



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

CATIÚSSIA DANTAS PINHEIRO

**CÉLULAS CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD16+CD56+ E CD19+ EM SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM HANSENÍASE E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Fortaleza
2013

CATIÚSSIA DANTAS PINHEIRO

**CÉLULAS CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD16+CD56+ E CD19+ EM SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM HANSENÍASE E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

**Dissertação apresentada à
coordenação do curso de Pós-
graduação em Patologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau
Mestre em Patologia.**

Orientador:

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas

**Fortaleza
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P718c Pinheiro, Catiússia Dantas.
Células CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD16+CD56+ E CD19+ em sangue periférico de
pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis / Catiússia Dantas Pinheiro. – 2013.
73 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Patologia.

Orientação: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas.

1. Hanseníase. 2. Subpopulações de Linfócitos. 3. Imunofenotipagem. I. Título.

CDD 616.998

CATIÚSSIA DANTAS PINHEIRO

**CÉLULAS CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD16+CD56+ E CD19+ EM SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM HANSENÍASE E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada à
coordenação da Pós-graduação em
Patologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito para obtenção
do grau mestre em Patologia.

Aprovado em: __/__/__

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas (Orientador)
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr^a. Fabíola Fernandes Heredia
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr. José Walter Correia
Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
Universidade Estadual do Ceará-UECE

**Fortaleza
2013**

À Deus.

À minha mãe, meu exemplo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades a mim concedidas.

A meus pais, Luzia e José Írio, por me terem dado condições de me tornar a profissional e pessoa que sou.

À minhas irmãs, Samara e Litiane, que desde a aprovação na seleção do mestrado, vibraram comigo. Obrigada pelo incentivo e apoio!

A meu namorado Fred, por ser tão importante na minha vida. Com seu companheirismo, amizade, compreensão e apoio este trabalho foi melhor concretizado. Obrigada pela paciência nos momentos de inquietação e cansaço!

À minha família e amigos que torceram pelas minhas vitórias e fizeram parte destes momentos sempre me ajudando e incentivando.

Ao professor Doutor Max Victor, pela oportunidade de trabalhar a seu lado. Mesmo eu chegando sem me conhecer direito, abriu as portas para me receber.

Ao professor Doutor Ajax, por me ajudar na construção deste trabalho e por participar da minha banca de qualificação.

A Doutora Fabíola por aceitar participar da minha banca de defesa.

À Lívia Coelho e Kélvia Miranda pelo apoio e disponibilidade em me ajudar.

À minha turma do mestrado, onde conheci pessoas maravilhosas e vou sempre levar no meu coração.

À minha amiga Patrícia Luz, por ter me informado da inscrição da seleção do mestrado e ter me incentivado a fazê-la.

RESUMO

A hanseníase é uma doença granulomatosa, infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*. Trata-se de uma infecção crônica com amplo espectro de respostas imunes celulares em humanos. Possui alto poder infectante e baixo poder patogênico. Este estudo tem como objetivo quantificar e comparar leucócitos e subpopulações de linfócitos T totais (CD3⁺), T auxiliares (CD3⁺CD4⁺), T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), B (CD19⁺) e NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) em sangue periférico de indivíduos com hanseníase e controles saudáveis. Os pacientes foram provenientes do Centro de Dermatologia D. Libânia, Fortaleza-CE, Brasil. A determinação do número de linfócitos em cada subpopulação foi realizada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 5.0 para *Windows* com significância estabelecida para valores de $p < 0,05$. É um estudo do tipo caso controle de caráter observacional, realizado a partir da análise do sangue periférico de indivíduos com diagnóstico de hanseníase e de indivíduos saudáveis. A população de pacientes com hanseníase, sem tratamento foi composta de 15 pessoas. A população de controles saudáveis foi composta por 29 pessoas. As médias das contagens de Linfócitos NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 147(±113,4) e 378,1 (±231,7) respectivamente, $p = 0,0008$. As médias das contagens de Linfócitos B (CD19⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 233,3 (±85,89) e 115,3 (±53,01) , respectivamente, $p < 0,0001$. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre as amostras de leucócitos, de linfócitos T CD3⁺, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Os dados do presente estudo sinalizam que as células NK parecem desempenhar papel de relevância na resposta ao *M. leprae*. O linfócito B já ocupa papel de destaque na resposta imunológica ao *M. leprae*, sobretudo nas formas lepromatosas, e este estudo reforça a importância destas células.

Palavras-chaves: Hanseníase, subpopulações linfocitárias, sangue periférico, imunofenotipagem.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious and granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*. The aim of this study was to quantify and compare levels of leucocytes and lymphocyte subpopulations (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD3-CD16+CD56+) in peripheral blood of patients with leprosy and healthy controls. Patients were followed at Centro de Dermatologia D. Libânia, Fortaleza-CE, Brasil. Flow cytometry was used to determine numbers of lymphocytes. Statistical analysis was done with GraphPad Prism 5.0 software for windows. P values under 0.05 were considered significant. This was an observational case-control study. Fifteen leprosy patients without treatment were evaluated and 29 healthy individuals were included in control group. NK cells (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) mean in leprosy patients was 147(±113,4) and in controls was 378,1 (±231,7). Comparison established a p value of 0.0008. B lymphocytes (CD19+) mean in leprosy patients was 233,3 (±85,89) and in controls was 115,3 (±53,01), with p < 0,0001 . No differences were observed in CD3⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes. This study suggests that NK cells may play a role in innate response to *M. leprae*.

Keywords: Leprosy, lymphocyte subpopulation, peripheral blood, flow cytometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC do inglês: *Antigen- Presenting Cells* - células apresentadoras de antígenos

CDerm: Centro de Dermatologia D. Libânia

CD3⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 3*

CD4⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 4*

CD5⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 5*

CD8⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 8*

CD16⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 16*

CD19⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 19*

CD20⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 20*

CD22⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 22*

CD25⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 25*

CD56⁺ do inglês: *Cluster of differentiation 56*

CRP Proteína "C" reativa

DC do inglês: *Dendritic cells* - células dendríticas

EDTA Ácido Etilenodiamino-tetrácetico

ENH Eritema Nodoso Hansênico

IFN- γ Interferon gama

IL-1 Interleucina 1

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-5 Interleucina 5

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-13 Interleucina 13

IL-18 Interleucina 18

Linfócitos B linfócitos CD19⁺

Linfócitos T linfócitos CD3⁺

Linfócitos Th1 linfócitos T *helper* 1 ou T auxiliares 1

Linfócitos Th2 **linfócitos T *helper* 2** ou T auxiliares 2

Linfócitos NK **linfócitos *natural killer***

Linfócitos NKT **linfócitos T *natural killer***

MB **Multibacilar**

MDT- **Multidrogaterapia**

M. leprae ***Mycobacterium leprae***

OMS **Organização Mundial de Saúde**

PB **Paucibacilar**

PQT **Poliquimioterapia**

SIDA **Síndrome da Imunodeficiência Adquirida**

TLR do ingles: ***Toll-like receptor***

TNF- α **Fator de necrose tumoral- α**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estratégia de <i>gating</i> para determinação das subpopulações linfocitárias: linfócitos T totais, T citotóxicos e T auxiliares.....	35
Figura 2 – Estratégia de <i>gating</i> para determinação de subpopulações linfocitárias, NK e B.....	36
Gráfico 1 - Gênero dos pacientes com hanseníase e controles saudáveis.....	38
Gráfico 2 - Forma clínica do grupo de pacientes com hanseníase.....	39
Tabela 1 – Distribuição de pacientes segundo o número de leucócitos e subpopulações linfocitárias, em pessoas com hanseníase e controles saudáveis	40
Figura 3 - Média dos valores da contagem de leucócitos e subpopulações linfocitárias em pacientes com hanseníase e controles saudáveis.....	42
Gráfico 3- Faixa etária dos pacientes com hanseníase e controles saudáveis.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Doença.....	13
1.2	Epidemiologia	15
1.3	Formas Clínicas.....	15
1.4	Formas Reacionais.....	17
1.5	Diagnóstico.....	19
1.6	Tratamento.....	20
1.7	Tratamento das formas hansênicas.....	21
1.8	Imunologia.....	22
1.9	Linfócitos.....	24
1.10	Citometria de Fluxo.....	26
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Geral.....	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Identificação dos casos.....	32
3.1.1	<i>Critérios de inclusão</i>	32
3.1.2	<i>Critérios de exclusão</i>	32
3.2	Identificação dos controles.....	32
3.3	Aspectos Éticos.....	32
3.4	Coleta das amostras de sangue periférico dos pacientes.....	33
3.4.1	<i>Hemograma</i>	33
3.5	Pesquisa de leucócitos e subpopulações linfocitárias de sangue periférico por citometria de fluxo.....	33
3.5.1	<i>Aquisição</i>	33
3.5.2	<i>Estratégia de Gating</i>	34
3.6	36
4	Análise Estatística.....	37
4.1	RESULTADOS.....	38
4.2	Caracterização da Amostra.....	39
4.3	Comparação de leucócitos e subpopulações linfocitárias de grupos.....	42

5	de pacientes com hanseníase e controles saudáveis.....	44
6	Contagem da população de leucócitos e subpopulações linfocitárias	49
	DISCUSSÃO.....	51
		59
	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	
	APÊNDICES.....	
	ANEXOS.....	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença

A hanseníase é uma doença endêmica desde os tempos da pré-história. As referências mais antigas são de 600 a.C. Instalou-se de forma disseminada na Europa do século II ao século XIV. Houve rápido declínio, mas ainda existem casos isolados até hoje (DUNCAN et al., 2004). Acredita-se que é de origem africana ou asiática e que seja uma das mais antigas doenças que acomete a humanidade (EIDT, 2004).

No segundo século a.C. foram encontrados registros e descrições de hanseníase, em esqueletos no Egito (BRASIL, 1989). O livro Levítico, capítulo 13, do Antigo Testamento da Bíblia menciona orientações, cuidados e sinais para a identificação dos doentes, mas é difícil comprovar tratar-se de hanseníase (CUNHA, 2002).

Na Idade Média, período em que a doença teve alta incidência na Europa e Oriente Médio (EIDT, 2004), o nome lepra significava todas as lesões de pele, como queimações, escamações, escabiose, câncer de pele, lúpus, escarlatina, eczemas, sífilis e, também, a lepra verdadeira. Os doentes de hanseníase eram isolados da população e havia a realização de um ofício religioso em intenção (CUNHA, 2002). Logo após, os doentes eram excluídos da comunidade e passavam a morar em locais reservados para esse fim. Eram obrigados a usar, como vestimenta, um manto, um chapéu de abas largas e bermudões de cor escura; e, na túnica, traziam bordada a figura de São Lázaro. Usavam luvas e levavam, na mão ou preso ao corpo, um corno ou uma matraca de madeira, os quais faziam soar quando se aproximavam dos sadios (SARAIVA, 2002).

A hanseníase foi introduzida nas Américas com a chegada dos colonizadores europeus. A introdução da doença no novo continente coincide com o aumento da prevalência desta, na Espanha, durante os séculos XV e XVI (OPROMOLLA, 2000).

No Brasil, a introdução da doença ocorreu em vários pontos da costa do país, o que corresponde ao acompanhamento da infecção com o decorrer da colonização (EIDT, 2004). Anos depois, foi criado o primeiro Lazareto, abrigo para os doentes de Lázaro, lazarentos ou leprosos. Focos da doença foram identificados na Bahia e no Pará, o que levou as autoridades da Colônia a pedirem ajuda a

Portugal, mas não foram atendidos. Somente dois séculos depois, houve iniciativa para o combate à doença. No entanto, o controle limitou-se apenas à construção de abrigos e a cuidados precários aos doentes (SARAIVA, 2002).

A descrição dos primeiros casos da hanseníase no Brasil se deu na cidade do Rio de Janeiro, em 1600. Os dados mostravam a existência de 300 portadores desta doença. Com o desenvolvimento da agricultura, a necessidade de mão-de-obra e a ocupação do território brasileiro, a doença foi levada a outros estados como Paraíba, Alagoas, Ceará, Maranhão, Pará e Amazonas (EIDT, 2004).

A hanseníase é uma doença granulomatosa, infecto-contagiosa, lentamente progressiva (FOSS, 1997; BENNET *et al*, 2008). É causada pelo *Mycobacterium leprae*, descoberto e descrito por Gerhard H.A. Hansen em 1968, em Burgen, na Noruega (BATISTA *et al*, 2011).

