



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

**BÁRBARA OSÓRIO XAVIER MONTEZUMA**

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS EM SANGUE PERIFÉRICO EM  
PACIENTES COM FORMAS REACIONAIS DE HANSENÍASE ATENDIDOS NO  
CENTRO DE DERMATOLOGIA D. LIBÂNIA, EM FORTALEZA- CE**

**Fortaleza  
2011**

BÁRBARA OSÓRIO XAVIER MONTEZUMA

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS EM SANGUE PERIFÉRICO EM  
PACIENTES COM FORMAS REACIONAIS DE HANSENÍASE ATENDIDOS NO  
CENTRO DE DERMATOLOGIA D. LIBÂNIA, EM FORTALEZA- CE**

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

Orientador:

**Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas**

Coorientador:

**Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz**

**Fortaleza  
2011**

BÁRBARA OSÓRIO XAVIER MONTEZUMA

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS EM SANGUE PERIFÉRICO EM  
PACIENTES COM FORMAS REACIONAIS DE HANSENÍASE ATENDIDOS NO  
CENTRO DE DERMATOLOGIA D. LIBÂNIA, EM FORTALEZA- CE**

**Dissertação apresentada à coordenação da Pós-graduação em Patologia na 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

---

Prof. Dr. Paulo Louzada Junior (membro)  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo- USP

---

Prof. Dr. Heitor de Sá Gonçalves (membro)  
Secretaria de Saúde do Ceará- SESA  
Universidade Estadual do Ceará- UECE

---

Prof. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara (membro)  
Departamento de Patologia e Medicina Legal  
Universidade Federal do Ceará- UFC

**Fortaleza  
2011**

Às pessoas com hanseníase que sofrem muito até encontrarem atendimento, diagnóstico e, principalmente, cura.

A todos os professores que já tive a honra de ser aluna. Cada um me fez entender a importância do conhecimento como ferramenta para realizar sonhos e conquistar o mundo.

Aos meus pais, meus primeiros e mais importantes professores.

Ao meu marido maravilhoso que sempre me incentivou a lutar e vibrou a cada conquista.

Ao meu filho, que está por vir, para que ele também descubra as maravilhas do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força, coragem e inteligência. Por me guiar diariamente e me fazer trilhar caminhos retos.

Aos meus pais, meus grandes e eternos mestres. Por acreditarem na minha capacidade e me apoiarem sempre, mesmo não concordando, às vezes, com algumas decisões.

Aos meus irmãos queridos, Ernane e Luís Eduardo, com os quais aprendi a cuidar, a amar imensamente e conviver com as diferenças.

Ao meu grande amor e amigo, Marcos Fábio, por me incentivar e acreditar que sempre é possível conquistar mais.

À minha família Gungum, Nelita, tia Nininha, tio Tiê, tia Teteta, tio Nelson, tio Coquinho, Tidé, tia Xexeca, tio Ângelo, tia Fátima, tio Hamilton, Tiezinho, Josy, Nanda, Nane, Neuza, Diego, Thiago, Joaquim, Airton, Bruno, André, Tatá, Miguel, Leninha e D. Lenilce por torcerem pelas minhas vitórias.

À minha amiga Adriana Carvalho, por ter me falado da inscrição do mestrado e ter me incentivado a fazê-la.

Ao professor e grande exemplo de profissional Dr. Max Victor que confiou em mim mesmo antes de ser aluna efetiva do mestrado, por toda a dedicação que tive na realização desse trabalho, por todas as correções e palavras necessárias no momento exato.

Ao professor Dr. Ajax, por ter contribuído na construção do conhecimento e no desenvolvimento desse trabalho.

À coordenação da Pós-graduação em Patologia, representada pela professora Dra. Margarida Pompeu, por ter me acolhido e me apoiado até a conclusão do curso, mesmo com todas as dificuldades que tive no caminho.

À FUNCAP e à CAPES, pelo apoio financeiro concedidos através de bolsas em períodos diferentes.

Aos professores do mestrado. Todos foram maravilhosos! Eles também foram essenciais à construção do conhecimento aqui expresso, em especial ao professor Naidu, que, com sua experiência e simplicidade, nos mostrou a imunologia como uma ciência agradável e fascinante.

Aos profissionais do Centro de Dermatologia D. Libânia (CDerm): Mikaelly, Marymar, D. Eliane, César, D. Ilma e demais profissionais que, de alguma forma, contribuíram para a construção desse trabalho.

À Fabíola e à Kélvia, do Laboratório de Imunofenotipagem da UFC, que me ajudaram na realização das análises, a fazer alguns cálculos e a entender diversos resultados.

À Vitória e à Lívia, também orientandas do Dr. Max Victor, que me socorreram inúmeras vezes na difícil missão de coletar as amostras, pegar dados nos prontuários e tudo mais que fosse preciso no CDerm.

Aos alunos do Dr. Ajax, que várias vezes também foram ao CDerm para me ajudar.

Ao Dr. Heitor Gonçalves por ter cedido as fotos para ilustração da introdução e pelas valiosas contribuições dadas à qualificação.

Ao Dr. Telmo Valença pelas importantes considerações feitas na qualificação.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

## RESUMO

A hanseníase é uma doença crônica granulomatosa com alta infectividade, porém baixa patogenicidade, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Este estudo teve como objetivo descrever as subpopulações de linfócitos T totais (CD3<sup>+</sup>), T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, B (CD19<sup>+</sup>), *Natural killers*-NK (CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) e T *Natural killers* -NKT (CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) em pacientes com formas reacionais de hanseníase, compará-los com os que não apresentaram formas reacionais de hanseníase e diferenciar as alterações linfocitárias entre os pacientes com o reação tipo 1 e tipo 2. Participaram do estudo 71 pacientes (47 homens), dos quais 37 pacientes apresentaram formas reacionais de hanseníase (R+), sendo 3 antes do tratamento multidrogaterapia-MDT (An), 9 durante a MDT (Du) e 25 após a MDT (Ap). Os 34 pacientes restantes não apresentaram formas reacionais (R-), desses, 5 ainda não haviam iniciado a MDT (An), 8 estavam em tratamento MDT (Du) e 21 já haviam terminado a MDT (Ap). Foi utilizada citometria de fluxo para a quantificação dos linfócitos e o programa Graph Pad Prisma 4.0 para as análises estatísticas. Não foram observadas diferenças significativas nos linfócitos na comparação entre os grupos de pacientes com e sem reação, porém foi encontrada redução das células NK no subgrupo R+/Ap, quando comparado ao R-/Ap (p= 0,0228) e nos linfócitos NKT também houve redução do subgrupo R-/Ap comparado ao R-/An (p< 0,05). Quanto à forma reacional (tipo 1, tipo 2 ou mista), foi observado aumento da população de células CD19+ nas formas mistas.

**Palavras-chaves:** Hanseníase, Reações hansênicas, subpopulações linfocitárias.



## ABSTRACT

Leprosy is a granulomatous chronic disease which is highly infectious but has low pathogenicity and is caused by the *Mycobacterium leprae*. This study aims at describing the lymphocytes subsets T total (CD3<sup>+</sup>), T helper (CD4<sup>+</sup>), T cytotoxic (CD8<sup>+</sup>), T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, B (CD19<sup>+</sup>), natural killers-NK (CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) and T natural killers - NKT (CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) in patients with leprosy reactions, compare them with the ones who did not show leprosy reactions and differentiate the alterations of lymphocyte between the patients with type 1 and type 2 reactions. We used flow cytometry to quantify the lymphocytes and the Graph Pad Prism 4.0 program for the statistical analysis. We formed subgroups according to the presence (R+) or not (R-) of reaction and the period in which the patient was concerning to the multidrug therapy (MDT): before (An), during (Du) and after (Ap). We did not observe any significant differences in the lymphocytes between the groups with and without reaction, but we observed a decreased NK count in the R+/Ap subgroup when compared to the R-/Ap (p= 0,0228) and a decreased NKT count in the R-/Ap subgroup when compared to R-/An X (p< 0,05). Regarding to the reactional forms (type 1, type 2 or mixed), we observed an increase of the CD19<sup>+</sup> cell population in the mixed forms.

**Key words:** Leprosy, Leprosy reactions, lymphocytes subsets.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APC** do inglês: “*Antigen- Presenting Cells*”- células apresentadoras de antígenos  
**CDerm:** Centro de Dermatologia D. Libânia  
**CD3<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 3  
**CD4<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 4  
**CD8<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 8  
**CD16<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 16  
**CD19<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 19  
**CD45<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 45  
**CD56<sup>+</sup>** do inglês: “*Cluster of differentiation*” 56  
**CRP** Proteína “C” reativa  
**CXCL-10** quimiocina 10 motivo C-X-C  
**DC** do inglês: “*Dendritic cells*”- células dendríticas  
**EDTA** Ácido Etilenodiamino-tetrácetico  
**ENH** Eritema Nodoso Hansênico  
**IFN- $\gamma$**  Interferon gama  
**IL-1** Interleucina 1  
**IL-2** Interleucina 2  
**IL-4** Interleucina 4  
**IL-6** Interleucina 6  
**IL-7** Interleucina 7  
**IL-8** Interleucina 8  
**IL-10** Interleucina 10  
**IL-12** Interleucina 12  
**IL-18** Interleucina 18  
**IL-18R** Receptor de Interleucina 18  
**KIR** do inglês: “*killer-cell immunoglobulin-like receptor*”  
**Linfócitos B** linfócitos CD19<sup>+</sup>  
**Linfócitos T** linfócitos CD3<sup>+</sup>  
**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*  
**LT  $\alpha$**  Linfotoxina  $\alpha$   
**LT  $\beta$**  Linfotoxina  $\beta$   
**MB** Multibacilar  
**MCP- 1** proteína quimioatrativa de monócitos 1  $\alpha$   
**MDT-** Multidrogaoterapia  
**M. leprae** *Mycobacterium leprae*  
**OMS** Organização Mundial de Saúde  
**PB** Paucibacilar  
**PBMC** células mononucleares do sangue periférico  
**PDGF-BB** fator de crescimento derivado da plaqueta BB  
**PQT** Poliquimioterapia  
**sIL-6R** Receptor solúvel da interleucina 6  
**SIDA** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**SUS** Sistema Único de Saúde

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

**TNF-  $\alpha$**  Fator de necrose tumoral-  $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Forma tuberculóide.....	21
FIGURA 2	Forma <i>borderline</i> tuberculoide.....	21
FIGURA 3	Forma <i>borderline borderline</i> .....	22
FIGURA 4	Forma <i>borderline</i> virchowiana.....	22
FIGURA 5	Paciente com hanseníase virchowiana.....	23
FIGURA 6	Reação tipo 1.....	26
FIGURA 7	Reação tipo 2.....	27
FIGURA 8	Cartela do esquema PB-MDT fornecida pela OMS e disponível no SUS.....	29
FIGURA 9	Cartela do esquema MB-MDT fornecida pela OMS e disponível no SUS.....	29
FIGURA 10	Esquema de formação de grupos e subgrupos para estudo das subpopulações linfocitárias.....	44
FIGURA 11	Estratégia de <i>gating</i> para determinação das subpopulações linfocitárias: linfócitos T totais, T citotóxicos e T auxiliares.....	49
FIGURA 12	Estratégia de <i>gating</i> para determinação de subpopulações linfocitárias NKT, NK e B.....	50
FIGURA 13	Gênero dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo .....	51
FIGURA 14	Faixa etária dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo .....	52
FIGURA 15	Mapa das Secretarias Executivas Regionais (SER) de Fortaleza .....	53
FIGURA 16	Distribuição geográfica dos pacientes incluídos no estudo por SER de Fortaleza.....	53
FIGURA 17	Índice baciloscópico dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo.....	54
FIGURA 18	Forma clínica (Ridley- Jopling) dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo.....	54
FIGURA 19	Média dos valores da contagem de linfócitos T em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase.....	55

FIGURA 20	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T totais, presença de reação e período do tratamento.....	56
FIGURA 21	Média dos valores da contagem de linfócitos T nos seis subgrupos estudados.....	56
FIGURA 22	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase (p>0,05) .....	57
FIGURA 23	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T auxiliares, presença de reação e período do tratamento.....	57
FIGURA 24	Média dos valores da contagem de linfócitos T auxiliares nos seis subgrupos estudados (p>0,05).....	58
FIGURA 25	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase.....	58
FIGURA 26	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T citotóxicos, presença de reação e período do tratamento.....	59
FIGURA 27	Média dos valores da contagem de linfócitos T citotóxicos nos seis subgrupos estudados.....	59
FIGURA 28	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase (p>0,05).....	60
FIGURA 29	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , presença de reação e período do tratamento.....	60
FIGURA 30	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> nos seis subgrupos estudados (p>0,05).....	61
FIGURA 31	Média dos valores da contagem de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase (p>0,05).....	61
FIGURA 32	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos B, presença de reação e período do tratamento.....	62
FIGURA 33	Média dos valores da contagem de linfócitos B nos seis subgrupos estudados (p>0,05).....	62
FIGURA 34	Média dos valores da contagem de linfócitos NK CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase (p>0,05).....	63
FIGURA 35	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos NK, presença de reação e período do tratamento.....	63
FIGURA 36	Média dos valores da contagem de linfócitos NK nos seis subgrupos estudados.....	64

FIGURA 37	Média dos valores da contagem de linfócitos NKT CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase (p>0,05).....	64
FIGURA 38	Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos NKT, presença de reação e período do tratamento.....	65
FIGURA 39	Média dos valores da contagem de linfócitos NKT nos seis subgrupos estudados.....	65
FIGURA 40	Média dos valores da contagem de linfócitos T nos diferentes tipos de reação.....	66
FIGURA 41	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.....	67
FIGURA 42	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.....	68
FIGURA 43	Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.....	68
FIGURA 44	Média dos valores da contagem de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.....	69
FIGURA 45	Média dos valores da contagem de linfócitos NK nos diferentes tipos de reação.....	70
FIGURA 46	Média dos valores da contagem de linfócitos NKT nos diferentes tipos de reação.....	70

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Doença</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3</b>	<b>Formas clínicas</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Formas reacionais</b> .....	<b>24</b>
1.4.1	Reação tipo 1 .....	25
1.4.2	Reação tipo 2 .....	26
<b>1.5</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>28</b>
1.6.1	Multidroga terapia (MDT).....	28
1.6.2	Tratamento das Reações hansênicas.....	30
1.6.3	Multidroga terapia Uniformizada (MDT-U) .....	31
<b>1.7</b>	<b>Resposta imunológica na hanseníase e nas formas reacionais</b> .....	<b>31</b>
<b>1.8</b>	<b>Subpopulações de linfócitos</b> .....	<b>35</b>
1.8.1	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	35
1.8.2	Linfócitos NK.....	37
1.8.3	Linfócitos NKT .....	39
1.8.4	Linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) .....	40
<b>1.9</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	<b>41</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Pacientes</b> .....	<b>44</b>
3.1.1	Critérios de inclusão .....	44
3.1.2	Critérios de exclusão .....	45
<b>3.2</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>45</b>
3.3.1	Coletas das amostras de sangue periférico .....	45
3.3.2	Hemograma .....	46
3.3.3	Baciloscopia .....	46

3.3.4	Biópsia.....	47
3.3.5	Pesquisa de subpop. linfocitárias de sangue periférico por citometria de fluxo	47
3.3.5.1	Aquisição.....	47
3.3.5.2	Estratégia de <i>Gating</i> .....	48
<b>3.4</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização da amostra.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Contagem de subpopulações linfocitárias .....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Comparação de grupos com e sem formas reacionais de hanseníase e subgrupos de acordo com o período da MDT .....	55
4.2.1.1	Linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> ) .....	55
4.2.1.2	Linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ).....	56
4.2.1.3	Linfócitos T citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ).....	58
4.2.1.4	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> .....	59
4.2.1.5	Linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) .....	61
4.2.1.6	Linfócitos NK (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ).....	62
4.2.1.7	Linfócitos NKT (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ) .....	64
4.2.2	Comparação de grupos por forma reacional.....	65
4.2.2.1	Linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> ) .....	66
4.2.2.2	Linfócitos T auxiliares (CD4 <sup>+</sup> ).....	66
4.2.2.3	Linfócitos T citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ).....	67
4.2.2.4	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> .....	68
4.2.2.5	Linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) .....	69
4.2.2.6	Linfócitos NK (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ).....	69
4.2.2.7	Linfócitos NKT (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ) .....	70
4.2.3	Comparação de grupos por forma clínica.....	71
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>94</b>



## INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença

Desde séculos passados a hanseníase é reconhecidamente uma doença que aflige a humanidade. Questiona-se onde ela surgiu, se na Ásia ou na África (EIDT, 2004). Ainda hoje há regiões com alta endemicidade (TEIXEIRA *et al.*, 2010a), incluindo-se o Brasil, sendo acometidos milhões de pessoas e, em muitos casos levando a incapacidade física (EIDT, 2004; BENNETT *et al.*, 2008). Infelizmente, quem sofre com hanseníase ainda é estigmatizado (BENNETT *et al.*, 2008).

