Dr. Pando enviou lâminas pelo correio que foram somadas ao estudo. Posteriormente, o laboratório de patologia da FFFCMPA comprou dois anticorpos monoclonais (IL10 e IFN gama) para complementação da tese. Os 22 blocos enviados correspondiam a amostras de somente 11 pacientes (e não o contrário como foi inicialmente compreendido pelo CEP no que diz respeito a blocos e pacientes).

Documentos e cartas de esclarecimento

- 1- Comunicação pessoal entre as Dras. Ana Elisa e Françoise Portaels e respectiva tradução.
- 2- Carta do Dr. Roch Christian Johnson – 1º de fevereiro de 2007 e respectiva tradução.
- 3- Carta da Dra. Françoise Portaels – 26 de fevereiro de 2007 e respectiva tradução.
- 4- Divulgação da aposentadoria do Dr. Wayne Meyers e respectiva tradução.
- 5- Carta da Dr. Hernández-Pando – 28 de fevereiro de 2007.

Documento 1

Assunto: Your mail to Martine Debacker

Data: Mon, 8 Jan 2007 16:06:50 +0100

De: "Karin Janssens" <KJanssens@itg.be

Para: kiszewski@yahoo.com.br

Cc: "roch christian JOHNSON" <rochjohnson@yahoo.fr>, debackerm@skynet.be,
"Esther K. Meyers" <wmekmeyers@comcast.net>

Dear Ana Elisa,

Dr. Debacker forwarded your mail to me. The specimens that you have analyzed were collected before 2000 and are not related to the study of Dr. Debacker, which was done after 2000.

Dr. Hernandez-Pando had received tissue specimens from Dr. W.M. Meyers (AFIP, Washington DC). These specimens were collected from surgically excised tissues. There was no ethical committee in Benin at that time. We therefore cannot send you an approval of the Ethical Committee from Benin.

At that time, surgery was accepted as the current definitive treatment of Buruli ulcer recommended by WHO (Buntine J and Crofts K, eds. Buruli Ulcer). Management of Mycobacterium ulcerans disease. A manual for health care professionals. WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.3).

Histopathologic examination of surgically excised tissues is one of the laboratory tests recommended by WHO to confirm Buruli ulcer (Portaels F, Johnson P and Meyers WM, eds. Buruli Ulcer. Diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease. WHO/CDS/GBUI/2001.4). On this account Dr. W.M. Meyers had received specimens from surgically excised tissue fixed in formalin.

Can you explain the situation to your institution ? If this explanation is not sufficient, you may contact Dr. Christian Johnson who is the coordinator of the Buruli Ulcer Program in Benin. I am forwarding him this mail to him for his information.

I fully understand how much this is important to you. I hope this will be helpful.

Did you contact Dr. W.M. Meyers ? Please let me know if I can be of any additional assistance.

With kindest regards,

Prof. Françoise Portaels
Department of Microbiology
Institute of Tropical Medicine
Nationalestraat 155
B-2000 Antwerpen, Belgium
Phone: 32-3-2476317
Fax: 32-3-2476333
Email: portaels@itg.be

Documento 2

REPUBLICQUE DU BENIN

COTONOU Le 1^{er} Février 2007-----
MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE-----
DIRECTION NATIONALE DE LA PROTECTION SANITAIRE-----
PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE
L'ULCERE DE BURULI-----
N° MSP/DC/SGM/DNPS/PNLUB**To Whom It May Concern**

The Buruli Ulcer Control Program in Benin aims to provide appropriate Health Care to patients with Buruli Ulcer Disease and develop research activities. The program established a large international collaboration with experts from several countries, who received information or materials from Benin in order to collaborate in the advancement of the knowledge in this disease. Buruli Ulcer is a neglected disease in the world and a public health problem in Benin.

Therefore, international collaboration is needed. All procedures were developed in accordance with high ethical standards. The main beneficiaries are the patients with Buruli disease. The Brazilian scientists Ana Elísa Kiszewski Bau and Ivonyr Abdel Kader and the Mexican scientist (Dr. Hernández-Pando), together with renowned investigators from our program (Drs Wayne Meyers and Francoise Portaels) developed studies on the local immune response in the Buruli Ulcer Disease. In this study, they analyzed tissue paraffin blocks from the surgical specimens obtained when the patients with the disease were treated. All the procedures in Benin were performed in accordance with the Ethical standards of the Ministry of Health from Benin. Adult patients gave oral consent for participating in the study. When patients were minors, oral consent was given by a parent or a guardian.