Trata-se de uma infecção crônica que provoca uma grande variedade de respostas imunes celulares em humanos (SCOLLARD *et al*, 2006). É complicada pelo potencial intermitente de reações de hipersensibilidade (reações hansênicas) causadoras de muito sofrimento para o paciente. Todo o quadro clínico reflete a resposta imunológica individual à infecção pelo bacilo (LOCKWOOD, 2004; MOSCHELLA, 2004; LEITE, 2011). Quase todo o corpo pode ser acometido, sendo mais comum as extremidades e partes frias: braços, coxas, pernas, pés, testículos, câmara anterior dos olhos e nervos periféricos superficiais (BATISTA *et al*, 2011; MOSCHELLA, 2004).

O *M. leprae* é um bacilo que possui alto poder infectante e baixo poder patogênico. (ARAÚJO, 2003). A transmissão da hanseníase ainda é mal-compreendida. Sabe-se que os pacientes multibacilares não tratados são os principais responsáveis pela disseminação e transmissão do *M. leprae*, pois transportam uma alta carga bacteriana na sua pele e nas vias aéreas (JOB *et al*, 2008; MARTINS, *et al*, 2012).

Uma das características importantes da doença é o comprometimento dos nervos periféricos, que pode levar a incapacidades físicas e evoluir para deformidades. As consequências das incapacidades e deformidades são redução da capacidade de trabalho, limitação da vida social e problemas psicológicos, além do estigma e preconceito contra a doença (BRASIL, 2002).

1.2 Epidemiologia

No mundo, em 2011, foram detectados 219.075 casos novos de hanseníase. Nas Américas, 36.832 casos novos, sendo o Brasil o principal responsável, com 33.955, ficando em segundo lugar no mundo em número de casos. Estão sendo adotadas estratégias globais para a redução da hanseníase. Existem programas nacionais em países onde a doença é endêmica. A estratégia visa reduzir a taxa de casos novos com algum grau de incapacidade física em todo mundo, até o final de 2015 (OMS, 2012).

No Ceará, foram diagnosticados 2.066 casos novos de hanseníase em 2012. Foi realizada uma intensificação da vigilância epidemiológica nas áreas mais endêmicas. Ao diagnóstico, 7,8% dos pacientes apresentaram algum grau de incapacidade física, em 2012. A faixa etária mais acometida é a de maior de 20 a mais de 50 anos de idade, sendo esta a população economicamente ativa. Em 2012, 90,6% (1.872) dos casos foram notificados com a faixa etária de 20 a 50 anos de idade, sendo a população economicamente ativa. Diante desta informação, percebe-se a importância da detecção precoce da doença, cuja ação tempestiva, possibilitará a redução de sequelas e incapacidade física (CEARÁ, 2013).

Os municípios do Ceará que apresentaram maior número de casos novos foram: Fortaleza (611), Juazeiro do Norte (114), Sobral (91), Iguatu (67) e Maracanaú (65) (CEARÁ, 2013).

1.3 Formas Clínicas

Adotam-se as classificações de Madri e a de Ridley-Jopling para fins clínico-imunológicas e uma classificação para efeitos operacionais, utilizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011; ARAÚJO, 2003).

A classificação de Madri de 1953 adota critérios de polaridade, com base nos aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase (ORSINI, *et al*, 2008) São classificados como grupos polares estáveis e opostos, Tuberculóide (T) e Virchowiano (V) ou Lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma Indeterminada (I) e o grupo instável e intermediário, a forma

Borderline (B) ou Dimorfa (D) que caminharia para um dos pólos, na evolução natural da doença (SOUZA, 1997; ARAÚJO, 2003).

A classificação de Ridley-Jopling é utilizada com base na resposta imunológica ao *M. leprae* (MOSCHELA, 2004). Adota-se subgrupos dentro do espectro obedecendo critérios clínicos e bacteriológicos, com ênfase nos aspectos imunológicos e histopatológicos (ARAÚJO, 2003). Nesta classificação não se inclui a forma indeterminada e torna-se necessário o exame histopatológico para sua utilização. São descritas as formas Tuberculóide (TT), Virchowiana (VV) e os três subgrupos intermediários, *Borderline*-Tuberculóide (BT), *Borderline - Borderline* (BB) e *Borderline -Virchowiano* (BV) (SOUZA, 1997; ARAÚJO, 2003).

No Brasil, o Ministério da Saúde adota uma classificação operacional para fins de tratamento, como Paucibacilares (PB) nos casos com até cinco lesões de pele e/ou um tronco nervoso comprometido e Multibacilares (MB) nos casos com mais de cinco lesões de pele e/ou mais de um tronco nervoso acometido (BRASIL, 2011; CORREA *et al*, 2012).

A hanseníase tuberculóide caracteriza-se por apresentar lesões em placas na pele bem delimitadas com bordas papulosas em número bem reduzido. São lesões eritematosas ou hipocrômicas com queda de pêlos e alteração da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2011, SOUZA, 1997). Além da pele, pode haver o envolvimento de troncos nervosos em pequeno número, geralmente, próximo às lesões cutâneas (CHACHA, *et al*, 2009; SOUZA, 1997).

O grupo Dimorfo da hanseníase é complexo e tem caráter instável. Devido a sua instabilidade imunológica, apresenta uma grande variação em suas manifestações clínicas, sejam na pele, nos nervos, ou no comprometimento sistêmico (GOULART, PENNA, CUNHA, 2002; HINRISCHISEN, 2004).

No aspecto clinicodermatológico do paciente, a forma dimorfa aproxima-se do polo virchowiano ou tuberculóide, onde reflete a instabilidade imunológica (ARAÚJO, 2003). A hanseníase dimorfa-virchowiana manifesta-se com muitas lesões e com aspectos diversos como infiltração, nódulos e placas (algumas com a região central normal e bordas externas mal-definidas) (MATSUO *et al*, 2010). As lesões neurais são precoces, assimétricas e, geralmente, levam a incapacidades físicas (ARAÚJO, 2003). A baciloscopia de raspado intradérmico pode ser positivo ou negativo (BRASIL, 2010).

A hanseníase, no pólo virchowiano, expressa a forma clínica de suscetibilidade do bacilo, resultando em multiplicação e disseminação da doença. Manifesta-se em indivíduos com imunidade celular deprimida ao *M. leprae* (SOUZA, 1997). Os pacientes de hanseníase virchowiana têm uma elevada carga do bacilo nas biópsias de pele (MISCH, 2008). A baciloscopia de raspado intradérmico é fortemente positiva (BRASIL, 2010). A doença pode evoluir com infiltração progressiva e difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo comprometer linfonodos, fígado e baço. Na pele descrevem-se mácula, pápulas e nódulos com infiltrações mais acentuadas na face e membros com perda de pelos (madarose). Há comprometimento neural em troncos nervosos em ramos da pele e inervação vascular (ARAÚJO, 2003).

1.4 Formas Reacionais

As reações hansênicas são fenômenos de hipersensibilidade a antígenos de *M. leprae* e decorrem do processo imunológico acompanhado do aumento de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, além de imunocomplexos (TEIXEIRA, *et al*, 2010).

Correspondem a exacerbação da imunidade celular com episódios agudos inflamatórios no curso natural da doença, durante o tratamento ou após, quando o paciente já é considerado curado sob o ponto de vista bacteriológico (GOULART, *et al*, 2002; ARAÚJO, 2003). Essas reações são as principais causas de incapacidades (GOMES, *et al*, 2005).

Existem duas categorias principais de reações da hanseníase: reação tipo 1, também chamada de reação reversa (RR), quando está envolvida a imunidade celular e a reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), com participação efetiva da imunidade humoral (MOSCHELA, 2004; TEIXEIRA, *et al*, 2010).

As reações tipo 1 são episódios recorrentes, geralmente, devido ao aumento da imunidade mediada por células contra antígenos no *M. leprae* (MANANDHAR, *et al*, 2002). Acometem cerca de 10 a 33% dos hansênicos. Na maioria dos casos, surgem durante o tratamento ou após o primeiro ano de alta. Pode estar presente em paciente paucibacilares e multibacilares (TEIXEIRA, *et al*, 2010).

O exame histopatológico demonstra a expansão do granuloma com presença de edema intraneural e um influxo de células CD4⁺ positivas (ORSINI, *et al*, 2008. PIMENTEL, *et al*, 2004). As lesões pré-existentes tornam-se eritematosas, violáceas, sensíveis, intumescidas, elevadas, e máculas tornam-se pápulas que podem ulcerar (WALKER, *et al*, 2008; ORSINI, *et al*, 2008). Podem surgir sintomas sistêmicos como mal-estar e febre (TEIXEIRA, *et al*, 2010).

Na reação tipo 1 é comum o comprometimento neural, por vezes, acentuado e grave, podendo haver perda de função e paralisia. Os nervos comprometidos apresentam graus variáveis de dor com aumento da sensibilidade local (SOUZA, 1997). A neurite pura ou isolada é considerada como reação tipo 1. Pode ser ascendente, quando há o aumento da imunidade específica ou descendente quando há queda da imunidade e a expansão clínica é semelhante (TEIXEIRA, *et al*, 2010).

A reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) representa uma importante causa de morbidade e incapacidade física em pacientes dimorfos-virchowianos e virchowianos-virchowianos. Esta reação acomete somente pacientes multibacilares (ORSINI, *et al*, 2007). O ENH é uma complicação comum em cerca de 50% dos pacientes com a forma virchowiana (LOCKWOOD, 2004).

É caracterizada por uma reação imunológica com deposição de imunocomplexos no sangue, tecidos e vasos linfáticos dando origem a focos inflamatórios agudos (MOSCHELA, 2004). Alguns relatos confirmam a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β no soro de pacientes com ENH (PINHEIRO, 2011). Durante este estado reacional tipo ENH, foi observado o aumento da produção de TNF- α associado a elevação dos níveis de Proteína-C-Reativa (PCR). Assim sugere que o TNF- α uma proteína inflamatória, atue no aumento dos níveis de PCR, favorecendo o aparecimento de sintomas do surto reacional (FOSS, 1997; BALAGON, 2010).

Na reação tipo 2 ou ENH ocorre o aparecimento de nódulos eritematosos dérmicos e cutâneos, dolorosos, na pele aparentemente íntegra. São frequentemente acompanhados de sintomas sistêmicos como febre, mal-estar, perda de peso, anorexia, artralgia, edema. É comum apresentar-se em múltiplos episódios (TEIXEIRA, *et al*, 2010; MATOS, 2007). Pode haver processos inflamatórios em outros sistemas causando orquite, artrite, neurite, dentre outras (POCATERRA, 2006).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de hanseníase é essencialmente clínico (anamnese, inspeção e pesquisa de sensibilidade) e auxiliado por exames complementares (PINHEIRO, 2011; BRASIL, 2008). Os testes laboratoriais para hanseníase incluem a baciloscopia, baseada na detecção de bacilos álcool-ácidos resistentes em esfregaços de linfa e em biópsias de lesões de pele (MOSCHELA, 2004; PINHEIRO, 2011).

A baciloscopia é o exame complementar mais útil no diagnóstico da hanseníase, pois é de fácil execução e de baixo custo (ARAÚJO, 2003). Quando é possível ser realizado, é utilizado para classificar os casos em paucibacilares ou multibacilares. Este exame é um dos parâmetros integrantes da definição de caso. Ratifica-se que o diagnóstico da hanseníase é clínico. Quando a baciloscopia estiver disponível e for realizada, não se deve esperar o resultado para iniciar o tratamento do paciente (BRASIL, 2002). Quando o resultado for positivo, independente do número de lesões, classifica-se como MB. Quando negativo, não exclui o diagnóstico de hanseníase (BRASIL, 2010).

O exame histopatológico pode ser necessário nos casos em que há dúvidas no diagnóstico ou na classificação. Quando existe dúvida no diagnóstico diferencial com outras neuropatias, indica-se a biópsia do nervo (ARAÚJO, 2003).

Nos estados reacionais, o diagnóstico é realizado através do exame físico geral e dermatoneurológico do paciente. É importante diagnosticar as reações precocemente visando iniciar de imediato o tratamento e assim, prevenir incapacidades (BRASIL, 2010).