A hanseníase foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses e teve seus primeiros casos notificados em 1600 no Rio de Janeiro, sendo posteriormente disseminada aos locais de maior crescimento populacional, como Pernambuco, Bahia e São Paulo. 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).

Na região metropolitana de Manaus, AM, Brasil, entre 1985 e 2005, 10,4% dos casos diagnosticados de hanseníase foram em menores de 15 anos. Entre 1998 e 2003, a taxa de detecção desse grupo foi considerada hiperendêmica, caindo nos anos seguinte, mas ainda apresentando níveis endêmicos (IMBIRIBA *et al.*, 2008).

A hanseníase é uma doença crônica granulomatosa com alta infectividade, porém de baixa patogenicidade (TEIXEIRA *et al.*, 2010a; BRASIL, 2008b) e apresenta um período longo de incubação, levando muitos anos desde a infecção pelo bacilo até o desenvolvimento da doença (MENDONÇA *et al.*, 2008a; BENNETT *et al.*, 2008).

A doença resulta da infecção pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e sua transmissão ocorre por contato direto, através das vias aéreas superiores (ARAÚJO, 2003). A presença dos bacilos nas lesões de pele e em secreções nasais de pacientes multibacilares não tratados leva a uma maior disseminação do *M. leprae*, e, conseqüentemente, maior transmissão da doença (JOB *et al.*, 2008).

Encontrou-se 48% de positividade em biópsia nasal de pacientes não tratados, em estudo realizado em Uberlândia, MG, Brasil, com 227 pacientes com hanseníase (MELO NAVES *et al.*, 2009). Esses pacientes podem transmitir a hanseníase antes de iniciar o

tratamento específico, mas, após o início do tratamento, os bacilos se tornam inviáveis pela alta sensibilidade ao esquema de multidroga terapia (BRASIL, 2008b).

O risco de desenvolver hanseníase em relação à população normal é duas vezes maior quando um membro da família tem hanseníase paucibacilar e de cinco a oito vezes maior se for multibacilar (FINE *et al.*, 1997). Além disso, contactantes de casos do gênero masculino têm risco aumentado de ter hanseníase do que os de casos do gênero feminino (SALES *et al.*, 2011).

As variáveis sócio-econômicas associadas ao aumento do risco de ter hanseníase são: baixo nível de escolaridade, escassez de comida em algum período da vida e moradia em casa com chão de barro ou de areia nos últimos dez anos (KERR-PONTES *et al.*, 2006).

Foi encontrada associação significativa entre os contatos diagnosticados com hanseníase de casos da doença e os seguintes fatores: poucos anos de escolaridade, renda familiar inferior a três salários mínimos, relação de consanguinidade entre o contato e o caso, proximidade com o caso por, no mínimo, cinco anos, idade maior de 15 anos. Também houve relação de proteção nos indivíduos que haviam tomado a BCG (SALES *et al.*, 2011).

Além disso, há relatos de associação de genes do HLA, expressos no braço curto do cromossomo 6, com a susceptibilidade aumentada à hanseníase. As presenças de HLA-DR2 ou HLA-DR3 determinam maior risco para o surgimento de hanseníase, particularmente da forma tuberculoide (SERGEANTSON, 1983; OTTENHOFF; VRIES, 1987).

No Vietnã, foi encontrado gene de susceptibilidade à hanseníase na região cromossômica 6q25 (MIRA *et al.*, 2003).

Em cultura de sangue total de pacientes que portavam o alelo -308A, após o estímulo de lipopolissacarídeo e *M. Leprae*, houve um aumento nos níveis de TNF, reforçando a associação entre TNF e hanseníase e sugerindo o alelo -308<sup>a</sup> como um marcador de resistência à doença (CARDOSO *et al.*, 2011).

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).

Em estudo realizado em Fortaleza, Ceará, para estimar, entre os portadores de hanseníase, a proporção de casos com neuropatia silenciosa e grau de incapacidade. Foram encontrados, entre os 233 avaliados, 18,5% com grau de incapacidade I e 9,4% de grau II e

5,6% com neuropatia silenciosa. Foi observado que a idade e o grau de incapacidade estavam associados à ocorrência da neuropatia silenciosa (LEITE *et al.*, 2011).

## 1.2 Epidemiologia

Em 2010, foram detectados 228.488 casos novos de hanseníase no mundo. Somente nas Américas houve 37.740 novos casos, sendo o Brasil o principal responsável nesse continente com 34.894. Foi o segundo país no mundo em número de casos, perdendo apenas para a Índia (OMS, 2012).

No Ceará a hanseníase é endêmica e ocupa o 13º lugar em número de casos no Brasil e 4º lugar no Nordeste. Entre 2001 e 2011, a média de casos novos detectados foi de 2.502. Em 2011, o Ceará apresentou um alto coeficiente de detecção geral em 100.000 habitantes, que foi de 23,7 e de 5,0 em menores de 15 anos. O número de casos novos foi de 2003, dos quais 5,6% foram em menores de 15 anos, 60,6% dos contatos intradomiciliares foram examinados e 81,4% dos pacientes diagnosticados com hanseníase receberam alta por cura (CEARÁ, 2012).

Os municípios cearenses com mais casos novos foram: Fortaleza (639), Juazeiro do Norte (95), Sobral (85), Maracanaú (79) e Caucaia (59) e com os maiores coeficientes de detecção geral foram: Apuiarés (86,2), Cedro (85,6), Cariré (76,3), Uruburetama (75,9) e Jucás (75,6) (CEARÁ, 2012).

Os 184 municípios do estado do Ceará foram avaliados em relação à capacidade de diagnóstico de casos novos e realização de exames. O resultado dessa avaliação mostrou que 76 (41,3%) municípios são considerados bons, 26 (14,3%) são regulares, 54 (29,3%) silenciosos (onde não houve contatos intradomiciliares examinados) e 28 (9,8%) precários. (CEARÁ, 2012).

### 1.3 Formas clínicas

As formas clínicas variam do polo tuberculóide, em que predomina a resposta imunológica celular, até o polo virchowiano, no qual há predomínio da resposta imunológica humoral (ARAÚJO, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2008a; IYER *et al.*, 2007).

Há duas classificações clínica-imunológicas adotadas no mundo atualmente: a de Madrid (CONGRESSO DE MADRID, 1953) e de Ridley–Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966) e uma classificação operacional: a da Organização Mundial de Saúde- OMS (BRASIL, 2008a).

A de Madrid considera as formas clínicas da hanseníase como virchowiana (V) e tuberculóide (T), que são dois pólos estáveis e opostos e dois grupos instáveis: *borderline* (B) e indeterminado (I), os quais caminhariam para um dos pólos na evolução da doença (CONGRESSO DE MADRID, 1953).

A de Ridley–Jopling associa os aspectos imunológicos à baciloscopia. Nessa classificação as formas intermediárias são subdivididas em *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline - borderline* (BB) e *borderline -virchowiana* (BV) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Por fim, há a classificação operacional adotada pela OMS, em que são caracterizadas duas formas para fins de tratamento. Classifica-se o paciente como paucibacilar (PB) quando há menos de 5 lesões como multibacilar (MB) quando há mais de 5 lesões. Os critérios da OMS também são adotados pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2008a).

Entre 1985 e 2005, na região metropolitana de Manaus, AM, Brasil, a forma clínica mais frequente foi a tuberculóide seguida da *borderline* e o esquema de tratamento mais realizado foi o paucibacilar (IMBIRIBA *et al.*, 2008).

A forma tuberculóide apresenta-se com lesão ou lesões em forma de placa, máculas ou pápulas atróficas, hipopigmentadas, bem definidas, eritematosas e com bordas bem definidas. Frequentemente as áreas das lesões são sem pelos, hipodérmicas, sem sensibilidade dolorosa, térmica ou tátil e têm o desenvolvimento lento (Figura 1).



**Figura 1:** Forma tuberculóide.

Presença de lesões com bordas bem definidas, típicas da forma tuberculóide. a) Na face e b) no braço.

Fonte: Fotos cedidas pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.

O grupo de pacientes que apresentam a forma *borderline* é bastante heterogêneo, já que essa forma clínica é caracterizada por instabilidade imunológica, podendo ter semelhança à tuberculóide ou à virchowiana (SOUZA, 1997). Alguns pacientes têm uma progressão para o polo virchowiano, enquanto outros apresentam reação tipo 1 (reação reversa) (BRITTON; LOCKWOOD, 2004) (figuras 2 e 3).



**Figura 2:** Forma *borderline* tuberculóide.

Lesões cujas bordas não são bem definidas como na forma tuberculóide.

Fonte: Fotos cedidas pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.



**Figura 3:** Forma *borderline borderline*.

Fonte: Foto cedida pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.

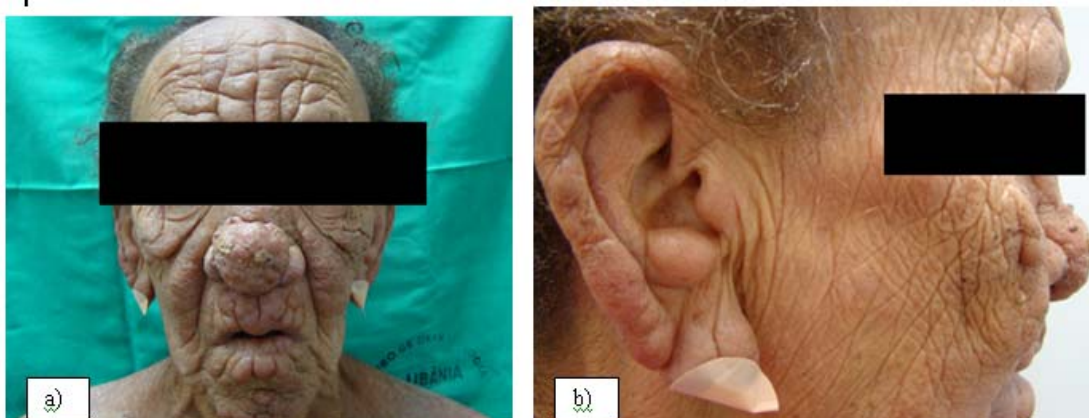
Na hanseníase *borderline virchowiana* (figura 4) ocorre um grande número de lesões com diversos tipos de lesão como: infiltração, placas (algumas com região central normal e bordas externas mal-definidas) e nódulos. Diferente da forma *virchowiana*, as lesões não são tão simétricas. Há espessamento de muitos troncos nervosos. A baciloscopia é positiva, com numerosos bacilos. A classificação clínica dos pacientes *borderline* é, em geral, difícil (MATSUO *et al.*, 2010).



**Figura 4:** Forma *borderline virchowiana*.

Fonte: Foto cedida pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.

O Polo Virchowiano (VV) é onde ocorre a menor imunidade celular, por isso menor resposta contra o *M. leprae*. Alguns pacientes apresentam essa forma desde o início, ou como uma evolução das formas *borderline* (BB ou BV). Na sua evolução ocorrem pápulas, nódulos e máculas, infiltrações progressivas e difusas pela pele, mucosas, vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo acometer também linfonodos, fígado e baço. As infiltrações são mais acentuadas na face em membros. A pele torna-se xerótica, com madarose (queda de pêlos). Há comprometimento neural em troncos neurais, ramos da pele e vasculares. Por serem pacientes altamente bacilíferos, são considerados focos infecciosos quando não tratados (ARAÚJO, 2003) (Figura 5).



**Figura 5:** Paciente com hanseníase virchowiana. Apresentação clássica da hanseníase virchowiana com face “leonina”. Há infiltração difusa da face (a) e no pavilhão auricular (b).  
Fonte: Fotos cedidas pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.

Existe ainda uma forma clínica rara que ocorre em 1 a 2% dos casos de hanseníase, a forma históide (MENDIRATTA *et al.*, 2011). Ela foi descrita originalmente em 1963 e aparece em forma de lesões firmes, discretas e em nódulos de formato de cúpula sobre pele aparentemente normal em pacientes com hanseníase virchowiana (WADE, 1963). A etiopatogênese ainda não está bem compreendida, mas acomete pessoas que apresentaram recidiva ou que se trataram inadequadamente com monoterapia de dapsona ou MDT (RODRIGUEZ, 1969).

Em estudo realizado na Índia durante nove anos, foram encontrados 1,14% dos pacientes com a forma históide. Todos apresentaram as características clínicas típicas:

numerosos nódulos brilhantes, suculentos e macios em forma de cúpula sobre pele aparentemente normal, juntamente com placas e pápulas. As principais áreas afetadas foram as nádegas, costas, face e extremidades (MENDIRATTA *et al.*, 2011).