Docteur Roch Christian JOHNSON

Documento 3



Department of Microbiology – Mycobacteriology
 E-mail: portaels@itg.be
 Tel.: 32-3-247 63 17
 Fax: 32-3-247 63 33

Antwerpen, 26 February 2007

To Whom it May Concern

The Institute of Tropical Medicine takes part in the Buruli Ulcer Initiative, including the project "The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease". In this study, we have collaborated with Drs. R. Hernández-Pando, E. Becerril, D. Aguilar, Wayne Meyers, Ana E. Kiszewski Bau and Ivonyr T. Abdel Kader.

The samples investigated in this investigation were collected in Benin. At the time of the investigation, there was no Ethical Committee from Benin, but the project had the approval and support of the Public Health Authorities from Benin.

At that time, surgery was accepted as the current definitive treatment of Buruli ulcer recommended by WHO [Buntine J and Crafts K, eds. Buruli Ulcer. Management of Mycobacterium ulcerans disease. A manual for health care professionals. WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.3].

Histopathologic examination of surgically excised tissues is one of the laboratory tests recommended by WHO to confirm Buruli ulcer [Portaels F, Johnson P and Meyers WM, eds. Buruli Ulcer. Diagnosis of Mycobacterium ulcerans disease. WHO/CDS/GBUI/2001.4].

On this account Dr. W.M. Meyers had received specimens from surgically excised tissue fixed in formalin.

Prof. Françoise Portaels



Documento 4



the AFIP
LETTER
<http://www.afip.org>

Armed Forces Institute of Pathology
Washington, DC 20306-6000

Vol. 164, No. 1—Winter 2006

CLICK • FOR LINKS TO:

- EDUCATION
- PUBLICATIONS
- 2006 FEE SCHEDULE

Wayne M. Meyers, MD, PhD, received the Government of Belgium Medallion of the Instituut voor Tropische Geneeskunde (ITG) (Institute of Tropical Medicine, Prince Leopold), for 35 years of collaboration in studies on diseases of



Africa, especially leprosy and Buruli ulcer. He received the award at the TUBA International Colloquium, "Improving Case Management and Control of Tuberculosis and Buruli Ulcer in Africa," Cotonou, Benin, December 2005. Dr. Meyers is currently a Visiting Scientist and Red Cross volunteer in the Department of Environmental and Infectious Disease Sciences. He retired from the AFIP in 2005.

Documento 5



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

A quem interessar possa:

28/Feb/2007

A quem interessar possa:

Declaro que por ocasião do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, realizado de 17-20 de novembro de 2003 (Florianópolis), levei na bagagem de mão parte do material do projeto de pesquisa "Resposta imunológica local na etapa ulcerativa da Doença de Buruli", desenvolvido em colaboração entre vários pesquisadores, incluindo R. Hernández-Pando, E. Becerril, D. Aguilar, Wayne Meyers, Ana E. Kiszewski Bau e Ivonyr T. Abdel Kader. No pré-Congresso ocorreu a reunião anual dos pesquisadores latinoamericanos em micobactérias, reunião a qual fui convidado a participar. Este material consistia de 22 blocos de parafina, com fragmentos de pele. Cabe mencionar que o material levado não oferece qualquer risco de contaminação, seja às pessoas ou ao meio ambiente. O material foi entregue em mãos à Dra Ana Elisa Kiszewski (colaboradora neste projeto). A troca desse tipo de material para pesquisa em encontros internacionais é uma prática freqüente e aceita pela comunidade científica internacional, sempre que são realizados trabalhos em colaboração de grupos de pesquisa.

Atentamente

Dr Rogelio Hernández Pando

Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología

Investigación

Tradicón Servicio

Asistencia Docencia

70007700

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C.P. 14000 México, D.F.
- Tel. 54-87-09-00

**11.3- ANEXO 3 - EXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-
BETA ISOFORMS AND THEIR RECEPTORS IN LEPROMATOUS AND
TUBERCULOID LEPROSY**

**11.4- ANEXO 4 - EXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE TYPE 2 IN
LEPROMATOUS AND TUBERCULOID LEPROSY LESIONS**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)