É indispensável a avaliação da função neural e o grau de incapacidade no momento do diagnóstico da hanseníase e de suas reações (BRASIL, 2011). Nos exames neurológicos de rotina e na vigência de neurites, os nervos periféricos que devem ser avaliados são o mediano, ulnar, cutâneo radial, radial, cervical, supraorbicular, auricular, tibial posterior. Estes podem apresentar como sintomas mais comuns o fibrosamento, dor espontânea ou ao toque, exarcebação da sensibilidade local e/ou territorial, evolução para o comprometimento sensitivo-motor

e perda da função, podendo haver paralisia súbita (SOUZA, 1997; WEN, WANG, 2012).

1.6 Tratamento

Como tratamento da hanseníase, em 1981, a OMS recomendou a poliquimioterapia (PQT) ou multidrogaterapia regular (MDT-R). Com a introdução deste esquema, foi proposto o uso de várias drogas com o objetivo de evitar o surgimento de resistência do *M. leprae* a dapsona (MOSCHELA, 2004). Foi mantida a rifampicina, droga fortemente bactericida, em todos os regimes terapêuticos, mesmo sendo tomada uma vez por mês, e duas drogas consideradas bacteriostáticas : dapsona e clofazimina (ORSINI, 2008).

O tratamento da hanseníase é realizado em caráter ambulatorial. Para crianças, a dose dos medicamentos do esquema padrão é ajustada de acordo com o peso e a idade. No caso de pessoas com intolerância a um dos medicamentos do esquema padrão, são indicados esquemas alternativos (BRASIL, 2002).

Nos casos PB é realizada a dose supervisionada de rifampicina 600mg mensal, dapsona 100mg também supervisionada e em dose de 100mg diária autoadministrada. O tratamento consiste de seis doses supervisionadas em um período de até nove meses.

Diante dos casos de hanseníase MB é feita a dose mensal supervisionada de rifampicina 600mg e dapsona 100mg sob supervisão e uma dose diária de 100mg autoadministrada. Também é realizada uma dose supervisionada mensal de clofazimina e 50mg autoadministrada diariamente. O tratamento conclui-se com 12 doses supervisionadas no prazo de 18 meses. Na última dose, os pacientes são submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica e o grau de incapacidades físicas.

A OMS tem explorado as possíveis formas de introduzir um esquema terapêutico uniforme curto para todos os pacientes de hanseníase, chamado Multidrogaterapia Uniforme, MDT-U, substituindo a atual MDT-R. O esquema uniforme simplificaria e reduziria pela metade a duração do tratamento para os pacientes MB de forma a melhorar a adesão à terapia e os efeitos adversos relacionados aos fármacos utilizados. (BENERJEE, 1997; GONÇALVEZ, 2010).

Há evidências de que houve ação bactericida do MDT sobre *M. leprae* em ratos, reduzindo- 99,9% a viabilidade do bacilo após quatro semanas de tratamento (BENERJEE, 1997).

O Ministério da Saúde vem desenvolvendo um estudo que visa avaliar a efetividade da MDT-U em alguns centros de referência em dermatologia no Brasil e o Centro de Dermatologia Dona Libânia (CDerm) está inserido nesse estudo.

Os pacientes que procuram o serviço de dermatologia do CDerm e têm diagnóstico confirmado de hanseníase são convidados a participar do estudo MDT-U e são acompanhados desde o início do tratamento até cinco anos após a alta. No sexto mês de MDT o paciente é enquadrado de forma aleatória em um dos grupos que fará o tratamento: convencional (12 meses) ou o experimental (6 meses).

Durante a terapia, o paciente é acompanhado mensalmente e após a alta medicamentosa, anualmente. Ele é orientado sobre os efeitos adversos dos fármacos, os sintomas da doença e das formas reacionais. Se houver suspeita de reação hansênica em qualquer período do acompanhamento o paciente pode retornar ao CDerm para avaliação do problema, pedido de exames e instituição da terapia adequada.

1.7 Tratamento das formas hansênicas

O tratamento das reações é destinados controlar a inflamação aguda, aliviar a dor e reduzir danos aos nervos (PINHEIRO, 2011).

No tratamento das reações tipo 1 ou reações reversas são utilizados analgésicos ou antiinflamatórios não hormonais (AINES) quando o quadro clínico for discreto e sem neurites (PRASAD, *et al*, 2010). Os pacientes com neurites, placas reacionais extensas sobre trajeto nervoso e apresentando risco de ulceração devem receber prednisona na dose de 1 a 2mg/kg/dia até a regressão do quadro (WALKER *et al*, 2011). O uso da talidomida é uma alternativa à terapia com esteróides proporcionando melhor controle a longo prazo e evitando efeitos adversos da terapia com esteróides (PRASAD, *et al*, 2010).

A imobilização do membro afetado pela neurite, fisioterapia e intervenções cirúrgicas nos casos de neurites refratárias aos corticóides também são medidas complementares (BRASIL, 2010; ARAÚJO, 2003).

Na reação tipo 2 ou ENH é utilizada a talidomida. Embora apresente muita eficácia, tem efeito teratogênico quando tomada no início da gravidez, ficando proibida sua utilização em muitos países (MATOS, 2007).

A talidomida é considerada a droga de escolha na dose de 100 a 400mg/kg/dia (BRASIL, 2010). Alguns dos mecanismos descritos da talidomida envolvem a diminuição da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (PINHEIRO, 2011). A clofazimina, pela sua ação anti-inflamatória é útil como droga alternativa à talidomida, no ENH em associação aos corticosteroides (GONÇALVES, 2010).

1.8 Imunologia

A resposta imunológica da hanseníase é dividida esquematicamente em atividade imunológica mediada por células e humoral (BRIGHTBILL, 1999). Experimentalmente, as formas polares da doença estão de acordo com a resposta que cada indivíduo desenvolve diante do *M. leprae* (MODLIN, 2010). As apresentações clínicas variam de resposta imunológica mediada por células ao *M. leprae*, com padrão Th1 no polo tuberculóide, a uma ausência de resposta celular específica ao bacilo no polo lepromatoso, predominando a resposta Th2 e exacerbação da resposta humoral (ANDERSSON, 2005; SARNO, 1991).

A capacidade do hospedeiro reconhecer patógenos é uma característica da imunidade inata e é mediada por receptores de reconhecimento de padrões que identificam várias classes moleculares de micobactérias (MENDONÇA, 2008; KANG, *et al*, 2004). Um exemplo desse tipo de receptores é o receptor *toll like* (TRL), fundamental para reconhecimento dos patógenos pelos macrófagos e células dendríticas (KRUTGIK, 2005; BRIGHTBILL, 1999). No caso do *M. leprae*, ocorre principalmente através do heterodímero TLR2-TLR1 e leva a diferenciação de monócitos e células dendríticas. Estas últimas apresentam o antígeno e causam a ativação de células T virgens através da secreção de IL-12, citocina pró-inflamatória (WALKER, 2006).

Os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes para o reconhecimento de micobactérias (MENDONÇA, 2008). Nas lesões localizadas de pacientes hansenícos com a forma TT, os TLR1 e TLR2 estão expressos mais

fortemente quando comparados às lesões disseminadas dos pacientes VV (MODLIN, 2010).

No local da infecção, as células dendríticas (DCs) são as primeiras células a capturarem o *M. leprae*. São produzidas IL-10 e IL-12, fundamentais no direcionamento da resposta Th1 ou Th2 contra o bacilo (MIRA et al, 2004). As DCs são caracterizadas por uma elevada capacidade de captura de antígeno, porém com baixa ativação sobre células T (BARKER, 2006).

A hanseníase apresenta um espectro clínico correlacionado ao tipo de resposta imunitária ao patógeno. Na forma TT, os doentes apresentam relativa resistência ao patógeno, a infecção é localizada e as lesões são caracterizadas pela expressão de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ), resultando em uma resposta imunológica mediada por célula (MODLIN, 2010; MARTINS, 2012). No polo oposto, os hanseníacos com a forma LL apresentam susceptibilidade ao *M. leprae*, a infecção é disseminada e as lesões caracterizam-se pela expressão de citocinas Th2 (IL-4), resposta humoral (STEFANI, 2009; KRUTGIK, 2005). Nesta forma da hanseníase, as lesões são caracterizadas por células T CD4⁺ reduzidas e células T CD8⁺ numerosas (MISCH, 2008).

Tem sido observado que pacientes com hanseníase na forma lepromatosa e dimorfa-lepromatosa cursam, em sua evolução, com elevadas concentrações de anticorpos no soro, sobretudo anticorpos específicos contra *M. leprae*, como o anti-PGL1, associado com a depressão da imunidade celular (FOSS, 1997).

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é um componente da parede celular exclusivo do *M. leprae* (SILVA, et al, 2009). Constitui cerca de 2% da massa total bacteriana. Pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares (FOSS, 1997). Testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos IgM contra PGL-1 têm sido usados como possibilidade de estudo do comportamento epidemiológico da hanseníase (MOURA, et al, 2008).

1.9 Linfócitos

Linfócitos são células agranulócitas encontradas no sangue, no tecido linfóide e, virtualmente, em todos os órgãos. Expressam receptores para antígenos e medeiam respostas imunes. Dentre os linfócitos incluem-se as células T, B e *natural Killer* (NK) (ABBAS, et al, 2012). Os linfócitos T são responsáveis, principalmente, pelo auxílio do sistema imunitário e resposta imunológica celular (ANTAS, et al, 2004). O linfócito B é responsável pela resposta imune humoral, e os NKs pela resposta imunitária inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, assim como células tumorais (CRUVINEL, et al, 2010). O linfócitos T e B produzem respostas imunitárias específicas, pois ambos são estimuladas a partir de epítopos de antígenos específicos (ROITT, et al., 2001; CRUVINEL, et al, 2010).

No combate a infecção, as células T migram de seu local de ativação para o local da doença, normalmente tecidos periféricos. O antígeno linfocitário cutâneo (CLA) é um receptor *homing* expresso em células T que infiltram em locais de inflamação na pele. Supõe-se que o CLA pode ter papel na migração dos subconjuntos de células T em lesões da hanseníase (SIELING, et al, 1999).

O receptor que reconhece o complexo peptídeo MHC é chamado de receptor de células T (TCR). Este receptor é distribuído em clones de células T que apresentam diferentes especificidades, expressando distintos TCRs. Os sinais bioquímicos que são gerados nas células T pelo reconhecimento do antígeno são transduzidos por proteínas invariáveis chamadas CD3, que são ligadas, de forma não covalente, ao receptor do antígeno para formar o complexo TCR (ABBAS et al, 2012).

Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) reconhecem peptídeos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I presente na maioria das células nucleadas. Esses linfócitos têm como principal mecanismo atacar as células infectadas e induzir a apoptose através da liberação de granzimas e perforinas ou pela indução da expressão de receptores de morte (LEE, et al, 2003). Além disso, as células T CD8⁺ secretam citocinas como o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF), os quais aumentam a apresentação de antígenos e podem mediar efeitos anti-patógenos, interferindo tanto na replicação bacteriana quanto na viral (ANTAS, et al, 2004).

As células T helper (CD4⁺) reconhecem peptídeos ligados ao MHC classe II nas células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas

(DCs), macrófagos e células B (LEE, et al, 2003; MUKAI, et al, 2009). Esses linfócitos T CD4⁺ são especializados em enviar sinais, através de citocinas e interações celulares, a outras células do sistema imunológico, como macrófagos, células B e células T CD8⁺ (SCHEPERS; ARENS; SCHUMACHER, 2005).

As células NK são definidas pela sua expressão de CD56 e ausência de expressão de CD3 (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001). Desempenham um papel importante na resposta imunológica contra tumores, vírus, bactérias e parasitas intracelulares (RAMOTHEA, et al, 2005). Com o advento dos anticorpos monoclonais para marcadores específicos de células NK, reconheceu-se que populações NK poderiam ser identificadas com base em sua densidade de CD56 na superfície celular (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001).

Quando as NKs são ativadas, lisam células infectadas e tumorais, secretam citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-2 e INF- γ . A citólise mediada por NKs ocorrem pela ação das perforinas e granzimas, desencadeando morte por apoptose (CRUVINEL, et al, 2010).