#### 1. 4 Formas reacionais

Os pacientes com hanseníase podem ser acometidos por quadros reacionais denominadas reações hansênicas, que são reações agudas decorrentes da reativação da resposta imunológica celular e estão ligadas à intensa produção de citocinas inflamatórias (ESQUENAZI *et al.*, 2008).

As reações ocorrem em cerca de 10 a 50% dos casos, principalmente nas formas multibacilares, e, por vezes, são responsáveis pelo abandono do tratamento (TEIXEIRA *et al.*, 2010a ). Elas podem surgir antes do início, durante ou após o tratamento específico da doença e dependem da carga bacilar e da resposta imunológica do paciente (MENDONÇA *et al.*, 2008a). Em um centro de dermatologia em Juiz de Fora, MG, Brasil, 74,4% das reações hansênicas ocorreram no primeiro ano pós-PQT (SOUZA, 2010).

As reações hansênicas são manifestações imunológicas de hipersensibilidade contra antígenos do *M. leprae* que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, além da formação e deposição de imunocomplexos (TEIXEIRA *et al.*, 2010b).

Dos pacientes tratados contra hanseníase entre 1985 e 2005 no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil, 29,2% apresentaram reações hansênicas, sendo 58,5% delas do tipo 2 e a maioria dos pacientes acometidos tinha a forma clínica virchowiana (PENNA *et al.*, 2008).

Em estudo realizado em Picos, PI, Brasil com pacientes que apresentaram as formas clínicas D ou V (classificação de Madrid) encontrou-se 29% das mulheres e 83% dos homens com formas reacionais. Nas mulheres, o percentual de reações hansênicas foi significativamente maior entre as que estavam em idade fértil, que tinham seis ou mais lesões e com índice baciloscópico igual ou maior a 3, enquanto que nos homens não se observou nenhuma diferença quanto aos fatores citados (MASTRANGELO *et al.*, 2011).



Pacientes com a forma *borderline*, quando apresentam reações hansênicas, podem apresentar dor neural, paralisia súbita, aparecimento de novas lesões, dor nos olhos e febre (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Alterações neurofisiológicas nos cotovelos indicam processos axonais e de desmielinização do nervo ulnar (GARBINO *et al*, 2010) com maior frequência na reação tipo 1, do que na tipo 2 (GARBINO, 2006). Mudanças na desmielinização como bloqueio de condução é um evento primário e agudo observado regularmente na reação tipo 2. Já na reação tipo 1 foi observada dispersão temporal como um fenômeno subagudo. Em ambas as reações, ocorre a remielinização após o tratamento com corticóides (GARBINO *et al*, 2010).

#### 1.4.1 Reação tipo 1

A classificação das reações se dá conforme o surgimento dos sinais e sintomas. Na reação do tipo 1, ocorre a hipersensibilidade mediada por células (ASZ-SIGALL *et al*, 2008). Caracteriza-se pela reativação de lesões preexistentes do tipo placa com sinais de inflamação aguda, tais como eritema, edema, e aparecimento de lesões novas semelhantes às anteriores, espessamento de nervos periféricos acompanhados de dor espontânea ou decorrente de compressão, distúrbios sistêmicos como mal-estar geral e, eventualmente, febre (VALENTINI *et al*, 1999; SILVA; GRIEP, 2007). Esta forma ocorre mais frequentemente em pacientes com as formas *borderline* (ASZ-SIGALL *et al*, 2008) (Figura 6).

Do ponto de vista histológico, observa-se padrão tuberculoide ou *borderline* associado a fenômenos exsudativos com edema, deposição de fibrina, necrose tecidual, que caracterizam reação inflamatória granulomatosa (URA, 2007).



**Figura 6:** Reação tipo 1.

Paciente com a forma clínica *borderline* tuberculoide e múltiplas lesões características de reação tipo 1.

Fonte: Foto cedida pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.

#### 1.4.2 Reação tipo 2

Na reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), ocorre resposta inflamatória devido à deposição de imunocomplexos em vasos, glomérulos, articulações (ASZ-SIGALL *et al*, 2008). IYER *et al* (2007) encontraram concentrações séricas elevadas de IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma virchowiana da doença, que apresentavam a reação do tipo 2. Há um aumento de morte bacteriana nos episódios reacionais (VIEIRA *et al*, 1996).

Esta reação caracteriza-se por nódulos dérmicos ou subcutâneos eritematosos, quentes, móveis, às vezes, dolorosos, lesões eritematosas com vesículas, bolhas, evoluindo para ulcerações e sintomas sistêmicos como febre, adenomegalia, perda de peso, artralgia, mialgia. Também ocorre espessamento, dor e sensibilidade de nervos (Figura 7) (VALENTINI *et al*, 1999; SILVA; GRIEP, 2007).

Durante os surtos reacionais de ENH há aumento da produção de TNF- $\alpha$ , associado à elevação de proteína C reativa (CRP). Mostrando que o TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, pode atuar estimulando a reação inflamatória aguda medida pelos altos níveis de CRP, que favorece o aparecimento dos sintomas característicos do surto reacional (FOSS; OLIVEIRA; SILVA, 1993).



**Figura 7:** Reação tipo 2.

Paciente com hanseníase virchowiana apresentando múltiplos eritemas característicos da reação tipo 2. a) lesões no braço e b) detalhe aproximado do item a.

Fonte: Fotos cedidas pelo Dr. Heitor Gonçalves- Arquivo pessoal.

Já foi descrita uma reação que se assemelha à do tipo 2 em que ocorrem sintomas sistêmicos como febre alta, edema nos membros e na face, linfadenopatia regional e lesões eritematosas que, contrárias ao eritema nodoso hansênico ou ao necrotizante, forma placas superficiais, bolhas e ulcerações. As lesões têm bordas bem definidas, algumas secas e outras com secreção serosa (ESQUENAZI *et al.*, 2008).

## 1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, mas é auxiliado por exames complementares como a baciloscopia de linfa e da lesão (BRASIL, 2002) e o histopatológico da lesão (CHIMELLI; FREITAS; NASCIMENTO, 1997).

A avaliação clínica conta com a anamnese, considerando-se a história clínica e epidemiológica, a avaliação dermatológica para a identificação de lesões de pele com alteração de sensibilidade, a avaliação neurológica em que se identificam neurites, incapacidades e deformidades (BRASIL, 2002).

Também deve ser feito diagnóstico de estados reacionais, diagnóstico diferencial com outras doenças de pele e classificação do grau de incapacidade física (BRASIL, 2002).

O diagnóstico de hanseníase pode ser definido quando há lesões de pele com alteração de sensibilidade, acometimento de nervos com espessamento neural e baciloscopia positiva (BRASIL, 2002). No entanto, a baciloscopia negativa não exclui o diagnóstico de hanseníase (BRASIL, 2008b) enquanto que, a positiva define o diagnóstico como MB (multibacilar) para fins de tratamento (BRASIL, 2010).

A realização de biópsia para o exame histopatológico é de suma importância principalmente para determinar o diagnóstico de hanseníase quando não há lesões visíveis (CHIMELLI; FREITAS; NASCIMENTO, 1997). É importante a experiência clínica do médico no diagnóstico, já que o resultado da clínica pode divergir do da biópsia. Em estudo no Egito observou-se divergência de resultados em 32% dos pacientes (RASHED *et al.*, 2009).

A avaliação neurológica é feita no diagnóstico, mas também durante e após o tratamento MDT, na ocorrência de neurites ou reações. Os principais nervos acometidos são: trigêmeo, facial, radial, ulnar, mediano, fibular comum e tibial posterior (BRASIL, 2002).

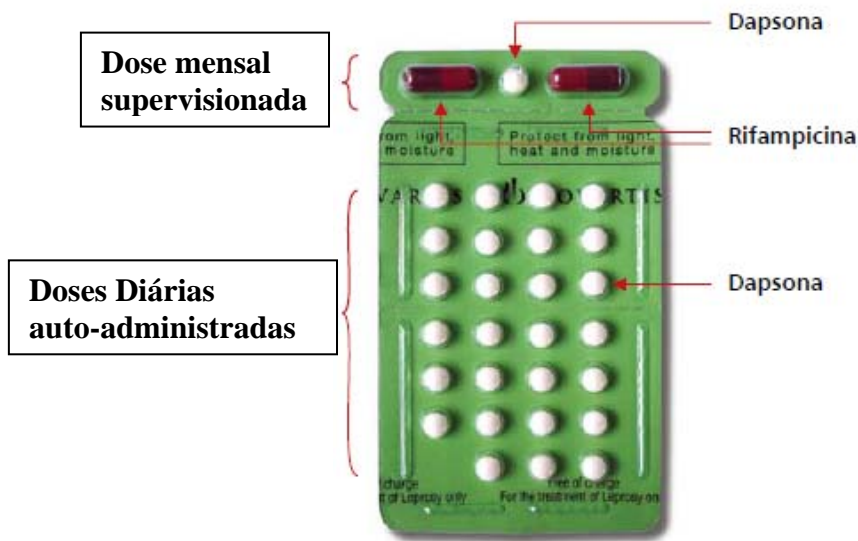
A biópsia nasal pode ser muito útil no auxílio diagnóstico, por encontrar positividade de bacilos decrescente de pacientes do polo virchowiano ao polo tuberculoide, porém ainda não é utilizada na rotina, apenas em pesquisa (MELO NAVES *et al.*, 2009).

## **1.6 Tratamento**

### **1.6.1 Multidroga terapia (MDT)**

O primeiro fármaco utilizado no tratamento da hanseníase foi a dapsona, utilizada desde a década de 1950. Por alguns anos foi realizada a monoterapia, até a introdução da clofazimina e da rifampicina em 1962 (GOULART *et al.*, 2002). Atualmente, a terapia recomendada é chamada de poliquimioterapia (PQT) ou multidrogaterapia (MDT).

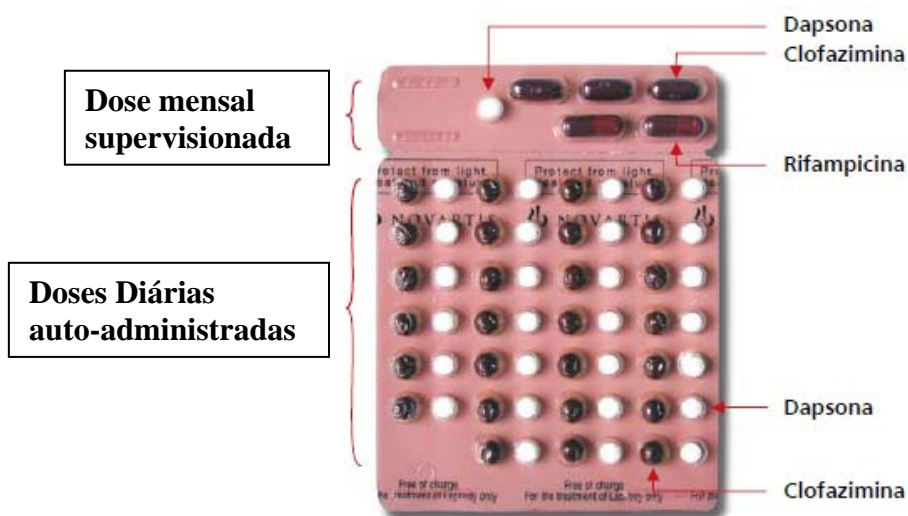
O tratamento das formas paucibacilares é composto por uma dose mensal supervisionada de 600mg de rifampicina, 100mg de dapsona mais 27 doses diárias de 100mg de dapsona. O tratamento é feito em 6 doses e concluído em até 9 meses (Figura 8).



**Figura 8:** Cartela do esquema PB-MDT fornecida pela OMS e disponível no SUS.

Fonte: BRASIL, 2008a

O tratamento das formas multibacilares é composto por uma dose mensal supervisionada de 600mg de rifampicina, 100mg de dapsona e 300mg de clofazimina e mais 27 doses compostas por 100mg de dapsona e 50mg de clofazimina. O tratamento é realizado em 12 doses e concluído em até 18 meses (Figura 9).



**Figura 9:** Cartela do esquema MB-MDT fornecida pela OMS e disponível no SUS.

Fonte: BRASIL, 2008a.

Em estudo realizado em setenta e oito municípios do Tocantins, Brasil, foi encontrado que 3% dos pacientes faltam e 18,2% interrompem o tratamento e associam-se a causas relacionadas à pobreza, como tamanho da casa, renda familiar e migração (HEUKELBACH *et al.*, 2011).

### 1.6.2 Tratamento das Reações hansênicas

O tratamento das reações do tipo 1 apenas com manifestações cutâneas pode ser feito de forma sintomática com anti-inflamatórios não esteroidais e analgésicos, ao passo que quando ocorrem neurites, estas devem ser tratadas com corticosteróides em doses de 1mg/kg/dia até 4-6 meses, sendo sua retirada feita gradualmente. Em alguns casos, podem ser utilizados imunossupressores como metotrexato, micofenolato de mofetila ou ciclosporina (URA, 2007).

As reações tipo 2 são tratadas de forma mais eficaz com talidomida em doses de 100- 400 mg/dia, porém, devido aos efeitos teratogênicos desse fármaco, evita-se seu uso por mulheres em idade fértil. Neste caso, são utilizados corticosteróides. Nos demais, os corticosteróides são comumente associados à talidomida, principalmente na ocorrência de neurites, uveítes, orquites e mão reacional (URA, 2007). Com a corticoterapia, observa-se redução dos níveis séricos de sIL-6R, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  com conseqüente melhora clínica do paciente (IYER *et al.*, 2007). Pode-se também associar clofazimina (100 mg) e pentoxifilina (400 mg) a cada 8 horas (WELSH *et al.*, 1999).

Há ainda a ocorrência de neurite isolada, a qual apresenta dor espontânea ou decorrente da compressão de nervos periféricos, acompanhada ou não de edema localizado (VALENTINI *et al.*, 1999). A neurite pode resultar em dano irreversível dos nervos periféricos se não for adequadamente tratada. Um período de seis meses de tratamento com a prednisolona pode reduzir as lesões de pele e melhorar a função neural em 50 a 80% dos pacientes (ANDERSSON *et al.*, 2005).

### 1.6.3 Multidroga terapia Uniformizada (MDT-U)

Há vários anos existem estudos na tentativa de se reduzir o tempo de tratamento da hanseníase de forma a melhorar a adesão à terapia e os efeitos adversos relacionados aos fármacos utilizados no tratamento (LI *et al.*, 1997; VIJAYAKUMARAN, 1996).

Existem evidências de que 2 a 3 meses de MDT são capazes de eliminar quase todos os bacilos viáveis em modelo de pata de rato (JI *et al.*, 1996; BANERJEE *et al.*, 1997).

A OMS pesquisa a resposta ao esquema desde 2003 na Índia e na China (OMS, 2004). No Brasil o Ministério da Saúde vem desenvolvendo um estudo que visa avaliar a efetividade da MDT-U em alguns centros de referência em dermatologia nacionais 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 no 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 voltar ao CDerm e será consultado para a avaliação do problema, pedidos de exames e instituição da terapia adequada.

## 1.7 Resposta imunológica na hanseníase e nas formas reacionais

Acredita-se que 95% da população mundial apresentem uma resistência natural ao *M. leprae* (BENNETT *et al.*, 2008). A resistência à doença está associada com a resposta imunológica do hospedeiro (MENDONÇA *et al.*, 2008a; TEIXEIRA *et al.*, 2010a).

KERR-PONTES *et al.* (2006) verificaram que há uma relação entre vacinação por BCG e proteção contra a doença, fato já constatado por outros autores (CUNHA *et al.*, 2004), que mostraram através de um estudo realizado em Manaus, AM, uma taxa de proteção de 41% a 74% de eficácia da vacinação com BCG contra todas as formas de hanseníase. Quando

as formas eram analisadas separadamente, verificava-se uma maior resistência contra as formas multibacilares. Tal observação independia da idade do indivíduo. Em adição, estudo realizado com amostra da população de Fortaleza apontou para uma persistência da proteção contra a hanseníase em indivíduos vacinados com BCG, mesmo para o subgrupo acima de 40 anos de idade (RODRIGUES *et al.*, 2007).

A hanseníase possui um espectro clínico localizado entre os polos tuberculóide, em que ocorre resistência ao patógeno e restrição de seu crescimento, reduzido número de lesões com poucos bacilos e, frequentemente, há dano tecidual e neural, demonstrando a intensa atividade imune celular. No polo oposto do espectro ocorre a forma virchowiana representada pela susceptibilidade do hospedeiro ao patógeno. Há grande número de lesões de pele contendo numerosos bacilos com pequena atividade imune celular e presença de atividade imune humoral, porém ineficiente, já que se o *M. leprae* é intracelular (MODLIN, 2010).

A resposta imunológica inata ao *M. leprae* é feita principalmente por células fagocitárias como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs). Estes últimos são também responsáveis pela apresentação de antígenos, um passo importante para a resposta imunológica adaptativa (IYER, 2009). As DCs são as primeiras células a capturarem o *M. leprae* no local da infecção. Elas produzem IL-10 e IL-12 e são fundamentais no direcionamento da resposta Th1 ou Th2 contra o bacilo causador da hanseníase. As DCs derivadas de macrófagos têm demonstrado alta efetividade na apresentação de antígenos (MIRA *et al.*, 2004).

O *M. leprae* estimula fracamente a resposta imunológica inata e induz altos níveis da quimiocina inibitória MCP- 1 (proteína quimioatrativa de monócitos 1) em monócitos, o que leva à inibição da secreção de IL- 12. Nas lesões de hanseníase sempre são encontrados macrófagos infiltrados, a diferença é que na forma tuberculóide os macrófagos estão vazios, enquanto que na forma virchowiana, eles estão repletos de micobactérias (CRUZ *et al.*, 2008).

A Linfotoxina  $\alpha$  (LT  $\alpha$ ) é um membro da superfamília do TNF  $\alpha$  e relaciona-se ao desenvolvimento dos tecidos linfóides secundários (RENNERT *et al.*, 1996), formando heterodímeros com a linfotoxina  $\beta$  (LT  $\beta$ ) e interagindo com linfócitos, provavelmente desempenhando um papel regulatório na imunidade celular (WARE, 2005) e servindo como estímulo inicial da inflamação crônica através da sinalização de cascatas que envolvem moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas para o recrutamento e retenção de linfócitos (KRATZ *et al.*, 1996). A forma solúvel desta quimiocina é secretada por linfócitos ativados,



principalmente linfócitos T CD4<sup>+</sup>, NK e B e liga-se com a mesma afinidade aos receptores de TNF (CROFT, 2005). Foi demonstrado que está envolvido no controle de diversas infecções de patógenos intracelulares e já foi encontrado em lesões de hanseníase, principalmente na forma tuberculoide e em lesões de reação do tipo 1 (BLEHARSKI *et al.*, 2003; YAMAMURA *et al.*, 1991).

Hagge *et al.* (2009) encontraram reduzida quantidade de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e macrófagos e falha na formação de granuloma em lesões de infecção de baixa dose de *M. leprae* em ratos com deficiência no gene da LT  $\alpha$ , além de redução nos níveis de citocinas inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocinas.

Foram relacionados diversos antígenos imunogênicos e específicos de *M. leprae* que estimulam a resposta de linfócitos T com potencial para serem utilizados no diagnóstico (SPENCER *et al.*, 2005; DUTHIE *et al.*, 2008) ou em vacinas na hanseníase (DUTHIE *et al.*, 2008).

Os receptores Toll-like (TLRs) são proteínas transmembranas envolvidas na resposta imunológica inata a diversos patógenos (AKIRA; TAKEDA, 2004; BEUTLER, 2004; IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). Na resposta ao *M. leprae* estão envolvidos os TLR 1, 2, 4, 6 e 9 (MEANS *et al.*, 1999; BAFICA *et al.*, 2005; TAPPING; TOBIAS, 2003).

As citocinas envolvidas com a resposta Th1 IFN- $\gamma$  e GM-CSF aumentam a expressão de monócitos e DCs, respectivamente, enquanto que IL-4, citocina envolvida com a resposta Th2, reduz a expressão de TLR2. TLR1 e 2 são expressados mais fortemente em lesões localizadas de pacientes com a forma TT do que em lesões disseminadas de pacientes VV (MODLIN, 2010).

Indivíduos com o alelo 1805 do TLR1 alterado de 1805T para 1805G apresentam um risco reduzido de desenvolverem a reação reversa, indicando que essa alteração pode influenciar na resposta imunológica Th1 na hanseníase (MISCH *et al.*, 2008).

Um das células que participam da imunidade inata contra o *M. leprae* são os macrófagos que, após a fagocitose do bacilo, estimulam a liberação de diversas citocinas, como o TNF- $\alpha$  (BARKER, 2006), porém os antígenos do *M. leprae* fagocitados por macrófagos não são eficientemente expressos em sua superfície, o que dificulta ou evita o contato com os linfócitos T e consequente ativação da resposta imunológica adaptativa (HASHIMOTO, 2002).

A DC é uma das mais efetivas APCs. É capaz de estimular células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, o que leva a uma resposta imunológica protetora ao *M. leprae*. Já foi mostrado que ela

apresenta efetivamente antígenos específicos desse patógeno como o PGL-1 (glicolípido fenólico 1) (BARKER, 2006).

Através do testes sorológicos, como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é possível detectar a presença de anticorpos anti-PGL-1 Ig M, útil na identificação de pessoas com alto risco de desenvolver hanseníase, como contactantes de pessoas doentes, principalmente com a forma multibacilar e profissionais de saúde de serviços especializados (CASTRO; BELTRÁN, 2004).

A proteção contra o *M. leprae* é conferida, principalmente pela imunidade adaptativa, em que IFN- $\gamma$ , através da resposta imunológico-celular, Th1, é produzido tanto pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup>. A ativação dessas células inibe a multiplicação da micobactéria. A ativação é induzida por DCs carregadas de bacilos que apresentam um ou mais determinantes antigênicos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A MMP- II (*major membrane protein II*) é um dos antígenos imunodominantes do *M. leprae* que, através da ligação com TLR2, ativa as DCs via NF- $\kappa$ B. Ele é um dos antígenos fundamental na ativação da defesa do hospedeiro contra esse patógeno. As DCs expressando MMP- II em superfície ativam tanto linfócitos CD4<sup>+</sup> virgens, de memória, quanto linfócitos TCD8<sup>+</sup> a produzirem IFN- $\gamma$  de forma antígeno específica (MAKINO; MAEDA; ISHII, 2005; MAEDA *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado com marcadores sorológicos para auxiliar o diagnóstico de formas reacionais de hanseníase, compararam-se pacientes com reação do tipo 1, tipo 2 e controles sadios quanto a 27 tipos de fatores sanguíneos e encontraram-se como possíveis marcadores para a reação do tipo 1 o CXCL-10 (uma das quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , que recruta células efetoras Th1), e IL-6 (interleucina 6) e para reação do tipo 2, IL-7 (interleucina 7), PDGF-BB (fator de crescimento derivado da plaqueta BB) e IL-6 (STEFANI *et al.*, 2009).

## 1.8 Subpopulações de linfócitos

### 1.8.1 Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

Em indivíduos normais encontra-se no sangue periférico de 70 a 90% de linfócitos T(CD3<sup>+</sup>) (FAILACE, 2003). Os linfócitos T são determinantes no desenvolvimento da resistência contra o *M. leprae* (KIMURA *et al.*, 2004).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicos adquirem as funções de auxiliares na zona T dos linfonodos com reconhecimento do complexo peptídeo específico+MHC II nas DCs (MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2005).

Os linfócitos T são essenciais para a proteção contra vírus e bactérias. Os linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) reconhecem peptídeos ligados a MHC II, os quais são expressos apenas pelas APCs, como as DCs, macrófagos e linfócitos B. São células especializadas em enviar sinais a outras células do sistema imune como macrófagos, linfócitos B e T CD8<sup>+</sup> através de citocinas e interação direta.

Os linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) reconhecem peptídeos ligados ao MHC I que podem ser apresentados em qualquer célula nucleada. Esses linfócitos são especializados em detectar as células infectadas para destruí-las junto ao patógeno que as infecta. O principal mecanismo de ação dos linfócitos T citotóxicos é a indução de apoptose seja através da expressão de receptores de morte ou de liberação de perforinas e granzimas. Além disso, os linfócitos T citotóxicos secretam citocinas como IFN- $\gamma$ , e TNF, os quais podem aumentar a apresentação de antígenos e mediar os efeitos contra os patógenos por interferirem na replicação viral/bacteriana (SCHEPERS; ARENS; SCHUMACHER, 2005).

A natureza da resposta imunológica adaptativa das células T está relacionada às instruções da resposta imunológica inata. A ativação dos subtipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> é induzida por contato com as células apresentadoras de antígenos (APCs), que é a fase mais crítica para a defesa do hospedeiro contra infecção por micobactérias e faz parte da imunidade inata (LEWINSOHN *et al.*, 1998; ORME *et al.*, 1993).

Os subtipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e os padrões de citocinas produzidas por cada tipo celular se relacionam às diferentes respostas ao *M. leprae*. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, também chamados T *helper* (ou auxiliares) podem se diferenciar em Th1, em que há a produção de citocinas predominantes na forma tuberculoide, como o IFN- $\gamma$ , e Th2, em que

ocorre a produção de citocinas predominantes na forma virchowiana, como a IL-4 (KIMURA *et al.*, 2004).

Em estudo imunopatológico de lesões TT foi detectada a presença predominantemente de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) ao redor dos granulomas, enquanto que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> apareciam agregados às células epitelioides. Já em lesões VV, foram encontrados indistintamente linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (MODLIN *et al.*, 1983a).

Na reação do tipo 2, os subtipos linfocitários são difusamente distribuídos pelo granuloma de maneira similar à forma LL sem reação. No entanto, na reação do tipo 1, apenas 30% dos granulomas apresentam linfócitos T CD8<sup>+</sup>, sendo a grande maioria localizados na periferia (MODLIN *et al.*, 1983b).

Antas *et al.* (2004) realizaram imunofenotipagem por citometria de fluxo para a detecção de subtipos celulares de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de citocinas em pacientes com hanseníase e encontraram que 85% dos pacientes apresentou produção de TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, enquanto 100% deles mostrou que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> produzem TNF- $\alpha$  em resposta a estímulo prévio com antígeno de *M. leprae*. Também foi mostrado um número maior de células T CD4<sup>+</sup> comparadas às T CD8<sup>+</sup>.

A ativação dos linfócitos T necessita da participação de moléculas co-estimuladoras expressas nas APCs. As moléculas CD80 e CD86 têm apresentado papel importante nas DCs e em macrófagos na ativação dos linfócitos T em diferentes formas de hanseníase (SANTOS *et al.*, 2001).

O desenvolvimento da resposta imunológica mediada por células depende tanto da função de CD80 e CD86 como moléculas co-estimulatórias, como também da habilidade de ligação à molécula CD28 que está na superfície das células T (LENSCHOW; WALUNA; BLUESTONE, 1996).

Foi demonstrado que *M. leprae* estimula mais as DCs a expressarem moléculas CD80 e CD86 (moléculas co-estimuladoras presentes na superfície das APCs (LINSLEY *et al.*, 1991) do que macrófagos. Testes *in vitro* da resposta de linfócitos T a *M. leprae* mostraram uma significativa e mais eficiente apresentação de antígenos em DCs comparadas a monócitos, sugerindo que tanto as moléculas co-estimuladoras possuem um importante papel na imunopatologia da hanseníase quanto a duração da imunidade protetora contra a infecção por *M. leprae* (SANTOS *et al.*, 2001).

Os pacientes virchowianos são deficientes de resposta mediada por células específica contra *M. leprae* durante o desenvolvimento da doença, porém esse pacientes podem apresentar uma resposta celular temporária que causa sintomas inflamatórios, são as

reações hansênicas tipo 1 ou tipo 2 (SIELING *et al.*, 1999).

Foi observado aumento da expressão de CD80, CD 86, CD28 (molécula co-estimuladora presentes na superfície dos linfócitos T que se liga a CD80 e CD86 (LINSLEY *et al.*, 1991)), mas redução da expressão de CD152 (molécula que possui um papel negativo na ativação dos linfócitos T e está envolvido com a indução da tolerância periférica (EAGER *et al.*, 2002)) em PBMCs de controles normais, pacientes paucibacilares e multibacilares após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae* e duas substâncias imunomoduladoras (Murabutide e peptídeo Trat) usando sistema de liberação lipossomal do antígeno, no entanto, resultado oposto foi encontrado quando acrescentado apenas o antígeno. A inibição de CD80 e CD86 através da utilização de anticorpos anti-CD80 e anti-CD86 anulou completamente a proliferação de linfócitos T, confirmando a importância das moléculas co-estimuladoras na ativação dos linfócitos T (SRIDEVI *et al.*, 2004).

Em estudo comparando pacientes com a forma virchowiana sem reação hansênica e com reação tipo 1 e tipo 2, foi encontrada por citometria de fluxo uma maior expressão de CD80 em PBMCs isoladas de pacientes com reação tipo 1 e 2 comparados aos pacientes sem reação. Esses resultados também foram confirmados por teste imunohistoquímico das lesões. A expressão foi maior nos pacientes com reação tipo 1 (SANTOS *et al.*, 2006).

A expressão de CD80 em PBMCs de pacientes com reação hansênica e, principalmente, com o tipo 1 implicam em algum grau de imunidade celular específica ao *M. leprae* durante os episódios de inflamação (episódios reacionais), que podem contribuir para a defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares (SANTOS *et al.*, 2006).