As células NK humanas têm sido definidas com base na expressão de CD16 e CD56. Suas duas principais populações foram identificadas como subpopulação de células CD16^{bright} CD56^{dim} que compõem 90% da população total e uma pequena população de CD16^{-/dim} CD56^{bright} compreende cerca de 10% da população total (RAMOTHEA, et al, 2005). Células NK do sangue periférico foram caracterizadas por apresentarem papéis distintos. A maioria destas células apresentam fraca expressão de CD56 (CD56^{dim}) e forte expressão de CD16 (CD16^{bright}). O subconjunto de NK CD56^{bright} (presentes nos gânglios linfáticos), expressa receptores de IL-2 e produz citocinas imunorreguladoras (FERLAZZO et al. 2004). Cerca de 10% das células NK são CD56^{bright} CD16^{dim}, ou seja, apresentam forte expressão de CD56 e fraca expressão de CD16. (RAMOTHEA, et al, 2005). As células NK CD16^{bright} representam o subconjunto mais citotóxico por apresentarem o poder de lisar células alvo na ausência de estímulo prévio e sem a necessidade de reconhecimento de anticorpos (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; FEHNIGER et al, 2003).

Leucócitos de regulação como CD4⁺CD25⁺, DCs e células NKT invariantes (iNKT) podem desempenhar um papel importante no controle e erradicação do *M. leprae*. Células CD1d-restritas são um subconjunto de iNKT que expressam um receptor TCR de cadeia α (V α 24-J α 10) em seres humanos. Células

iNKTs são CD4⁺ e estão associadas com a produção predominante de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 (IM, *et al*, 2008)

A maturação dos linfócitos T helper ocorre na zona T dos linfonodos. Na zona folicular desses linfonodos, os linfócitos B capturam antígenos através de receptores de células B, os quais são ativados e internalizados. Daí há o processamento e apresentação de peptídeos ao MHC classe II (MCHEYZER-WILLIAMS, 2005). A maioria dos linfócitos B expressa as proteínas de classe II do MHC, importantes na cooperação célula T – célula B. Os marcadores de superfície CD19, CD20 e CD22 são os mais usados para identificar linhagem de células B (FISCHER; SCROFERNEKER, 2007).

Ilhan *et al*, 2007, observaram aumento significativo de linfócitos B1 CD19⁺CD5⁻ e CD19⁺CD5⁻ em pacientes com hanseníase virchowiana, quando comparados a indivíduos normais.

1.10 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar diferentes populações celulares através da caracterização de vários parâmetros como tamanho, granulosidade e presença de antígenos específicos. Ela é capaz de identificar tanto antígenos de superfície como citoplasmáticos, avaliar a quantidade e qualidade do DNA e realizar avaliação funcional (OWENS *et al.*, 2000) .

Uma das principais aplicações da citometria de fluxo é a imunofenotipagem, que é a identificação e quantificação de antígenos celulares através de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. Essa técnica pode ser feita em células sanguíneas, medulares ou tumorais (FAILACE, 2003) além de células teciduais em suspensão (DATH *et al.*, 2011).

A imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo vem sendo realizada para diagnóstico, acompanhamento clínico e melhor entendimento sobre o comportamento imunológico de inúmeras doenças como a SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) (AUTISSIER *et al.*, 2010; WEBSTER; JOHNSON, 2005), leucemia mieloide aguda (SCHWONZEN *et al*, 2007), linfoma angioimunoblástico de células T (LEE; LIN; CHUANG, 2003), síndrome

mielodisplásica (KERN, 2010) e até mesmo em hematologia veterinária (NAKAGE *et al.*, 2005).

A identificação é possível através da ligação das células de interesse com anticorpos ligados a diferentes fluorocromos que, após a excitação por laser, emitem fótons que são detectados e transmitidos ao computador de forma que as células ficam agrupadas de acordo com a granulosidade, o tamanho e os antígenos ligados. A habilidade de medir múltiplos parâmetros é limitada pelo número de fluorocromos que são utilizados simultaneamente (BAUMGARTH; ROEDERER, 2000).

Poucos estudos avaliaram subpopulações linfocitárias em hanseníase. Recentemente, Solon, 2012, utilizando citometria de fluxo, descreveu subpopulações linfocitárias em sangue periférico de pacientes com hanseníase e com formas reacionais desta doença. Foi observada uma redução na população de células NK ($CD3^+CD16^+CD56^+$) na hanseníase, antes de qualquer intervenção terapêutica. Após o tratamento da hanseníase, houve uma recuperação na contagem desta população celular, enquanto as outras subpopulações: linfócitos T totais ($CD3^+$), T auxiliares ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$), T ($CD4^+CD8^+$), B ($CD19^+$), e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) mantiveram-se inalteradas. No entanto, até o presente momento não há estudos que avaliem essas células em pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Comparar a quantidade de leucócitos e subpopulações linfocitárias em sangue periférico de indivíduos com hanseníase virgem de tratamento e controles saudáveis.

2.2 Objetivos Específicos:

- Quantificar leucócitos e subpopulações de linfócitos T totais (CD3⁺), T auxiliares (CD3⁺CD4⁺), T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), B (CD19⁺) e NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) em sangue periférico de indivíduos com hanseníase e controles saudáveis.
- Comparar os leucócitos e as subpopulações de linfócitos T totais (CD3⁺), T auxiliares (CD3⁺CD4⁺), T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), B (CD19⁺) e NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) em sangue periférico de indivíduos com hanseníase e controles saudáveis.
- Comparar os leucócitos e as subpopulações de linfócitos T totais (CD3⁺), T auxiliares (CD3⁺CD4⁺), T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺), B (CD19⁺) e NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) em sangue periférico de indivíduos com hanseníase de acordo com a forma clínica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

É um estudo do tipo caso controle de caráter observacional, realizado a partir da análise do sangue periférico de indivíduos com diagnóstico de hanseníase, sem tratamento prévio e indivíduos saudáveis.

3.1 Identificação dos casos

3.1.1 Critérios de inclusão

- Diagnóstico de hanseníase segundo avaliação clínica e laboratorial por especialista em unidade de referência em tratamento de hanseníase;
- Idade maior que 18 anos.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Forma clínica neural pura;
- Tratamento anterior de hanseníase há menos de 5 anos;
- Associação com outras doenças graves (HIV/AIDS, tuberculose, malária, leishmaniose tegumentar, calazar, doenças mieloproliferativas e linfoproliferativas ou uso de imunossupressores);
- Dificuldades por parte do paciente de compreender e cooperar com os procedimentos do estudo.

3.2 Identificação dos controles

Para a formação do grupo controle foram selecionados 29 indivíduos de forma aleatória, que fossem saudáveis, tendo sido avaliados para várias doenças e infecções crônicas.

3.3 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa do Centro de dermatologia D. Libânia e aprovado sob o número 011/07 (Anexo).

3.4 Coleta das amostras de sangue periférico dos pacientes

As coletas foram realizadas no CDerm entre os meses de janeiro e junho de 2011 nos dias que os pacientes tinham consultas médicas de acompanhamento da hanseníase.

As amostras de sangue venoso de cada paciente foram colhidas em dois tubos BD Vacutainer[®] com anticoagulante EDTA. Um tubo foi utilizado para a realização do hemograma no próprio CDerm e o outro foi armazenado em temperatura ambiente (20-25 °C) e processado em até 24 horas após coleta no Laboratório de Imunofenotipagem da Faculdade de Medicina da UFC, onde era feita a citometria de fluxo.

3.4.1 Hemograma

O hemograma era realizado no dia da coleta utilizando o aparelho Mindray BC-5380 (Hamburgo, Alemanha) do qual foram coletados os dados referentes ao eritrograma, plaquetograma e leucograma.

3.5 Identificação de subpopulações linfocitárias de sangue periférico por citometria de fluxo

3.5.1 Aquisição

As amostras que chegavam ao Laboratório de Imunofenotipagem da Faculdade de Medicina da UFC foram numeradas para identificação e realização da citometria de fluxo.

Para cada amostra foram identificados dois tubos (1 e 2) em que se adicionavam 10 µL de cada combinação de anticorpos monoclonais adequados. A

análise das células T era feita com o Multiset 1 (CD3/CD8/CD45/CD4) e a de células B e NK com o Multiset 2 (CD3/CD16CD56/CD45/CD19), ambos reagentes da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). Os anticorpos monoclonais foram conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5) ou Alofococianina (APC), respectivamente.

Em seguidas foram adicionados 50µL de sangue em cada tubo e homogeneizado no vórtex. Os tubos foram incubados por quinze minutos em temperatura ambiente no escuro. Para a lise das hemácias foram acrescentados 450µL da solução de lise *FACS lysing solution* (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) em cada tubo e homogeneizados novamente no vórtex, incubados por quinze minutos em temperatura ambiente no escuro.

Após a preparação, o material foi imediatamente analisado em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos na *gating* de linfócitos para cada tubo.

3.5.2 Estratégia de Gating

A estratégia de *gating* partiu da identificação dos linfócitos totais do sangue periférico, por meio da determinação da região em que há forte expressão do CD45⁺ e baixa complexidade interna (*side scatter*-SSC) (Figura 1, item a). Em seguida, as subpopulações de linfócitos T foram distinguidas, tomando por base a combinação de expressão dos antígenos CD3⁺/CD4⁺ (linfócitos T auxiliares) e CD3⁺/CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) (Figura 1, itens b; c). Os linfócitos T foram determinados pela expressão positiva de CD3 (Figura 1, item d). A população NK (*natural killer*) foi determinada pela combinação de expressão dos antígenos CD3⁻/CD16⁺CD56⁺ (Figura 2, item b). Os linfócitos B foram determinados pela expressão positiva de CD19 (Figura 2, item c).

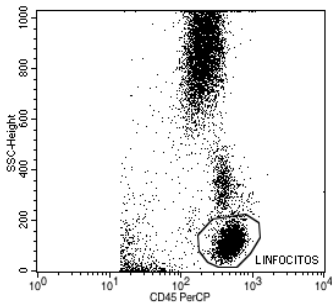
A fórmula utilizada para o cálculo do valor absoluto das subpopulações linfocitárias foi:

$$N^{\circ} \text{ células/mm}^3 = N^{\circ} \text{ de leucócitos (mm}^3) \times \frac{(\% \text{ linfócitos})}{100} \times \frac{(\% \text{ CD})}{100}$$

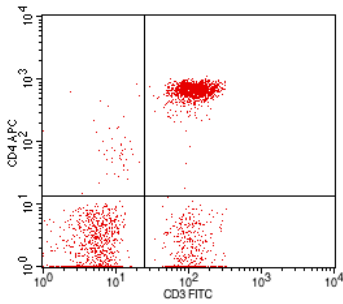
em que N^o leucócitos e % linfócitos foram retirados do hemograma e CD (subpopulação de linfócitos específica) foi obtida do resultado da citometria.

FIGURA 1 - Estratégia de *gating* para determinação das subpopulações linfocitárias: linfócitos T totais, T citotóxicos e T auxiliares.

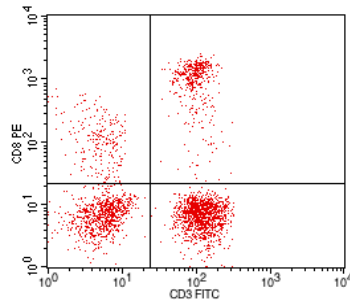
a)



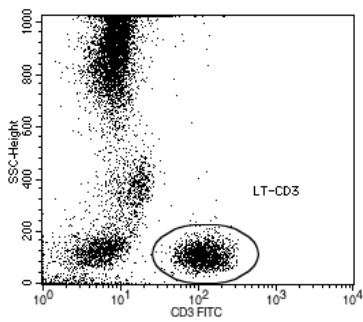
b)



c)



d)

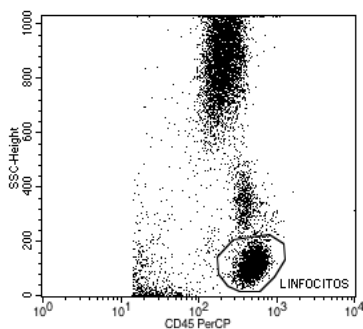


Fonte: Arquivos do Laboratório de Imunofenotipagem da UFC

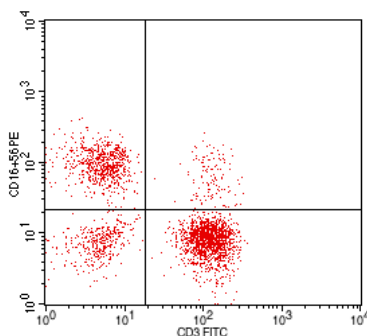
a) Seleção de *gate* contendo apenas linfócitos b) linfócitos T auxiliares ($CD3^+/CD4^+$), c) linfócitos T citotóxicos ($CD3^+/CD8^+$), d) linfócitos T totais ($CD3^+$).