Foi avaliada a produção das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em pacientes com reação tipo 2 submetidos a tratamento com talidomida no início do tratamento (dia 0), no 7º e no 21º dia de tratamento com talidomida e foi encontrado aumento significativo da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de IL-2 por T CD8<sup>+</sup> todos no 7º dia de tratamento. Níveis semelhantes aos do dia 0 foram encontrados dia 21 (HASLETT *et al.*, 2005).

### 1.8.2 Linfócitos NK

Os linfócitos *Natural Killer* (NK) são provenientes das células hematopoiéticas progenitoras CD 34<sup>+</sup>, no entanto não se conhecem todos os passos do seu desenvolvimento.

A produção e início do desenvolvimento ocorrem na medula óssea, onde são produzidas as células CD56<sup>bright</sup> NK (células NK com forte expressão de CD56) e esse subtipo já foi encontrado em linfonodos e tonsilas, que são órgãos linfóides secundários (GALY *et al.*, 1995; MILLER; ALLEY; MCGLAVE, 1994).

No sangue periférico humano existem cinco subtipos de células NK que se diferenciam pela expressão de CD56 (receptor de baixa afinidade pela porção Fc da IgG) e CD16 (molécula de adesão). O tipo CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK (em que há fraca expressão de CD56 e forte expressão de CD16) representa a maioria das células NK circulantes no sangue periférico. As células NK não expressam CD3<sup>+</sup> (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; CALIGIURI, 2008).

As células NK são há muito tempo conhecidas por participarem da imunidade inata, mas recentemente houve descobertas a respeito da influencia dessas células na resposta imunológica adaptativa e na imunoregulação ( POLI *et al.*, 2009). Essas células representam subtipos de células citotóxicas que são capazes de reconhecer e lisar células tumorais e infectadas sem prévia sensibilização (TRINCHIERI, 1989).

As células NK presentes nos linfonodos entram em contato com as células T que liberam IL-2. Essa citocina estimula a expressão de CD16, KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*, receptor inibitório), NKp46 e NKp30 (receptores de ativação) , bem como de perforina, tornando as células NK bem semelhantes às presentes no sangue periférico (CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK) (FEHNIGER *et al.*, 2003; FERLAZZO *et al.*, 2004).

Os receptores de células NK são codificados na linhagem germinativa e não por recombinação somática como os receptores de antígenos de linfócitos B e T (LONG, 1999). Esse balanço de sinais entre os receptores de ativação e de inibição é que determina as funções das células NK (MORETTA *et al.*, 2001). Alguns receptores inibitórios reconhecem o MHC de classe I, presente em todas as células saudáveis e previnem o ataque de NK a essas células. A perda de MHC I dessas células por infecção ou câncer pode levar à ativação de NK (VILCHES; PARHAM, 2002; STEWART; VIVIER; COLONNA, 2006). Os receptores de NK ativados ligam-se a derivados do hospedeiro ou do patógenos que têm sua expressão aumentada pelo estresse ou pelas células infectada e, com a ativação, as células NK lisam as células-alvo através de perforinas e granzimas. Além dessas funções clássicas, as células NK também possuem capacidade regulatória mediada por diversas citocinas (JANEWAY JR.; MEDZHITOV, 2002).

Além da capacidade de matar células-alvo específicas, as células NK podem produzir citocinas do tipo Th1 ou Th2. Para a geração da resposta Th1 é importante que as

células NK produtoras de IFN- $\gamma$  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).

Interleucina-12, uma citocina produzida por DCs e monócitos, possui um papel fundamental na geração da resposta Th1, na estimulação de NKs e na indução de produção de IFN- $\gamma$  por NKs e linfócitos T (MANETTI *et al.*, 1994; TRINCHIERI, 1994).

Em pacientes paucibacilares e controles normais a depleção de NKs reduziu a atividade citolítica de linfócitos T citotóxicos (LTC). Nessas condições o acréscimo de IL-12 não é capaz de aumentar a geração de LTC, enquanto que a presença de IL-18 eleva a atividade citotóxica na ausência ou presença de NKs (BARRERA, 2004).

### 1.8.3 Linfócitos NKT

Os linfócitos T *Natural Killers* (NKTs) foram descritos como subpopulações  $\alpha/\beta^+$  CD4<sup>+</sup> ou CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> caracterizados por uma cadeia invariante de TCR- $\alpha$ , essas células foram identificadas primeiramente em ratos e foi demonstrado que elas reconhecem a proteína CD1d, que é semelhante a MHC I (BENDELAC *et al.*, 1997)

Linfócitos iNKT (NKT invariantes) representam um protótipo dos linfócitos T indiferenciados devido ao seu fenótipo constitutivo, funções e expressão de diversos receptores de NK (BENDELAC; BONNEVILLE; KEARNEY, 2001).

Os iNKT reconhecem antígenos glicosíngolípídicos que se ligam especificamente à CD1d, um desses antígenos é a  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) isolada de esponjas marinha (BROSSAY *et al.*, 1998). A administração de  $\alpha$ -GalCer a ratos e humanos rapidamente ativa iNKT a produzirem citocinas Th1 e Th2 (VAN KAER, 2005; NIEDA *et al.*, 2004).

O reconhecimento específico do complexo  $\alpha$ -GalCer apresentado por DCs *in vivo* é crucial para o desenvolvimento das funções auxiliares em iNKTs (BENDELAC *et al.*, 1995; EXLEY *et al.*, 1997), que podem ajudar na ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> cujos antígenos foram apresentados por DCs (FUJII *et al.*, 2003; HERMANS *et al.*, 2003).

Tonti *et al.* (2009) imunizaram com antígenos e  $\alpha$ -GalCer ratos que não

expressavam CD1d ou CD40 ou expressavam apenas CD1d ou MCH II distintamente nas APCs ou esplenectomizados e encontraram que o aumento da resposta de linfócitos B é dependente de  $\alpha$ -GalCer e pode ocorrer mesmo quando os linfócitos B não expressam CD1d, mas expressão CD40 e necessitam que os iNKTs e os T auxiliares interajam com as mesmas APCs que expressem tanto CD1d, quanto MHC II e ocorre mesmo em ratos esplenectomizados.

Os linfócitos NKT são recrutados por fatores quimiotáticos produzidos por células epiteliais e ativados por antígenos lipoprotéicos e glicolipídicos do *M. leprae* (IM *et al.*, 2008). A produção de diversas citocinas do tipo Th1 e Th2 é rapidamente estimulada por NKT CD1d restritos (MERCER; RAGIN; AUGUST, 2005; SEINO *et al.*, 2006) Essas células estão envolvidas com resposta imunológica protetora contra patógenos intracelulares (RONET *et al.*, 2005; ARRUNATEGUI-CORREA; LENZ; KIM, 2004).

A inoculação de antígeno da parede celular de *M. tuberculosis* em ratos desenvolveu uma lesão semelhante ao granuloma em que NKT eram predominantes (APOSTOLOU *et al.*, 1999).

A utilização de antígenos de *M. leprae* com os imunomoduladores murabutide e peptídeo Trat de forma lipossomal em PBMCs de pacientes com hanseníase virchowiana levou a um aumento da expressão de CD1b e CD1d em monócitos/macrófagos bem como da porcentagem de NKTs que secretavam IFN- $\gamma$  e promoveu a ativação das vias CD40-CD40L e das funções de NKTs envolvidas com a imunidade mediada por células (CMI) nesses pacientes (CHATTREE *et al.*, 2008).

Mendonça *et al.* (2008b) compararam o perfil fenotípico de pacientes com hanseníase e controles saudáveis e encontraram aumento no percentual de linfócitos NKT (CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>) nos pacientes com hanseníase.

#### 1.8.4 Linfócitos B (CD19<sup>+</sup>)

Encontra-se de 5 a 20% de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) nos linfócitos sanguíneos de indivíduos normais (FAILACE, 2003).

Enquanto os linfócitos T auxiliares são maturados na zona T dos linfonodos, na zona folicular os B capturam antígenos através dos receptores de células B (BCRs) o que os



leva à ativação e internalização, processamento e apresentação do peptídeo junto ao MHC II (MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2005).

CD40 é uma glicoproteína membro de superfamília do receptor de TNF presente na superfície de linfócitos B e monócito/macrófago. A interação CD40-CD40L induz o aumento da expressão de B7 e indução da produção de IL-12 (DURIE *et al.*, 1994).

Linfócitos T auxiliares e linfócitos B ativados se encontram entre as duas zonas onde ocorre o reconhecimento do complexo peptídeo específico+MHC II. Com essa interação, os linfócitos T auxiliares aumentam a expressão de CD40L que se liga a CD40 presente na superfície dos B, levando a uma proliferação crítica e sinal de diferenciação e secreção de citocinas necessárias à mudança do isotipo de imunoglobulina (Ig) (MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2005).

A interação entre linfócitos T-B específicos leva ao desenvolvimento de plasmócitos de curta duração ou seguem para o centro germinativo, onde passam a linfócitos B de memória com longa duração com alta afinidade (MACLENNAN, 1994).

Foi observado aumento percentual significativo de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e linfócitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) em indivíduos com a forma virchowiana da hanseníase, respectivamente  $15,08 \pm 4,83$  e  $4,92 \pm 3,57$ , quando comparados a indivíduos normais,  $12,14 \pm 2,10$  e  $1,10 \pm 0,59$ . Não foram estudados pacientes com formas reacionais de hanseníase. (ILHAN *et al.*, 2007).

Mendonça *et al* (2008b), em comparação do perfil fenotípico de pacientes com hanseníase e controles saudáveis, não encontraram aumento no percentual de linfócitos B (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>) no pacientes com hanseníase.

## 1.9 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, DNA e fazer 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 se conhecer melhor o comportamento imunológico, diagnóstico ou acompanhamento clínico de inúmeras doenças como a SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) (AUTISSIER *et al.*, 2010; WEBSTER; JOHNSON, 2005), leucemia mielóide 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 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).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Descrever as subpopulações de linfócitos em sangue periférico em pacientes com formas reacionais de hanseníase.

### 2.2 Específicos

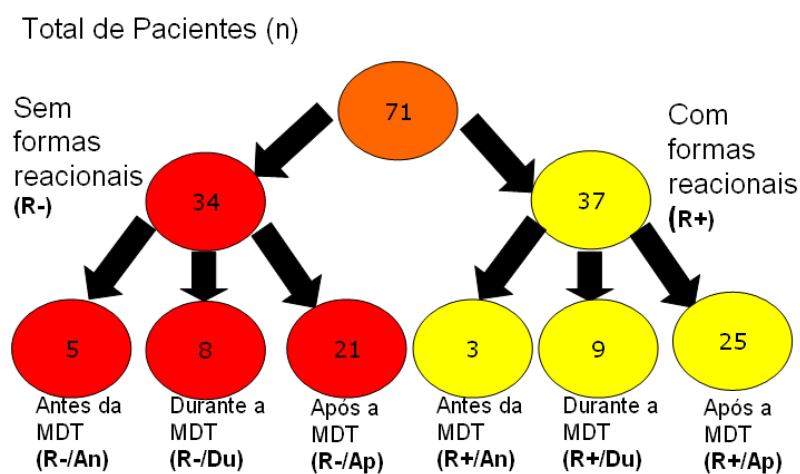
- Quantificar as subpopulações de linfócitos T totais ( $CD3^+$ ), T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ), T citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ), T ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ), B ( $CD3^-CD19^+$ ), NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) do sangue periférico de pacientes com formas reacionais de hanseníase;
- Comparar as subpopulações de linfócitos do sangue periférico de pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase;
- Diferenciar as alterações nas subpopulações de linfócitos do sangue periférico de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e forma clínica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi do tipo transversal e cada grupo era composto por pacientes diferentes.

#### 3.1 Pacientes

Os pacientes foram analisados inicialmente dividindo-se em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de formas reacionais. Em seguida, divididos em seis subgrupos de acordo com a presença de formas reacionais de hanseníase: com reação (R+) ou sem reação (R-) e o período em que estavam em relação à MDT: antes (An), durante (Du) ou após (Ap). Os pacientes “An” estavam na primeira consulta e, portanto, ainda não tinham iniciado o tratamento MDT; os “Du” encontravam-se em entre o 2º e o 12º mês de tratamento e os “Ap”, até 5 anos após o tratamento MDT (mediana de 1 ano).



**FIGURA 10:** Esquema de formação dos grupos e subgrupos para estudo das subpopulações linfocitárias.

##### 3.1.1 Critérios de inclusão

- Diagnóstico de hanseníase confirmado com biópsia da lesão;
- Ter idade entre 5 e 65 anos.

### 3.1.2 Critérios de exclusão

- Forma clínica neural pura;
- Tratamento anterior de hanseníase há menos de 5 anos;
- História prévia de intolerância a um dos medicamentos do esquema MDT;
- Associação com outras doenças graves (HIV/SIDA, Tuberculose, Malária, Leishmaniose tegumentar americana, calazar, linfomas, leucemia mieloide aguda, leucemia linfóide aguda );
- Dificuldades de compreender ou cumprir os procedimentos do estudo;
- Residentes fora de Fortaleza- CE;
- Lesão única - Incluído em outro protocolo de estudo.

## 3.2 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).

## 3.3 Métodos

### 3.3.1 Coletas das amostras de sangue periférico

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<sup>®</sup> com anticoagulante EDTA. Um tubo era utilizado para a realização do

hemograma no próprio CDerm e o outro era armazenado em temperatura ambiente (20- 25 °C) e levado no mesmo dia ou no dia seguinte, em caixa térmica refrigerada e com temperatura controlada, para o Laboratório de Imunofenotipagem da Faculdade de Medicina da UFC, onde era feita a citometria de fluxo.

### 3.3.2 Hemograma

A realização do hemograma ocorria no dia da coleta através do aparelho Mindray BC-5380 (Hamburgo, Alemanha) que fornecia os resultados de eritrograma, plaquetograma e a contagem de leucócitos totais e diferenciais.

### 3.3.3 Baciloscopia

A baciloscopia era solicitada no início do acompanhamento do paciente, como auxílio no diagnóstico e definição da classificação da hanseníase e no final da multidrogaterapia para avaliação da alta. Esse exame era realizado pelos profissionais do CDerm em todos os pacientes e os resultados de baciloscopia dos pacientes desse estudo foram consultados em prontuário juntamente com as informações sócio-econômicas, presença de reações hansênicas e o tipo de reação, bem como demais dados relativos ao acompanhamento da hanseníase.

Para a baciloscopia eram coletadas amostras de linfa das orelhas, cotovelos e das principais lesões indicadas pelo médico. A coleta era feita pela técnica indicada e validada pelo Ministério da Saúde em que se pressiona a área com uma pinça, formando uma prega, para obtenção de isquemia. O corte da pele e a retirada da linfa eram feitos com um bisturi. As amostras de linfa de todos os locais coletados eram inseridas na mesma lâmina. Depois de secar o material da lâmina, ela era passada de 2 a 3 vezes em chama para promover a fixação do material. O esfregaço era corado pelo método de Ziehl- Neelsen a frio.

O índice baciloscópico (IB) era obtido com a leitura da lâmina através de uma técnica de contagem quantitativa que dava valores de 0 a 6+, de acordo com o número de bacilos encontrados por campo (BRASIL, 2010).

### 3.3.4 Biópsia

Os resultados de biópsia dos pacientes também foram consultados em prontuário. As biópsias eram colhidas pelo médico que acompanhava o paciente em dia previamente marcado, geralmente na mesma semana da consulta inicial, em sala adequada para a realização procedimento.

O material era colhido com *punch* número 4, no mínimo, mas se a lesão fosse na face, utilizava-se o de número 3,5. Era realizada anestesia com xilocaína injetável no local da biópsia. A técnica era realizada com movimentos de rotação e pressão vertical para que o instrumento chegasse à profundidade desejada. O material deveria conter os filetes nervosos da derme reticular profunda e boa representação da hipoderme.

Após a coleta o material era conservado em solução de formol 10% dentro de frasco estéril e encaminhado ao laboratório do CDerm para a realização do exame histopatológico. Era feita a coloração de Wade, na qual era possível a identificação dos bacilos. Todos os pacientes incluídos no projeto MDTU eram submetidos a esse exame.

### 3.3.5 Pesquisa de subpopulações linfocitárias de sangue periférico por citometria de fluxo

#### 3.3.5.1 Aquisição

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

Para cada amostra eram identificados dois tubos (T e B) em que se colocavam 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, NK e NKT com o Multiset 2 (CD3/CD16+CD56/CD45/CD19), ambos reagentes da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). Os anticorpos monoclonais eram conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5) ou Aloficocianina (APC), respectivamente.

Em seguidas eram adicionados 50 $\mu$ L de sangue em cada tubo e homogeneizado no vórtex. Os tubos ficavam quinze minutos em temperatura ambiente no escuro. Para a lise das hemácias eram acrescentados 450 $\mu$ L da solução de lise diluída FACS lysing solution (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) em cada tubo e homogeneizados novamente no vórtex.

Após a preparação, o material era imediatamente adquirido em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Eram adquiridos 10.000 eventos CD45 positivos para cada tubo.

### 3.3.5.2 Estratégia de *Gating*

A estratégia de *gating* representou, de início, na identificação dos linfócitos totais do sangue periférico, por meio da determinação da região em que há forte expressão do CD45<sup>+</sup> e baixa complexidade interna (*side scatter-SSC*) (Figura 11, item a). Em seguida, as subpopulações de linfócitos T foram distinguidas, tomando por base a combinação de expressão dos antígenos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (linfócitos T auxiliares) e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (linfócitos T citotóxicos) (Figura 11, itens b; c). Os linfócitos T foram determinados pela expressão positiva de CD3 (Figura 11, item d).

A população NK (*natural killer*) foi determinada pela combinação de expressão dos antígenos CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> e a população NKT, uma subpopulação de linfócitos T, foi determinada pela combinação da expressão dos antígenos CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (Figura 12, item b). Os linfócitos B foram determinados pela expressão positiva de CD19 (Figura 12, item c).

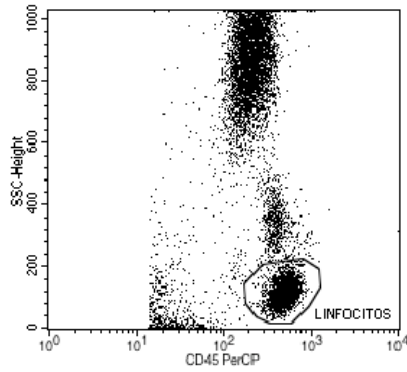
A fórmula utilizada para o cálculo do valor absoluto dos linfócitos foi:

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

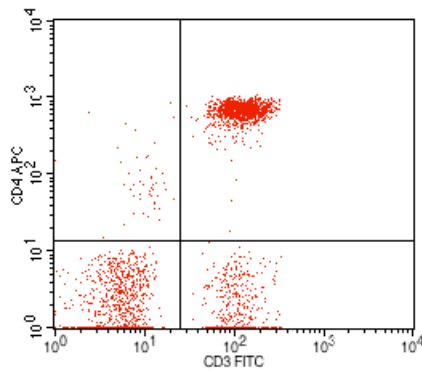
em que N<sup>o</sup> leucócitos e % linfócitos foram retirados do hemograma e CD (subpopulação de linfócitos específica) foi obtida do resultado da citometria.



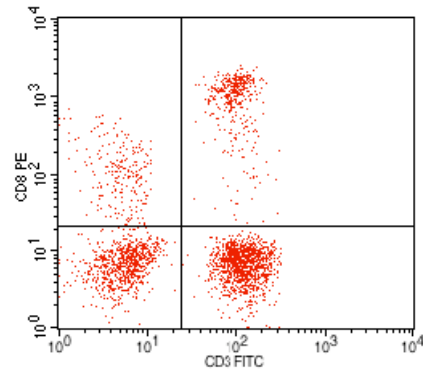
a)



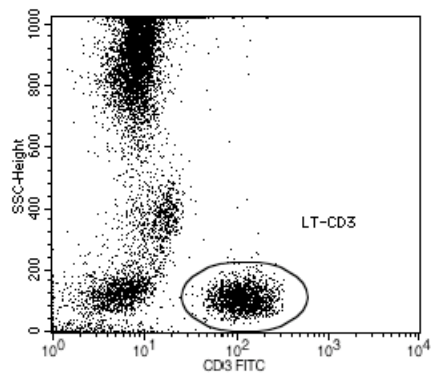
b)



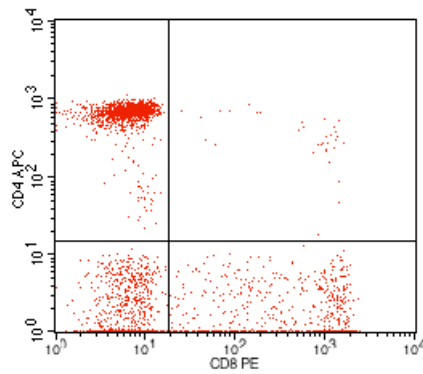
c)



d)



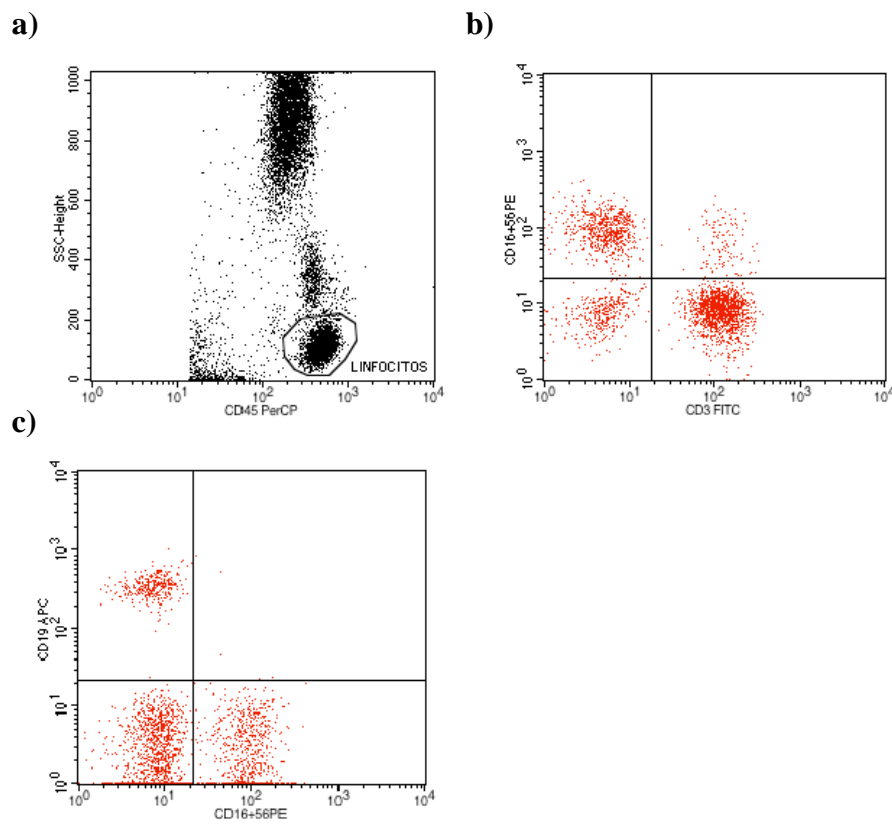
e)



**FIGURA 11:** Estratégia de *gating* para determinação das subpopulações linfocitárias: linfócitos T totais, T citotóxicos e T auxiliares.

a) Seleção de *gate* contendo apenas linfócitos b) linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), c) linfócitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), d) linfócitos T totais (CD3<sup>+</sup>) e e) células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

Fonte: Arquivos do Laboratório de Imunofenotipagem da UFC



**FIGURA 12:** Estratégia de *gating* para determinação de subpopulações linfocitárias NKT, NK e B. a) Seleção de *gate* contendo apenas linfócitos b) linfócitos NKT (CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e NK (CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e c) linfócitos B (CD19<sup>+</sup>).

Fonte: Arquivos do Laboratório de Imunofenotipagem da UFC.

### 3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Graph Pad Prism 4.0. Foram realizados os testes T de Student quando foram comparados dois grupos e ANOVA e Tukey quando comparados três grupos.

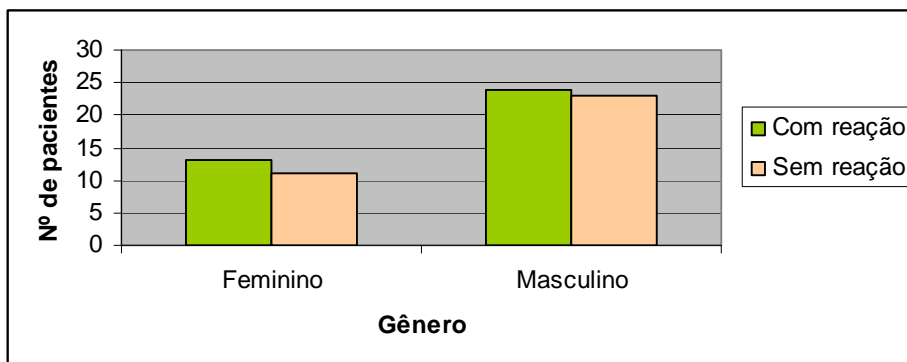
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da amostra

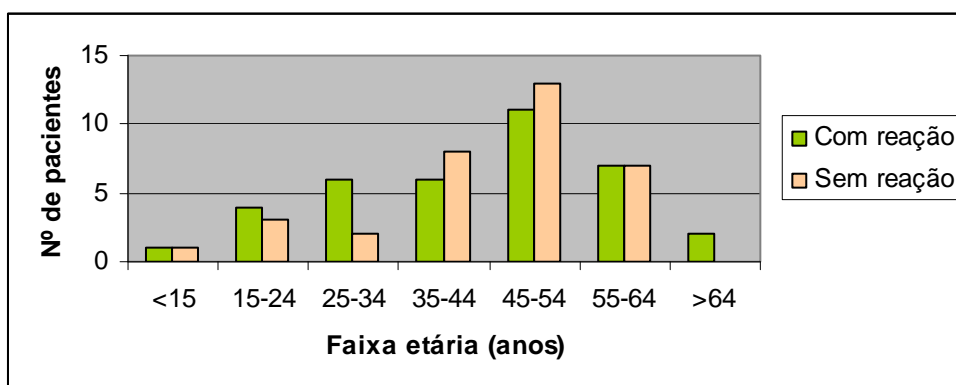
Dos 71 pacientes analisados, 24 (33,8%) eram do gênero feminino e 47 (66,2%) do gênero masculino. A média de idade dos pacientes foi de  $43,83 \pm 13,59$  anos. A menor idade foi de 13 anos e a maior 65 anos. Quanto à faixa etária, 2 (2,8%) pacientes tinham menos de 15 anos, 7 (9,9%) entre 15 e 24 anos, 8 (11,3%) entre 25 e 34 anos, 14 (19,7%) entre 35 e 44, 24 (33,8%) entre 45 e 54 anos, 14 (19,7%) entre 55 e 64 anos e 2 (2,8%) mais de 64 anos.

Dos 37 pacientes que apresentaram formas reacionais de hanseníase, todos utilizaram imunossupressores (prednisona ou talidomida) em algum momento do tratamento. 13 (35,1%) eram do gênero feminino e 24 (64,9%) do gênero masculino (Figura 13). A média de idade dos pacientes foi de  $43,46 \pm 14,57$  anos. A menor idade foi de 13 anos e a maior 65 anos. Quanto à faixa etária, 1 (2,7%) paciente tinha menos de 15 anos, 4 (10,8%) entre 15 e 24 anos, 6 (16,2%) entre 25 e 34 anos, 6 (16,2%) entre 35 e 44, 11 (29,7%) entre 45 e 54 anos, 7 (18,9%) entre 55 e 64 anos e 2 (5,4%) mais de 64 anos (Figura 14).

Dos 34 pacientes que não apresentaram formas reacionais de hanseníase, 11 (32,5%) eram do gênero feminino e 23 (67,6%) do gênero masculino (Figura 13). A média de idade dos pacientes foi de  $44,24 \pm 12,64$  anos. A menor idade foi de 14 anos e a maior, 61 anos. Quanto à faixa etária, 1 (2,9%) paciente tinha menos de 15 anos, 3 (8,8%) entre 15 e 24 anos, 2 (5,9%) entre 25 e 34 anos, 8 (23,5%) entre 35 e 44, 13 (38,2%) entre 45 e 54 anos, 7 (20,6%) entre 55 e 64 anos e nenhum paciente com mais de 64 anos (Figura 14).



**FIGURA 13:** Gênero dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo.

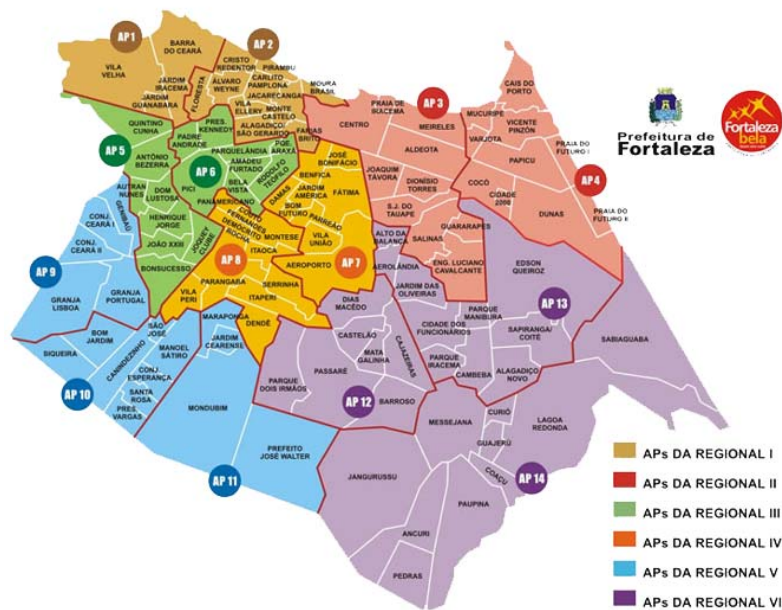


**FIGURA 14:** Faixa etária dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo.

Quanto à distribuição geográfica dentro da cidade de Fortaleza, a Secretaria Executiva Regional (SER) (figura 15) com o maior número de pacientes com hanseníase incluídos no estudo foi a SER V com 26 (36,6%), seguida pela SER VI com 17 (23,9%), SER II com 9 (12,7%), SER III e IV com 8 (11,3%), e SER I com 3 (4,2%)(figura 16).