FIGURA 2 - Estratégia de *gating* para determinação de subpopulações linfocitárias NK e B.

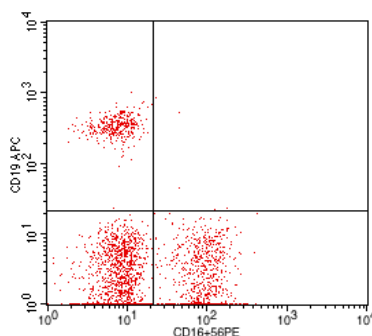
a)



b)



c)



Fonte: Arquivos do Laboratório de Imunofenotipagem da UFC.

a) Seleção de *gate* contendo apenas linfócitos b) NK ($CD3^-/CD16^+CD56^+$) e c) linfócitos B ($CD19^+$).

3.6 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa GraphPad Prism 5.0 para Windows. Para verificar se os dados (valores) obtidos tinham uma distribuição normal foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os valores foram apresentados com média e desvio padrão. Para verificar se havia uma diferença entre os dados (valores) de cada tipo celular, entre os grupos de pacientes e controles, foi utilizado o teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

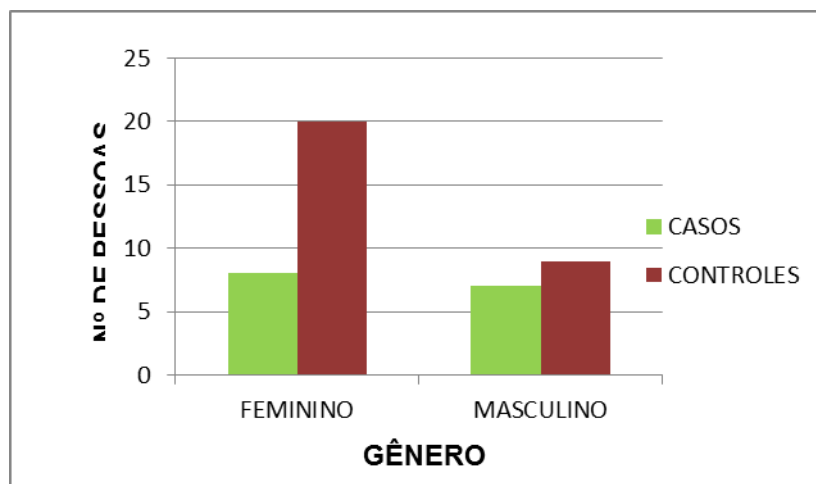
4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

A população de pacientes com hanseníase, sem tratamento prévio para esta doença, foi composta de 15 pessoas, das quais 07 (46,6%) são do gênero masculino e 08 (53,3%) são do feminino (Gráfico 1). A idade variou de 25 a 59 anos. Quanto a faixa etária, três pacientes, (20%), possuíam idade entre 25 e 34 anos, 06 (40%) pacientes entre 35 e 49 anos e 06 pacientes (40%), apresentavam idade entre 50 e 69 anos (Gráfico 2).

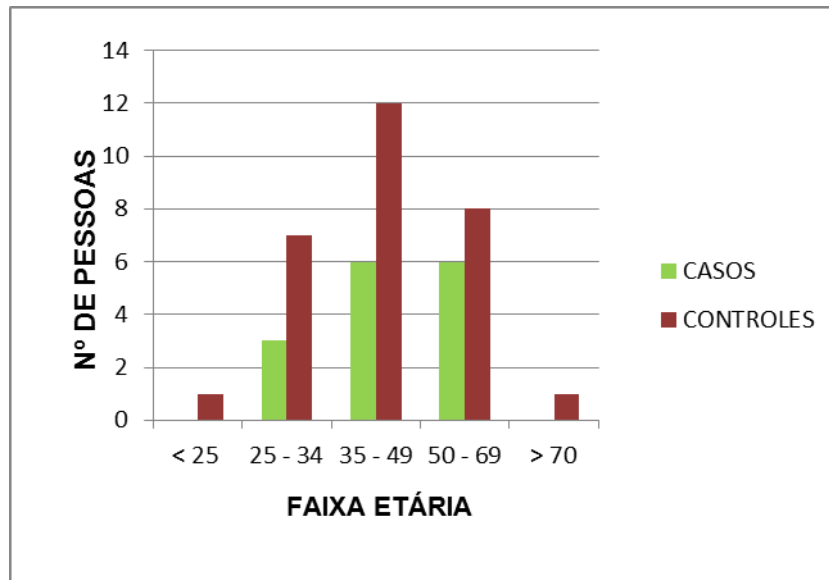
A população de controles saudáveis foi composta por 29 pessoas, das quais 20 (69%) são do sexo feminino e 09 (31%) do sexo masculino (Gráfico 1) Quanto a faixa etária, 01 pessoa (3,45%) com menos de 25 anos de idade, 07 pessoas,(24,14%), possuíam idade entre 25 a 34 anos, 12 pessoas (41,38%) apresentavam idade entre 35 e 49 anos, 08 pessoas (27,58%), de 50 a 69 anos e 01 pessoa (3,45%) possuía idade maior que 70 anos (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Gênero dos pacientes com hanseníase e controles saudáveis.



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 2 - Faixa etária dos pacientes com hanseníase e controles saudáveis.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Comparação de leucócitos e subpopulações linfocitárias de grupos de pacientes com hanseníase e controles saudáveis

As médias das contagens de leucócitos e subpopulações linfocitárias estão descritas na Tabela 1, bem como o desvio-padrão, o número máximo e mínimo de células por mm^3 e o nível de significância.

Tabela 1: Distribuição de pacientes segundo o número de leucócitos e subpopulações linfocitárias, em pessoas com hanseníase e controles saudáveis.

Leucócitos/Linfócitos cél/mm ³	Casos	Controles	P
	Média ± Desvio-Padrão Máximo e Mínimo	Média ± Desvio-Padrão Máximo e Mínimo	
Leucócitos	6207 ± 455,2 (n=15) Var. 3700 – 9170	6583 ± 344,6 (n= 29) Var. 3800 – 12700	Ns
Linfócitos T (CD3 ⁺)	1303 ± 121,7 (n=15) Var. 544 – 2053	1300 ± 69,85 (n=29) Var. 631 – 1987	Ns
Linfócitos T (CD4 ⁺)	785,6 ± 73,95 (n=15) Var. 410,8 – 1309	727,6 ± 51,4 (n=28) Var. 267,0 – 1228	Ns
Linfócitos T (CD8 ⁺)	418 ± 55,32 (n=15) Var. 120 – 866,2	410,5 ± 3,38 (n=29) Var. 146 – 926	Ns
Linfócitos NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56)	147,5 ± 29,28 (n=15) Var. 14,62 – 463	378,1 ± 43,03 (n=29) Var. 104 – 1126	P = 0,0008
Linfócitos B (CD19 ⁺)	233,3 ± 22,18 (n=15) Var. 138 -419	115,3 ± 9843 (n=29) Var. 24 – 202	P < 0,0001

Fonte: Elaborada pela autora.

As médias das contagens de leucócitos no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 6207 [3700 – 9170] e 6583 [3800 – 12700], respectivamente. O desvio-padrão de pacientes com hanseníase e controles saudáveis foi de ± 1763 e ± 1856, respectivamente, p = 0,5214. (Figura 3, item a; Tabela 1).

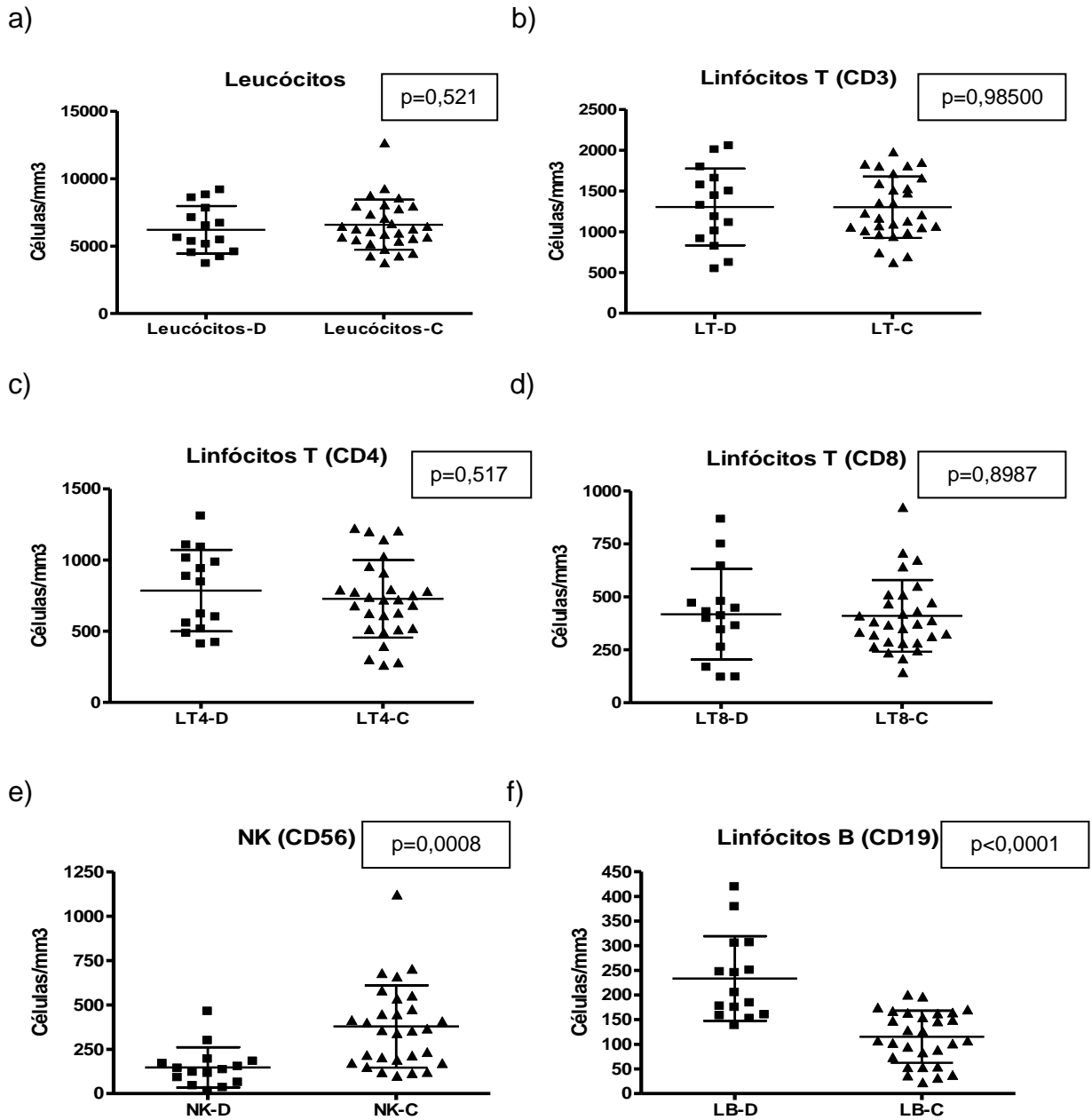
As médias das contagens de linfócitos T totais (CD3⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 1303 [544 – 2053] e 1300 [631 – 1987], respectivamente. O desvio-padrão de pacientes com hanseníase e controles saudáveis foi de ± 1303 e ± 1300, respectivamente, p = 0,9850. (Figura 3, item b; Tabela 1).

As médias das contagens de linfócitos T (CD4⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 785,6 [410,8 – 1309] e 727,6 [267 – 1228], respectivamente. O desvio-padrão de pacientes com hanseníase e controles saudáveis foi de ± 286,4 e ± 272, respectivamente, $p = 0,517$. (Figura 3, item c; Tabela 1).

As médias das contagens de linfócitos T (CD8⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 418,1 [120 – 866,2] e 410,5 [146 – 926], respectivamente. O desvio-padrão de pacientes com hanseníase e controles saudáveis foi de ± 214,2 e ± 169, respectivamente, $p = 0,8987$. (Figura 3, item d; Tabela 1).

As médias das contagens de linfócitos NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 147 [14,62 – 463] e 378,1 [104 – 1123], respectivamente. O desvio-padrão de pacientes com hanseníase e controles saudáveis foi de ± 113,4 e ± 231,7, respectivamente, $p = 0,0008$. (Figura 3, item e; Tabela 1).