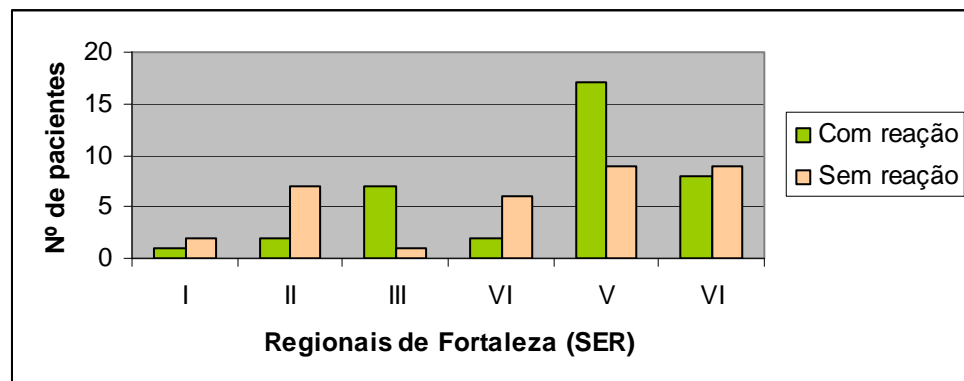
A SER com o maior número de pacientes com formas reacionais de hanseníase foi a SER V com 17 (45,9%), seguida pela SER VI com 8 (21,6%), SER III com 7 (18,9%), SER II e IV ambas com 2 (5,4%) e SER I com 1 (2,7%). O bairro com o maior número de pessoas foi o Bom Jardim com 7 (figura 16).

Os maiores números de pacientes sem formas reacionais de hanseníase encontrados foram nas SER V e VI com 9 (24,3%), seguidas pela SER II com 7 (18,9%), SER IV com 6 (16,2%), SER I com 2 (5,4%) e SER III com 1 (2,7%)(figura 16).



**FIGURA 15:** Mapa das secretarias executivas regionais (SER) de Fortaleza.

Fonte: [www.fortaleza.ce.gov.br](http://www.fortaleza.ce.gov.br)

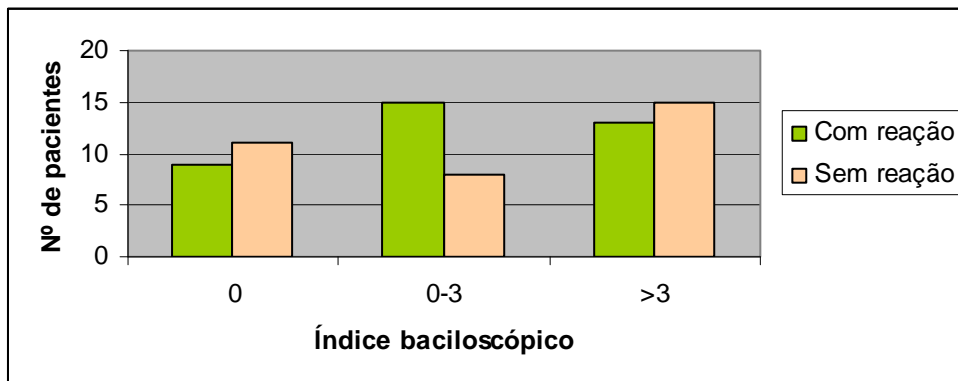


**FIGURA 16:** Distribuição geográfica dos pacientes incluídos no estudo por SER de Fortaleza.

Quanto ao IB obtido através da baciloscopia da linfa, 20 (28,2%) obtiveram IB=0, 23 (32,4%) entre 0-3 e 28 (39,4%) acima de 3.

Nos pacientes com formas reacionais, o IB obtido através da baciloscopia da linfa, 9 (24,3%) obtiveram IB=0, 15(40,5%) entre 0-3 e 13 (35,1%) acima de 3 (Figura 17).

Nos resultados de IB dos pacientes sem formas reacionais 11 (32,4%) obtiveram IB=0, 8(23,5%) entre 0-3 e 15 (44,1%) acima de 3 (Figura 17).

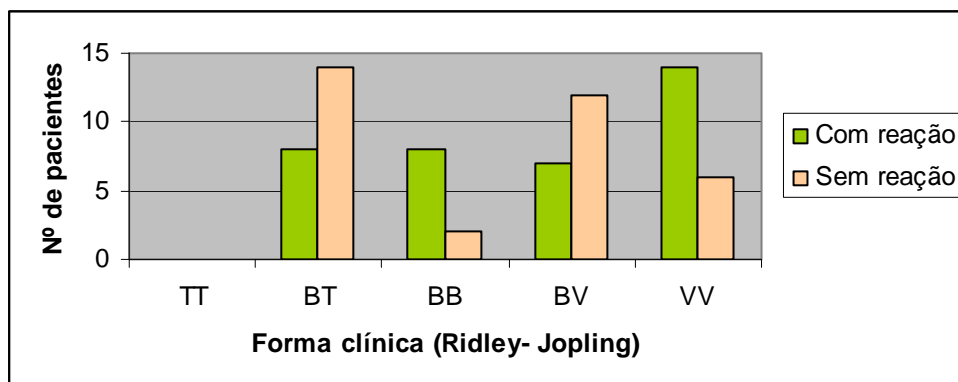


**FIGURA 17:** Índice baciloscópico dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo.

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 22 (31,0%), depois a VV com 20 (28,2%), a BV com 19 (26,8%) e a BB com 10 (14,1%)(figura 18). As formas clínicas eram definidas com o auxílio diagnóstico das biópsias, porém, em sete pacientes, não havia biópsia, sendo a definição da forma clínica definida pelo clínico que acompanhava o paciente.

Entre os pacientes com formas reacionais, o número maior de indivíduos foi classificado com a forma clínica VV com 14 (37,8%), depois a BT e a BB com 8 (21,6%) e a BV com 7 (18,9%) (figura 18).

Nos pacientes sem formas reacionais, o número maior de indivíduos foi classificado com a forma clínica BT com 14 (41,2%), depois a BV com 12 (35,3%), a VV com 6 (17,6) e a BB com 2 (5,9%)(figura 18).



**FIGURA 18:** Forma clínica (Ridley- Jopling) dos pacientes atendidos no CDerm que foram incluídos no estudo.

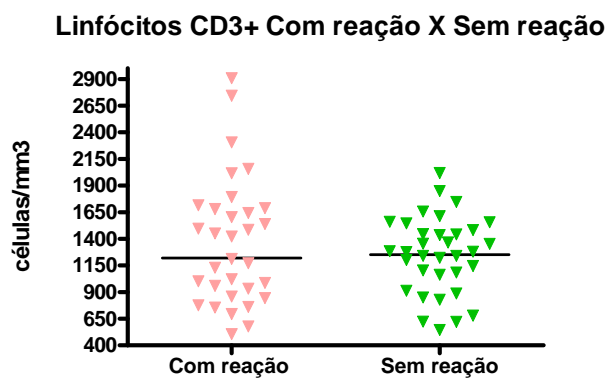
## 4.2 Contagem de subpopulações linfocitárias

### 4.2.1 Comparação de grupos com e sem formas reacionais de hanseníase e subgrupos de acordo com o período da MDT

#### 4.2.1.1 Linfócitos T (CD3<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos T nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente,  $1220 \pm 110$ , sendo o menor valor 199 e o maior 2908 e  $1250 \pm 61,68$ , sendo o menor valor 544 e o maior 2018.

Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística. (Figura 19).

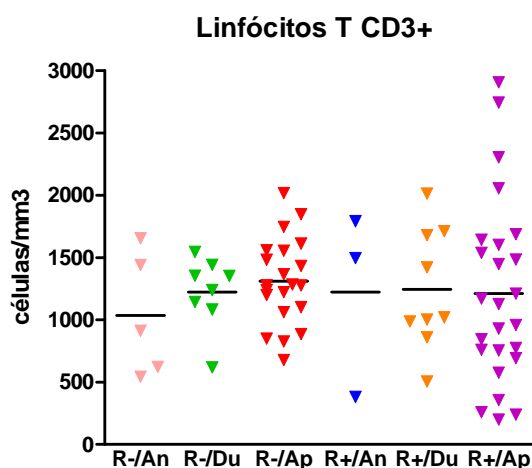


**FIGURA 19:** Média dos valores da contagem de linfócitos T em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase.

Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	Com Reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	p
Antes	1040 ± 494 (N=5, var. 544- 1660)	1220 ± 744 (N=3, 382- 1790)	ns
Durante	1220 ± 287 (N=8, var. 619- 1550)	1240 ± 488 (N=9, 506- 2020)	ns
Após	1310 ± 346 (N=21, var.678- 2020)	1210 ± 739 (N=25, var. 199- 2910)	ns

**FIGURA 20:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T totais, presença de reação e período do tratamento.

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos subgrupos (figura 21).



**FIGURA 21:** Média dos valores da contagem de linfócitos T nos seis subgrupos estudados.

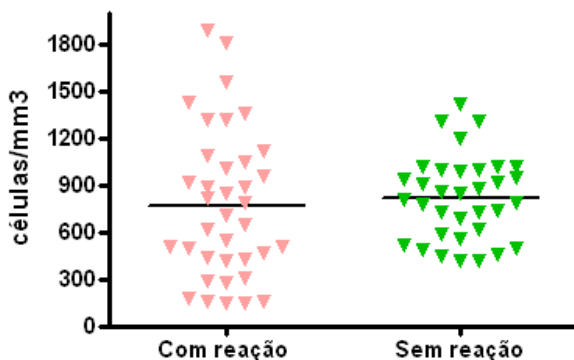
#### 4.2.1.2 Linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente,  $768.9 \pm 77.83$ , sendo o menor valor, 144 e o maior, 1882 e  $817.6 \pm 45.57$ , sendo o menor valor 413 e o maior 1413.



Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística (Figura 22).

### Linfócitos T CD4+ Com reação X Sem reação

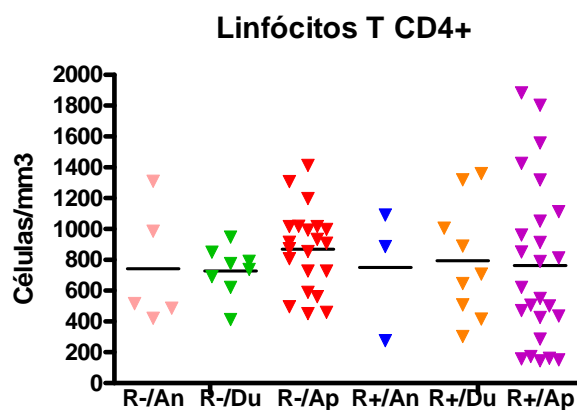


**FIGURA 22:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase ( $p > 0,05$ ).

Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	Com Reação Média + Desvio-adrão (Células/mm <sup>3</sup> )	p
Antes	743 ± 388 (N=5, var.421- 1309)	751 ± 424 (N=3, var. 276-1090)	ns
Durante	728 ± 161 (N=8, var. 413- 947)	795 ± 378 (N=9, var. 302- 1359)	ns
Após	869 ± 265 (N=21, var. 451- 1413)	762 ± 523 (N=25, var. 144- 1882)	ns

**FIGURA 23:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T auxiliares, presença de reação e período do tratamento.

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes não foi encontrada significância estatística entre nenhum deles (Figura 24).

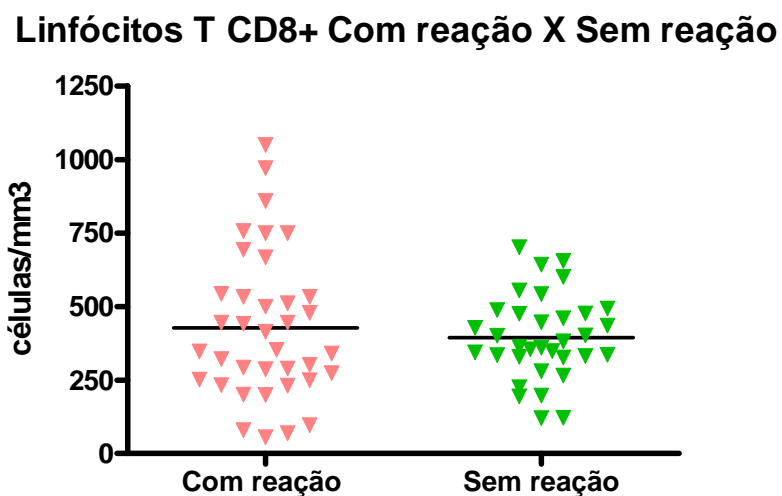


**FIGURA 24:** Média dos valores da contagem de linfócitos T auxiliares nos seis subgrupos estudados ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.1.3 Linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente,  $427,2 \pm 248,8$ , sendo o menor valor, 56 e o maior, 1049 e  $394,6 \pm 142,6$ , sendo o menor valor 120 e o maior 702.

Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística (figura 25).

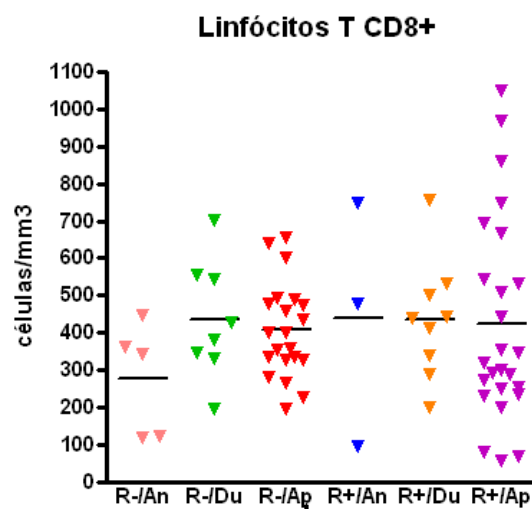


**FIGURA 25:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase.

Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	Com Reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	p
Antes	279 ± 150 (N=5, var. 120-446)	441 ± 328 (N=3, var.96- 749)	ns
Durante	435 ± 159 (N=8, var. 194- 702)	435 ± 160 (N=9, var. 201-757)	ns
Após	407 ± 127 (N=21, var.197- 655)	423 ± 274 (N=25, var. 56- 1049)	ns

**FIGURA 26:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T citotóxicos, presença de reação e período do tratamento.