As médias das contagens de linfócitos B (CD19⁺) no grupo de pacientes com hanseníase e nos controles saudáveis, dadas em células/mm³, foram, 233,3 [138 – 419] e 115,3 [24 – 202], respectivamente. O desvio-padrão de pacientes com hanseníase e controles saudáveis foi de ± 85,89 e ± 53,01, respectivamente, $p < 0,0001$. (Figura 3, item f; Tabela 1).



Fonte: Elaborada pela autora.

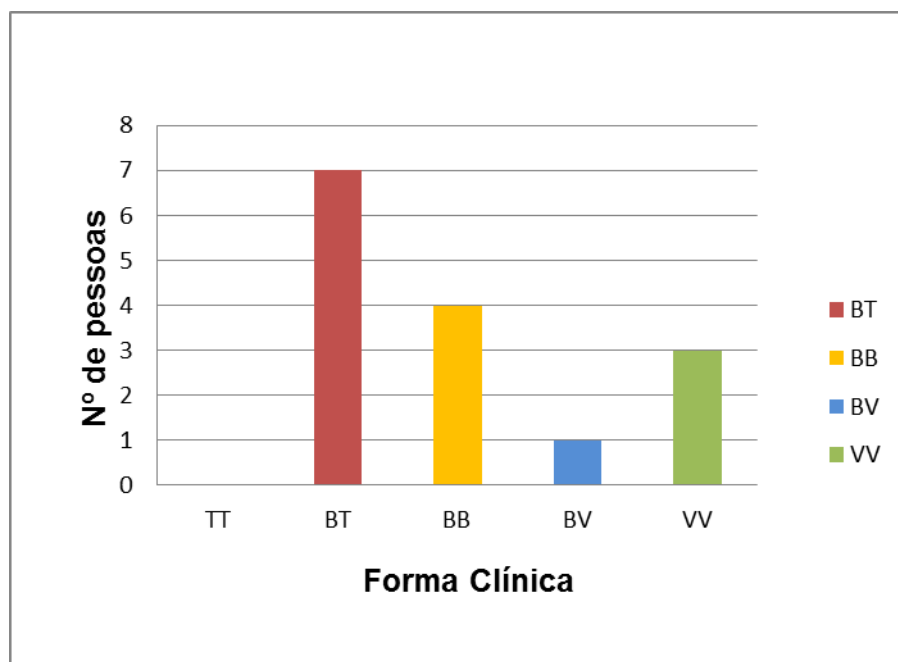
a) leucócitos, b) linfócitos T totais (CD3+), c) linfócitos T (CD4+), d) linfócitos T (CD8+), e) linfócitos NK (CD3-CD16+CD56+) e f) linfócitos B (CD19+) em pacientes com hanseníase e controles saudáveis.

■ = pacientes com hanseníase
 ▲ = controles saudáveis
 D = doentes
 S = saudáveis

Figura 3 - Média dos valores da contagem de grupos de leucócitos e subpopulações linfocitárias de pacientes com hanseníase e controles saudáveis

A classificação clínica utilizada foi a de Ridley-Jopling. Quanto à forma clínica, não houve nenhum paciente classificado como TT. O número maior de indivíduos foi classificado com a forma clínica BT com 07 (46,66%), depois a BB com 04 (26,67%), a VV com 03 (20%) e a BV com 01 (6,67%) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Forma clínica do grupo de pacientes com hanseníase.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.

DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica que desencadeia amplo espectro de resposta imunológica em humanos. Caracteriza-se por apresentar formas clínicas, patológicas e imunológicas contrastantes. O seu estudo imunopatológico é fundamental na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de desenvolvimento da doença. Considerando que no ano de 2012, no estado do Ceará, foram diagnosticados 2.066 casos novos de hanseníase é importante que este tema seja discutido pela comunidade científica.

No desenvolvimento da imunidade contra o *M. leprae*, os linfócitos têm papel fundamental e são representados por diversas subpopulações celulares (MODLIN *et al.*, 1988).

Este estudo buscou quantificar leucócitos e subpopulações linfocitárias envolvidas no processo imunológico da hanseníase, em sangue periférico de indivíduos doentes e controles saudáveis a fim de auxiliar no diagnóstico e melhorar o acompanhamento desses pacientes. A comparação entre os grupos de pacientes e controles saudáveis evidenciou diferença estatística em relação aos linfócitos NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ ($p=0,0008$) e linfócitos B CD19⁺ ($p<0,0001$). O linfócito B é responsável pela resposta imune humoral, e os NKs pela resposta imunitária inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, assim como células tumorais (CRUVINEL, *et al.*, 2010). No contexto da infecção pelo *M. leprae*, espera-se que células NK atuem na resposta inata e inicial contra a bactéria, enquanto os linfócitos B atuem, sobretudo, na produção de anticorpos, mas também como células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ estavam diminuídos nos grupos de pacientes com hanseníase (14,62 - 463 células/mm³) quando comparados aos controles saudáveis (104 - 1123 células/mm³). De forma contrária, os linfócitos B CD19⁺ estavam aumentados no grupo de pacientes com hanseníase (138 - 419 células/mm³) quando comparados com os controles saudáveis (24 - 202 células/mm³).

Um estudo realizado na cidade de Fortaleza em 2012 por Solon revelou uma redução na população de células NK em pacientes com hanseníase, antes do início do tratamento específico. A comparação foi realizada com pacientes com hanseníase após o tratamento específico e foi observado que esta redução era revertida após o final do tratamento da doença. No estudo de Solon foi descrita concentração de células NK de 142,0 cel/mm³ nos pacientes virgens de tratamento. No presente estudo foi encontrada concentração de 147,0 cel/mm³. Dessa forma,

corroborar-se o achado de redução na população de células NK e adiciona-se a comparação com os níveis encontrados nos indivíduos saudáveis (378 cel/mm³).

Os linfócitos NK participam da imunidade inata, influenciando a resposta imunológica adaptativa e a imunorregulação (POLI *et al.*, 2009). A função das células NK em pacientes com hanseníase não está bem estabelecida. Um dos primeiros estudos realizados sobre a atividade destas células na hanseníase mostrou que não houve diferença na atividade das células NK de indivíduos com hanseníase virchowiana ou com as formas dimorfas, comparados aos indivíduos saudáveis, porém mostrou atividade reduzida dos linfócitos NK em pacientes com forma lepromatosa e com eritema nodoso hansênico (HUMPHRES; GELBER; KRAHENBUHL, 1982). Estudos posteriores mostraram células NK com baixa atividade em pacientes com hanseníase virchowiana não tratados e não reacionais, quando comparados aos controles normais. Pacientes com reações reversas mostraram atividade normal dessas células, quando foram comparados com a forma *boderline* tuberculoide (BT) (CONVERSE; BJUNE, 1986). Chiplunkar *et al.* (1990) demonstram que as células NK de pacientes com a forma virchowiana não tratados e tratados com multidrogaterapia (MDT) foram menos eficazes em promover a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em comparação com pacientes com a forma tuberculoide ou controles saudáveis. As células NK promovem a depuração dos bacilos de *M. leprae* via citotoxicidade contra macrófagos e células de Schwann infectados. Esta ação pode ser incrementada pela injeção intra-lesional de IL-2 (CHIPLUNKAR *et al.*, 1990; KAPLAN *et al.*, 1989; STEINHOFF *et al.*, 1991). Este conjunto de dados permite considerar que as contagens reduzidas de células NK encontradas nos pacientes com hanseníase poderiam representar uma migração desta população de células para os sítios de lesão na tentativa de promover proteção contra o bacilo. A possibilidade de imunodeficiência especificamente na população de células NK é considerada mais remota, pois estes indivíduos com hanseníase experimentam uma recuperação das contagens de células NK após o tratamento específico da doença.

As células NK tem capacidade de matar células-alvo específicas e podem produzir citocinas do tipo Th1 ou Th2. Para a geração da resposta Th1 é importante que as células NK produtoras de IFN- γ migrem cedo para o sítio da inflamação, enquanto que o aumento da citotoxicidade de NK por IL-18 não necessita da produção de IL-12 endógeno, provavelmente porque os receptores de

IL-18 (IL-18R) são expressos constitutivamente na superfície das NKs (HYODO *et al.*, 1999). Esta hipótese poderia ser testada a partir de imunistoquímica tecidual com marcação para células CD56⁺ e CD16⁺ em biópsias cutâneas dos pacientes avaliados no estudo. Estas células foram estudadas em pacientes com hanseníase e com formas reacionais, comparadas com aqueles sem forma reacionais, mas não foram descritas diferenças em seus níveis periféricos (Montezuma, 2011).

Em relação à análise de populações de células CD19⁺, linfócitos B, foi observado aumento na população destas células no sangue periférico dos pacientes com hanseníase quando comparados aos indivíduos saudáveis. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos de linfócitos T CD3⁺, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺.

Poucos estudos em literatura avaliaram células CD19⁺ em hanseníase. De forma específica, em indivíduos com forma virchowiana de hanseníase foi observado aumento percentual significativo de linfócitos B (CD19⁺) e linfócitos B1 (CD19⁺CD5⁺), respectivamente $15,08 \pm 4,83$ e $4,92 \pm 3,57$, quando comparados a indivíduos normais, $12,14 \pm 2,10$ e $1,10 \pm 0,59$. (ILHAN *et al.*, 2007). Mendonça *et al* (2008b), em comparação do perfil fenotípico de pacientes com hanseníase e controles saudáveis, não reproduziram este aumento no percentual de linfócitos B (CD3⁻CD19⁺) descrito por Ilhan *et al*, 2007. A avaliação das formas clínicas paucibacilares e multibacilares fica prejudicada no presente estudo devido ao número reduzido de casos estudados e a frequência maior de casos paucibacilares (11) quando comparados aos multibacilares (4). Vale salientar que esta classificação se pautou na avaliação do índice baciloscópico e não na classificação operacional que é utilizada apenas como auxiliar à prática clínicas em unidades de saúde.

É possível que estes linfócitos B sofram ativação por epítopos de *M. leprae* em resposta celular do tipo Th2, resultando em produção aumentada de anticorpos como, por exemplo anti-PGL-1. Estes anticorpos não tem papel definido no diagnóstico da hanseníase, mas talvez contribuam para a patogênese da doença. Em estudo anterior, realizado no estado do Ceará, foi descrita alta prevalência de anticorpos IgM anti-PGL1 em contatos de pacientes com hanseníase, mas também em indivíduos que não declaravam contato ou que residiam em municípios em que não havia casos documentados da doença (Frota *et al*, 2010).

Os dados do presente estudo sinalizam que as células NK parecem desempenhar papel de relevância na resposta ao *M. leprae*. O linfócito B já ocupa

papel de destaque na resposta imunológica ao *M. leprae*, sobretudo nas formas lepromatosas e formas reacionais, e este estudo reforça a importância desta célula. É possível que estudos posteriores com foco no papel de células NK possam contribuir para melhor compreensão da resposta inata ao *M. leprae*.

6. CONCLUSÕES

1. Não houve diferenças entre as populações de leucócitos, células CD3+, CD4+ e CD8+ quando comparou-se as populações de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis;

2. Observou-se redução na população de linfócitos NK (CD3⁻CD16⁺CD56) no grupo de pacientes com hanseníase quando comparado com os controles saudáveis, 147 cel/mm³ [14,62 – 463] e 378,1 cel/mm³ [104 – 1123], respectivamente, p = 0,0008.

3. Observou-se aumento na população de linfócitos B (CD19⁺) no grupo de pacientes com hanseníase quando comparado com os controles saudáveis 233,3 cel/mm³ [138 – 419] e 115,3 cel/mm³ [24 – 202], respectivamente, p < 0,0001.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**, 6th ed.. Saunders Comp., U.S.A. 2012.

ANDERSSON, A. K.; CHADUVULA, M.; ATKINSON, S. E.; KHANOLKAR-YOUNG, S.; JAIN, S.; SUNEETHA, L.; SUNEETHA, S.; LOCKWOOD, D. N. J. Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Leprosy Type 1 Reactions. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3725–3733, 2005

ANTAS, P.R.Z.; SALES, J.S.; PEREIRA, K.C.; OLIVEIRA, E.B.; CUNHA, K.S.; SARNO, E.N.; SAMPAIO, E.P. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1119-1129, 2004.

ARAÚJO. M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36 (3), p. 373-382, mai-jun, 2003.

AUTISSIER, P. [SOULAS, C.](#); [BURDO, T.H.](#); [WILLIAMS, K.C.](#) Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification on DC heterogeneity. **Journal of Immunological Methods**, v.360, p.119–128, 2010.

BALAGON, M. V. F.; GELBER, R. H.; ABALOS, R. M.; CELLONA, R. V. Reactions following completion of 1 and 2 year multidrug therapy (MDT). **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 83 (3), p. 637-644, 2010.

BARKER, L.P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances Indian. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123 p.748-759, 2006.

BATISTA, E. S. *et al.* Perfil sócio-demográfico e clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 9 (2), p. 101-106, 2011.

BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. **Journal of Immunological Methods**, v.243 p.77–97, 2000.

BANERJEE D.K., MCDERMOTT-LANCASTER, R.D.; MCKENZIE, S. Experimental evaluation of possible new short-term drug regimens for treatment of multibacillary leprosy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, p. b326–b330, 1997.

BENNETT, B. H., PARKER, D. L., ROBSON, M. Leprosy: Steps Along the Journey of Eradication. **Public Health Reports**, v. 123, p. 198-205, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da hanseníase**: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hanseníase e direitos humanos**: direitos e deveres dos usuários do SUS. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos**: baciloscopia em hanseníase. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 4**. Brasília, 2011.

BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R. B.; BELISLE, J. T.; BLEHARSKI, J. R.; MAITLAND, M.; NORGARD, M. V.; PLEVY, S. E.; SMALE, S. T.; BRENNAN, P. J.; BLOOM, B. R.; GODOWSKI, P. J.; MODLIN, R. L. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p.732-736, 1999.

CEARÁ. Secretaria de Saúde. Situação Epidemiológica de Hanseníase no Ceará. **Inf. Epidemiol. Hanseníase**, fev. 2013. Disponível em: <http://portal.saude.ce.gov.br/saude>. Acesso em: 29 jul. 2013.

CHACHA, J. J.; PETERS, L.; SOTTO, M. N.; RIVITTI, E. A.; MELNIKOV, P. Sistema nervoso periférico e pressupostos da agressão neural na Hanseníase. **An Bras Dermatol.**, v. 84(5), p. 495-500, 2009.

CHIPLUNKAR, S. V., DESHMUKH, M. V., SAMSON, P. D., BUTLIN, R., BHATKI, W. S., CHULAWALLA, R. G., DEO, M. G., AND GANGAL, S. G. **Natural killer-cell-mediated and antibody-dependent cellular cytotoxicity in leprosy**. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 58(2), 334-341, 1990.

CONVERSE, P. J.; BJUNE, G. Natural killer (NK) cell activity and reversal reaction in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 54, n. 4, p. 503-509, 1986.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 633-640, 2001.

CORREA, R. G. C. F.; AQUINO, D. M. C.; CALDAS, A. J. M.; AMARAL, D. K. C. R.; FRANÇA, F. S. F.; MESQUITA, E. R. R. B. P. L. Epidemiological, clinical and operational aspects of leprosy patients assisted at a referral service in the State of Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45(1), p.89-94, jan-fev.2012.

CRUVINEL, W. M. *et al.* Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 50 (4), p. 434-461, 2010.

CUNHA, A. Z. S. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. **Ciência e Saúde Coletiva** 7 (2): 235-242. Santa Cruz do Sul, RS, 2002.

DATH, C.; [DETHY, A.](#); [VAN LANGENDONCKT, A.](#); [VAN EYCK, A.S.](#); [AMORIM, C.A.](#); [LUYCKX, V.](#); [DONNEZ, J.](#); [DOLMANS, M.M.](#) Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. **Human Reproduction**, v.0, n.0 p. 1–9, 2011

DUNCAN, B.B. *et al.* **Medicina Ambulatorial: Condutas Clínicas em Atenção Primária**. 3 ed. Porto Alegre: Atess Médicas, 2004.

EIDT, L. M. **Breve história da hanseníase**: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde Soc.**, v.13, p.76-88, 2004.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

FEHNIGER, T.A.; [COOPER, M.A.](#); [NUOVO, G.J.](#); [CELLA, M.](#); [FACCHETTI, F.](#); [COLONNA, M.](#); [CALIGIURI, M.A.](#) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. **Blood**, v. 101, p. 3052–3057, 2003.

FERLAZZO, G.; [THOMAS, D.](#); [LIN, S.L.](#); [GOODMAN, K.](#); [MORANDI, B.](#); [MULLER, W.A.](#); [MORETTA, A.](#); [MÜNZ, C.](#) The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 1455–1462, 2004.

FISCHER, G. B.; SCROFERNEKER, M. L. **Imunologia: básica e aplicada**. 2ª ed, São Paulo: Segmento Farma, 2007.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 30, p. 335-339, jul-set, 1997.

[FROTA, C. C.](#); [FREITAS, M.V.](#); FOSS, N.T.; LIMA, L. N.; RODRIGUES, L. C. C; BARRETO, M. L.; KERR, L. R. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. [Trans R Soc Trop Med Hyg](#). Jul; 104(7):490-5, 2010

GOMES, C. C. D.; GONÇALVES, H. S.; PONTES, M. A. A.; PENNA, G. O. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referência na região Nordeste do Brasil. **An Bras Dermatol**. v. 80(supl 3), p. 283-288, 2005.

GONÇALVES, H. S. **Esquema único de tratamento da hanseníase: influências das formas clínicas nos efeitos indesejáveis dos fármacos**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal d Ceará, Fortaleza, 2010.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium*

leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35 (4). P. 365-375, jul-ago, 2002.

HINRICHSEN. S. L.; PINHEIRO. M. R. S.; JUCÁ. M. B.; HÉVILA. R.; DANDA. G. J. N.; DANDA. D. M. Aspectos epidemiológicos da hanseníase na cidade de Recife, PE em 2002. **An Bras Dermatol**. v. 79 (4), p.413-421. Jul./ago. Rio de Janeiro, 2004.

HUMPHRES, R. C.; GELBER, R. H.; KRAHENBUHL, J. L. Suppressed natural killer cell activity during episodes of erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 49, n. 3, p. 500-508, 1982.

HYODO, Y.; MATSUI, K.; HAYASHI, N.; TSUTSUI, H.; KASHIWAMURA, S.; YAMAUCHI, H.; TAKEDA, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; KAYAGAKI, N.; KURIMOTO, M.; OKAMURA, H.; HADA, T.; YAGITA, H.; AKIRA, S.; NAKANISHI, K.; HIGASHINO, K. IL-18 upregulates perforin mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding constitutively expressed IL-18 receptor. **J. Immunol.**, v. 162, n. 3, p. 1662–1668, 1999.

ILHAN, F.; CICEK, D.; GÖDERKMERDAN, A.; TAHRAN, G.; BULUT, V. CD5+ B cells rati in lepromatous leprosy. **J. Clin. Diag. Res.**, v. 1, p. 138-142, 2007.

IM, J. S.; KANG, T. J.; LEE, S. B.; KIM, C. H.; LEE, S. H.; VENKATASWAMY, M. M.; SERFASS, E. R.; CHEN, B.; ILLARIONOV, P. A.; BESRA, G. S.; JACOBS JR., W. R.; CHAE, G. T.; PORCELLI, S. A. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections **Clin. Immunol.**, v. 127, n. 2, p. 214–224, 2008.

JOB, C.K.; JAYAKUMAR, J.; KEARNEY, M.; GILLIS, T.P. Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 518–521, 2008.

KANG, T. j.; YEUN. C. E.; KIM. B. C.; VOCÊ. E. Y.; CHAE. G.T.; Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology**, v. 112, p. 674-680, 2004.

KAPLAN, R.; KAPLAN, S. *The Experience of Nature: A Psychological Perspective*. **Cambridge University Press**, Cambridge, New York. 1989

KERN, W.; HAFERLACH, C.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome. Correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. **Cancer**, v. 116, n. 19, p. 4549–4563, 2010

KRUTGIK, S. R.; TAN, B.; LI, H.; OCHOA, M. T.; LIU, P. T.; SHARFSTEIN, S. E.; GRAEBER, T. G.; SIELING, P. A.; LIU, Y. J.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes intomacrophages and dendritic cells. **Nat Med**, v. 11(6), p. 653-660. Jun, 2005.

LEE, P. S.; LIN, C. N.; CHUANG, S. S. Immunophenotyping of angioimmunoblastic t-

cell lymphomas by multiparameter flow cytometry. **Pathol. Res. Pract.**, v.199, 539–545, 2003.

LEITE, V.M.C.; LIMA, J.W.O.; GONÇALVES, H. S. Neuropatia silenciosa em portadores de hanseníase na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 659-665, 2011.

LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. In: BURNS, D. A.; BREATHNACH, S. M.; COX, N. H.; GRIFFITHS, C. E. M. (Eds.). **Rook's textbook of dermatology**. 7th ed. Oxford: Blackwell, 2004. p. 29.1 -29.21.

MANANDHAR, R.; SHRESTHA, N.; BUTLIN, C. R.; ROCHE, P. W. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. **Clin Exp Immunol**, v. 128, p. 333-338, 2002.

MARTINS, M. V. S. B.; GUIMARÃES, M. M. S.; SPENCER, J. S.; HACKER, M. A. V. B.; COSTA, L. S.; CARVALHO, F. M.; GELUK, A.; SCHIP, J. J. V. P.; PONTES, M. A. M.; GONÇALVES, H. S.; MORAIS, J. P.; BANDEIRA, P. J.; PEREIRA, G. M.B. Pathogen-Specific Epitopes as Epidemiological Tools for Defining the Magnitude of Mycobacterium leprae Transmission in Areas Endemic for Leprosy. **Neglected Tropical Diseases**, v. 6 (4), 2012.

MATOS, H. J.; SALES, A. M.; NERY, J. A. C.; DUPPRE, N. C.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Double-blind trial of the efficacy of pentoxifylline vs thalidomide for the treatment of type II reaction in leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, p. 243-248, 2007.

MATSUO, C.; TALHARI, C.; NOGUEIRA, L.; RABELO, R.F.; SANTOS, M.N.; TALHARI, S. Hanseníase borderline virchowiana. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v.85, n.6, p.921-222, 2010.

MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Antigen-specific memory B cell development. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 487-513, 2005.

MEDONÇA, V. A.; MELO, G. E. B. A.; TEIXEIRA, A. L. *et al.* Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 83 (4), p. 345-350, 2008

MISCH, E.A.; [MACDONALD, M.](#); [RANJIT, C.](#); [SAPKOTA, B.R.](#); [WELLS, R.D.](#); [SIDDIQUI, M.R.](#); [KAPLAN, G.](#); [HAWN, T.R.](#) Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 2 p. 231, 2008.

MIRA, M. T.; [ALCAÏS, A.](#); [NGUYEN, V. T.](#); [MORAES, M. O.](#); [DI FLUMERI, C.](#); [VU, H. T.](#) *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v.12, n. 427, p. 636–640, 2004.

[MODLIN, R.L.](#); [MELANCON-KAPLAN, J.](#); [YOUNG, S.M.](#); [PIRMEZ, C.](#); [KINO, H.](#); [CONVIT, J.](#) [REA, T.H.](#); [BLOOM, B.R.](#) Learning from lesions: patterns of tissue

inflammation in leprosy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 85, p. 1213-1217, 1988.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010.

MONTEZUMA, B. O. X. **Subpopulações de linfócitos em pacientes com formas reacionais de hanseníase atendidos no Centro de Dermatologia D. Libânia, em Fortaleza-CE**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 51, p. 417-426, 2004.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L. W.; BÜHER-SÉKULA, S.; Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Rev da Socied Bras de Med Tropical**. v. 41 (supl II), p. 11-18, 2008.

MUKAI, T.; MAEDA, Y.; TAMURA, T.; MATSUOKA, M.; TSUKAMOTO, Y.; MAKINO, M. Induction of Cross-Priming of Naive CD8⁺ T Lymphocytes by Recombinant Bacillus Calmette-Guérin That Secretes Heat Shock Protein 70-Major Membrane Protein-II Fusion Protein. **The Journal of Immunology**. v. 183, p. 6561-6568, 2009.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

OLIVEIRA, M. L. W.; CAVALIERE, F. A. M.; MACEIRA, J. M. P.; BÜHRER-SÉKULA, S. O uso da sorologia como ferramenta adicional no apoio ao diagnóstico de casos difíceis de hanseníase multibacilar: lições de uma unidade de referência. **Rev da Soc Bras de Med Tropical**. v. 41(supl II), p. 27-33, 2008.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the sixth meeting of the WHO Technical Advisory Group on Elimination of Leprosy. (24 august 2012) Disponível em: <http://www.who.int/wer/2012/wer8734.pdf>>. Acesso em 05 de agosto de 2013.

OPROMOLLA, D.V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

ORSINI, M. *et al.* Estudos clínicos, imunopatológicos e eletrofisiológicos dos nervos periféricos na hanseníase. **Rev Neuricienc**, v. 16 (3), p. 220-230, 2008.

OWENS, M.A.; [VALL, H.G.](#); [HURLEY, A.A.](#); [WORMSLEY, S.B.](#) Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p.33–50, 2000.

PIMENTEL, M. I. F.; NERY, J. A. C.; BORGES, E.; ROLO, R.; SARNO, E. N. Neurite silenciosa na hanseníase multibacilar avaliada através da evolução das incapacidades antes, durante e após a poliquimioterapia. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, V. 79(2):169-179, mar./abr. 2004.

PINHEIRO, R. O.; SALLES, J. S.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiol.** v. 6(2), p. 217–230, February, 2011.

POCATERRA, L.; JAIN, S.; REDDY, R.; MUZAFFARULLAH, S.; TORRES, O.; SUNEETHA, S.; LOOCKWOOD, D. N. J. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74(5), p. 868–879, 2006.

POLI, A.; [MICHEL, T.](#); [THÉRÉSINE, M.](#); [ANDRÈS, E.](#); [HENTGES, F.](#); [ZIMMER, J.](#) CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **Immunology**, v. 126, p. 458–465, 2009.

PRASAD, P. V. S.; KAVIARASAN, P. K. Leprosy therapy, past and present: can we hope to eliminate it? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74(5), p. 868–879, 2006.

RAMOTHEA, L. W.; JOHNSON, R. P. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. **Immunology**, v. 115, p. 206–214, 2005.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. *et al.* **Roitt's essential immunology**. 12th ed.. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2011.

SARAIVA, A. G. S. **Hanseníase: característica da população portadora de hanseníase dos municípios de Limoeiro do Norte e Morada Nova, no período de 1997 – 2001.** [Dissertação de Mestrado]. Escola de Saúde Pública do Ceará, 2002.

SARNO, E. N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, M. M.; NERY, J. A. Serum levels of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β during leprosy reactional states. **Clin. exp. Immunol.** v. 84, p. 103-108, 1991.

SCHEPERS, K.; ARENS R.; SCHUMACHER, T. N. M. Dissection of cytotoxic and helper T cell responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 2695–2710, 2005.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006.

SCHWONZEN, M.; [DIEHL, V.](#); [DELLANNA, M.](#); [STAIB, P.](#) Immunophenotyping of surface antigens in acute myeloid leukemia by flow cytometry after red blood cell lysis. **Leukemia Research**, v. 31, n. 1, p. 113–116, 2007.

SIELING, P.A.; [JULLIEN, D.](#); [DAHLEM, M.](#); [TEDDER, T.F.](#); [REA, T.H.](#); [MODLIN, R.L.](#); [PORCELLI, S.A.](#) CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 1851–1858, 1999.

SILVA S F, GRIEP R H. Reação hansênica em pacientes portadores de hanseníase em centros de saúde da Área de Planejamento 3.2. do Município do Rio de Janeiro. **Hansenologia Internationalis**, v. 32, p. 155-162

SOLON, V. R. M. **Estudo das populações linfocitárias em sangue periférico de pacientes com hanseníase.** [Dissertação de mestrado] Universidade Federal do Ceará, 2012.

SOUZA, C.S. Hanseníase: Formas Clínicas e Diagnóstico Diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 325-334, 1997.

STEINHOFF, U.; WAND-WÜRTTENBERGER, A.; BREMERICH, A.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium leprae renders Schwann cells and mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells. **Infect. Immun.** v. 59, n. 2, p. 684–688, 1991.

STEFANI, M.M.; GUERRA, J.G.; SOUSA, A.L.M.; COSTA, M.B.; OLIVEIRA, M.L.W.; MARTELLI, C.T.; SCOLLARD, D.M. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infectious Diseases**, v.9, p. 75, 2009.

TEIXEIRA, M. A. G.; SILVA, N. L.; RAMOS, A. L.; HATAGIMA, A.; MAGALHÃES, V. Polimorfismos do gene *NRAMP1* em indivíduos com reações hansênicas, atendidos em dois Centros de Referência no Recife, nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43(3), p. 281-286, mai-jun, 2010.

WALKER, S.L., NICHOLLS, P.G., BUTLIN, C.R., NERY, J.A.C., ROY, H.K. RANGEL, E., SALES, A.M., LOCKWOOD, D.N.J. Development and Validation of a Severity Scale for Leprosy Type 1 Reactions. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 2, p.351, 2008.

WEBSTER, R. L.; JOHNSON, R. P. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. **Immunology**, v. 115, p. 206–214, 2005.

WEN, P. F.; WANG, L. Multibacillary leprosy: erythema as the only clinical presentation. **Chin Med J.** v.125(3), p. 558-560, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE E CONTROLES SAUDÁVEIS

IDENTIFICADOR	SITUAÇÃO	IDADE	GÊNERO
646	Casos	56 anos	F
647	Casos	59 anos	M
648	Casos	56 anos	M
653	Casos	43 anos	F
657	Casos	39 anos	F
656	Casos	51 anos	M
668	Casos	54 anos	F
680	Casos	37 anos	M
681	Casos	35 anos	M
683	Casos	28 anos	F
682	Casos	55 anos	M
684	Casos	49 anos	F
686	Casos	34 anos	F
685	Casos	36 anos	M
687	Casos	25 anos	M
1	Controles	65 anos	F
2	Controles	48 anos	F
6	Controles	33 anos	F
10	Controles	36 anos	F
12	Controles	38 anos	F
52	Controles	59 anos	F
54	Controles	63 anos	M
92	Controles	59 anos	M
94	Controles	47 anos	F
97	Controles	29 anos	F
120	Controles	54 anos	F
121	Controles	32 anos	F
123	Controles	30 anos	M
124	Controles	62 anos	M
125	Controles	27 anos	F
130	Controles	29 anos	F
150	Controles	20 anos	M
172	Controles	43 anos	M
233	Controles	28 anos	F
255	Controles	66 anos	F
259	Controles	56 anos	M
266	Controles	47 anos	M
276	Controles	76 anos	F
471	Controles	45 anos	F
587	Controles	43 anos	F
604	Controles	48 anos	F
611	Controles	43 anos	M
612	Controles	41 anos	F
641	Controles	41 anos	F

APÊNDICE B – CONTAGEM DA POPULAÇÃO DE LEUCÓCITOS E LINFÓCITOS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE E CONTROLES SAUDÁVEIS

IDENTIFICADOR	LEUCÓCITOS	CD3+/mm3	CD3+%	CD4+/mm3	CD4+%	CD8+ /mm3	CD8+%	CD3 CD16 ⁺ CD56+/mm3	CD3 CD16 ⁺ CD56+%	CD19+/mm3	CD19%	FOR CLINI
646	4500	544	60,49	421	46,81	120	13,34	182	20,27	158	17,51	VV
647	5600	1655	77,78	1309	61,49	363	17,08	194	9,11	245	11,51	VV
648	7100	1496	84,29	886	49,91	479	26,96	142	8,02	138	7,78	BT
653	3700	622	52,54	486	41,02	121	10,26	298	25,2	152	12,87	BT
657	6500	1793	86,21	1090	52,38	749	36	90	4,31	177	8,49	BT
656	4200	913	67,92	515	38,3	344	25,62	63	4,67	379	28,19	BE
668	7800	1441	75,71	985	51,78	446	23,41	134	7,05	306	16,07	BT
680	5440	819,20	68,45	600	50,14	167,31	13,98	169,23	14,14	175	14,64	BV
681	5340	1112,01	59,16	845	44,95	261,84	13,93	462,97	24,63	305	16,22	BE
683	8790	1009,06	79,17	557,36	43,73	429,91	33,73	118,92	9,33	160	12,59	BT
682	5130	2052,82	82	938,79	38	866,19	35	44,06	2	250	10	VV
684	8580	2004,29	73	1013,13	37	645,22	24	113,94	4	247	9	BT
686	4570	1184,54	81	620,05	42	397,77	27	14,62	1	205	14	BT
685	9170	1571,29	72	1106,2	51	410,75	19	152,13	7	419	19	BT
687	6690	1321,28	79	410,75	42	469,97	28	33,45	2	184	11	BE
1	6500	1857	86,38		58,90	710	38,22	124	5,75	169	7,87	
2	5600	1483	74,45	795	53,58	512	34,53	344	17,26	165	8,29	
6	5200	1362	77,47	727	53,39	414	30,40	194	11,02	202	11,51	
10	8800	1836	68,38	1211	65,94	435	23,72	683	25,43	166	6,19	
12	8600	1815	57,83	1205	66,36	422	23,24	1126	35,87	198	6,30	
52	4300	1064	62,89	744	69,97	285	26,81	479	28,3	149	8,81	
54	5700	631	57,13	399	63,20	146	23,16	418	37,80	56	5,07	
92	8100	1080	56,40	780	72,16	249	23,09	663	34,62	172	8,98	
94	8000	1216	68,67	786	64,64	354	29,14	451	25,48	104	5,85	
97	4300	1537	89,46	725	47,17	645	41,98	126	7,36	55	3,18	
120	5900	1174	73,86	616	52,51	514	43,82	361	22,70	55	3,44	
121	6300	700	74,20	267	38,20	370	52,88	154	16,28	90	9,52	
123	4800	992	75,39	518	52,22	336	33,88	221	16,78	103	7,83	
124	6100	1137	88,87	284	25,00	290	25,46	104	8,09	39	3,04	
125	7800	1598	67,13	914	57,20	554	34,66	707	29,72	75	3,15	
130	7100	950	73,31	497	52,31	323	34,02	218	16,78	128	9,91	
150	6300	1020	78,20	757	74,21	211	20,67	175	13,44	109	8,36	
172	6000	752	75,08	307	40,84	239	31,76	119	11,89	130	13,03	
233	6700	1074	70,71	688	64,02	284	26,46	412	27,11	33	2,18	
255	5500	1987	72,97	1228	61,82	470	23,67	585	21,48	151	5,55	
259	6500	1518	73,49	1030	67,86	375	24,68	452	21,88	96	4,63	
266	8000	1355	72,33	684	50,44	268	19,75	370	19,75	148	7,92	
276	3800	972	79,77	516	53,03	391	40,19	208	17,10	38	3,13	
471	9300	1812	77,24	961	53,0	677	37,33	358	15,24	176	7,52	
587	5700	1057	78,68	525	49,68	328	31,00	177	13,19	109	8,13	
604	12700	1234	63,16	798	64,64	316	25,60	556	28,43	164	8,41	
611	5400	1668	79,57	631	37,83	926	55,53	404	19,28	24	1,15	
612	4500	1101	61,28	633	57,52	385	35,00	539	30,02	156	8,70	
641	7400	1721	84,22	1148	66,74	476	27,68	238	11,64	85	4,14	

ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM DERMATOLOGIA SANITÁRIA DONA LIBÂNIA - CDERM

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto CEP/CDERM – 011/07

Título: Portadores de Hanseníase: Estudo Clínico - epidemiológico da Hanseníase em Área Endêmica do Nordeste do Brasil

Pesquisador responsável: Lígia Regina Franco Sansigolo Kerr

Proposição do (a) relator (a):

- aprovação
 aprovação com pendências
 não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP/CDERM – 12/09/2007

Data do parecer final do projeto pelo CEP/CDERM: 12/09/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia CDERM, em sua reunião realizada em 12/09/2007, decidiu APROVAR, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observações:

1. Declaramos que a Dra. Maria Araci Pontes, membro deste CEP, não participou da avaliação do projeto em questão, abstendo-se de votar, para evitar conflito de interesses.
2. O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa ao CEP/CDERM.

Fortaleza, 13 de setembro de 2007.


Dra. Lucy Maria Landim Tavares
Vice-Coordenadora do CEP/CDERM