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes não foi encontrada significância estatística (figura 27).



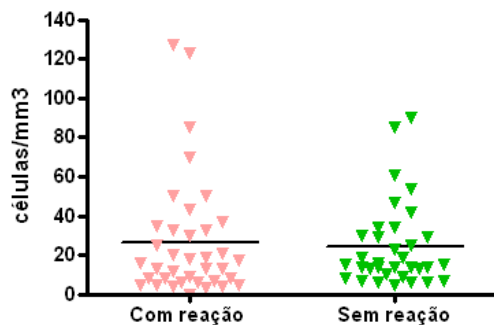
**FIGURA 27:** Média dos valores da contagem de linfócitos T citotóxicos nos seis subgrupos estudados.

#### 4.2.1.4 Linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>

As médias das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente, 26,51±30,62, sendo o menor valor 0 e o maior, 127 e 24,32±21,38, sendo o menor valor 5,0 e o maior, 90,0.

Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística (Figura 28).

**Linfócitos T CD4+ CD8+ Com reação X Sem reação**

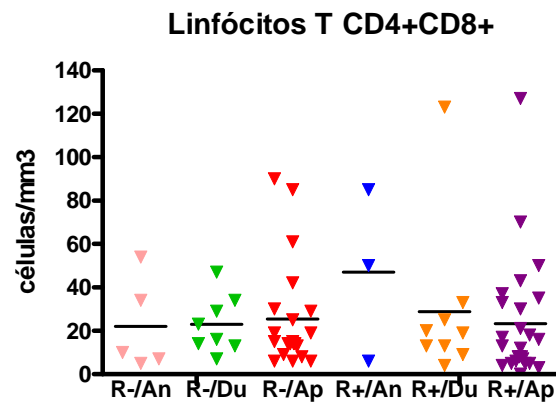


**FIGURA 28:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase ( $p>0,05$ ).

Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	Com Reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	p
Antes	22,0 ± 21,4 (N=5, var. 5- 54)	47,0 ± 39,6 (N=3, var. 6-85)	ns
Durante	22,9 ± 13,2 (N=8, var. 7-47)	28,8 ± 36,4 (N=9, var. 4-123)	ns
Após	25,4 ± 24,5 (N=21, var. 6-90)	23,2 ± 27,7 (N=25, var. 0- 127)	ns

**FIGURA 29:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, presença de reação e período do tratamento.

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes foi não encontrada significância estatística entre nenhum deles (figura 30).

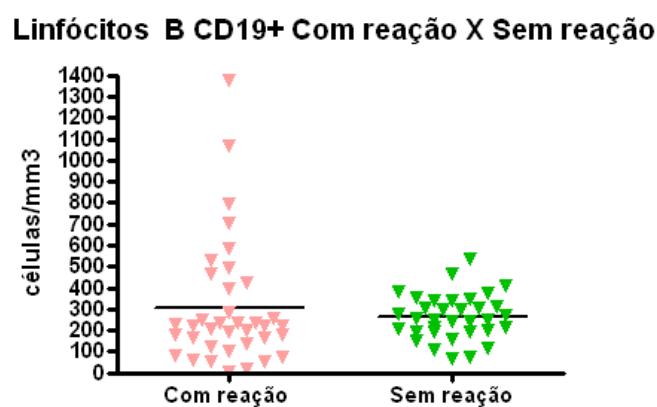


**FIGURA 30:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> nos seis subgrupos estudados ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.1.5 Linfócitos B (CD19<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos B CD19<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente  $303,8 \pm 291,5$ , sendo o menor valor, 6 e o maior, 1376 e  $264 \pm 106$ , sendo o menor valor 68,0 e o maior 535,0.

Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística (figura 31).

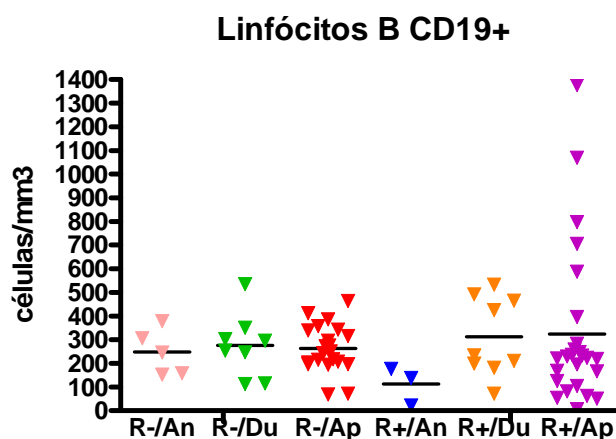


**FIGURA 31:** Média dos valores da contagem de linfócitos B CD19<sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase ( $p > 0,05$ ).

Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	Com Reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	p
Antes	248 ± 97,3 (N=5, var. 152- 379)	112 ± 81,2 (N=3, var. 21-177)	ns
Durante	277 ± 135 (N=8, var. 112- 535)	312 ± 166 (N=9, var. 27- 533)	ns
Após	263 ± 101 (N=21, var. 68- 464)	324 ± 336 (N=25, var. 6- 1376)	ns

**FIGURA 32:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos B, presença de reação e período do tratamento

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes foi não encontrada significância estatística entre nenhum deles (figura 33).



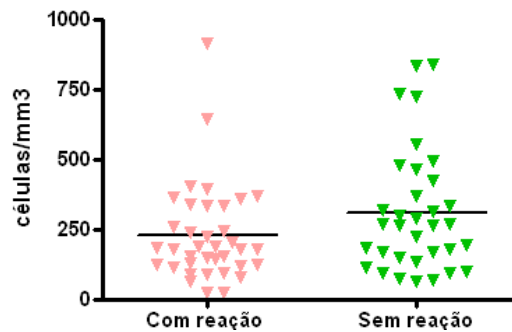
**FIGURA 33:** Média dos valores da contagem de linfócitos B nos seis subgrupos estudados ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.1.6 Linfócitos NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos NK nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente 226,1±172,5, sendo o menor valor 25 e o maior 911 e 309,5±218,6, sendo o menor valor 63 e o maior 837.

Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística (figura 34).

**Linfócitos NK CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Com reação X Sem reação**

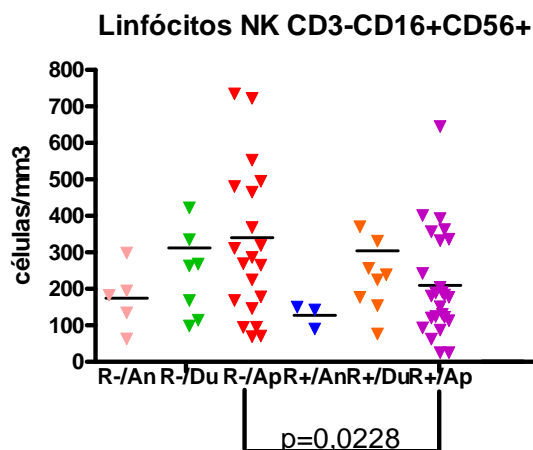


**FIGURA 34:** Média dos valores da contagem de linfócitos NK CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase ( $p > 0,05$ ).

Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm3)	Com Reação Média + Desvio-padrão (Células/mm3)	p
Antes	174 ± 86,3 (N=5, var. 63- 298)	127 ± 32,6 (N=3, var. 90- 150)	ns
Durante	313 ± 237 (N=8, var. 98-833)	304 ± 244 (N=9, var. 76- 911)	ns
Após	340 ± 228 (N=21, var. 69- 837)	210 ± 144 (N=25, var. 25- 645)	p=0,0228

**FIGURA 35:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos NK, presença de reação e período do tratamento.

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes foi encontrada significância estatística entre R-/Ap e R+/Ap com  $p = 0,0228$  (figura 36).

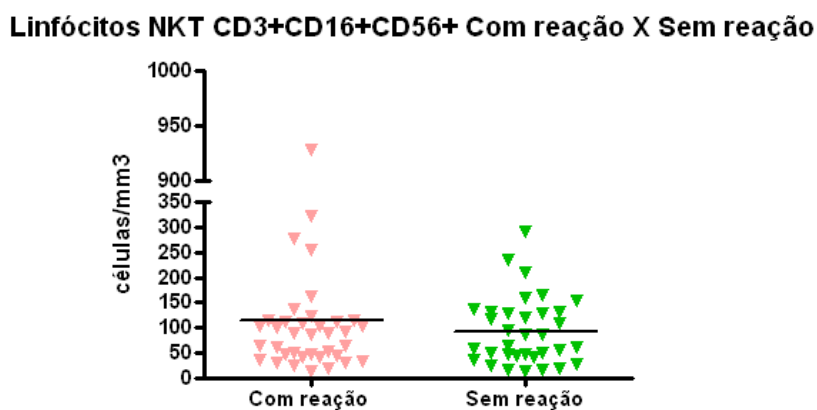


**FIGURA 36:** Média dos valores da contagem de linfócitos NK nos seis subgrupos estudados.

#### 4.2.1.7 Linfócitos NKT ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ )

As médias das contagens de linfócitos NKT nos grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram, respectivamente  $114,3 \pm 154$ , sendo o menor valor, 13 e o maior, 928 e  $92,41 \pm 67,47$ , sendo o menor valor 12 e o maior 292.

Na comparação entre os grupos de pacientes com forma reacional e sem forma reacional não foi encontrada significância estatística (figura 37).



**FIGURA 37:** Média dos valores da contagem de linfócitos NKT  $CD3^+CD16^+CD56^+$  em pacientes com e sem formas reacionais de hanseníase ( $p > 0,05$ ).

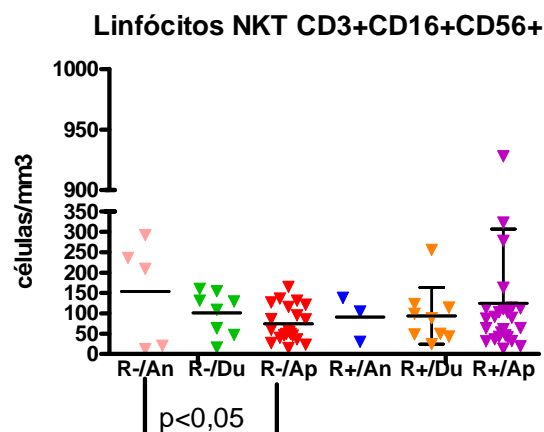


Período do Tratamento	Sem reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	Com Reação Média + Desvio-padrão (Células/mm <sup>3</sup> )	p
Antes	154 ± 129 (N=5, var. 12- 292)*	90.7 ± 55,2 (N=3, var. 30-138)	ns
Durante	101 ± 52,9 (N=8, var. 16- 160)	93.9 ± 69,9 (N=9, var. 24- 256)	ns
Após	74.5 ± 43,3 (N=21, var. 15- 165)*	125 ± 183 (N=25, var. 13- 928)	ns

\*Foi encontrada significância estatística entre os subgrupos R-/An e R-/Ap, em que  $p < 0,05$ .

**FIGURA 38:** Distribuição de pacientes segundo o número de linfócitos NKT, presença de reação e período do tratamento.

Na comparação entre os seis subgrupos de pacientes foi encontrada significância estatística entre R-/An e R-/Ap com  $p < 0,05$  (figura 39).



**FIGURA 39:** Média dos valores da contagem de linfócitos NKT nos seis subgrupos estudados

#### 4.2.2 Comparação de grupos por forma reacional

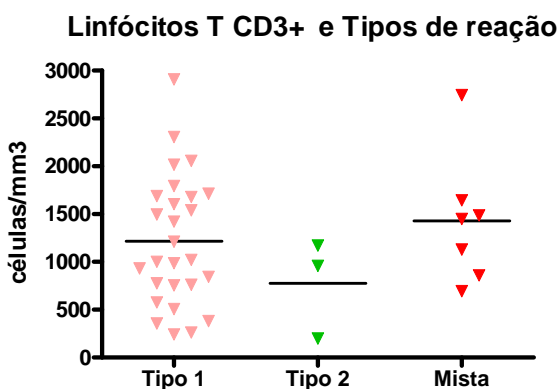
Os pacientes com formas reacionais de hanseníase foram agrupados de acordo com o tipo de reação: tipo 1 (1), tipo 2 (2) ou mista, em que há os dois tipos de reação (3), cujo número de pacientes era, respectivamente, 27, 3 e 7.

#### 4.2.2.1 Linfócitos T (CD3<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos T nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1= 1216±678,5, sendo o menor valor 240 e o maior 2908;
- Tipo 2= 776±510,9, sendo o menor valor 199 e o maior 958;
- Mista= 1429±675,1, sendo o menor valor 694 e o maior 2744;

Não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (figura 40).



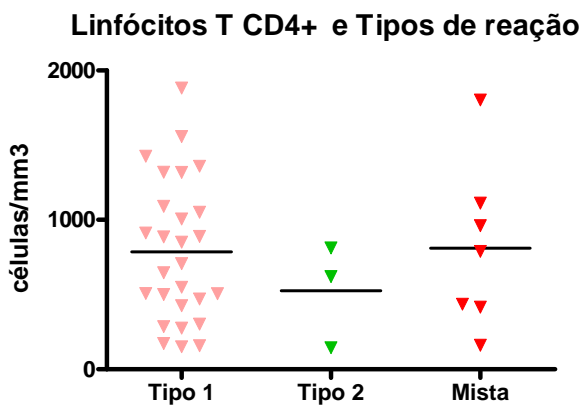
**FIGURA 40:** Média dos valores da contagem de linfócitos T nos diferentes tipos de reação.

#### 4.2.2.2 Linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1=785,1 ±473,1, sendo o menor valor 150 e o maior 1882;
- Tipo 2= 525,7±344,1, sendo o menor valor 144 e o maior 812;
- Mista= 810,9±550,2, sendo o menor valor 160 e o maior 1802;

Não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (figura 41).



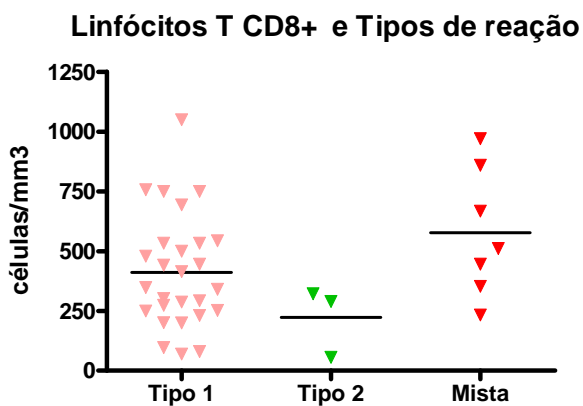
**FIGURA 41:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.

#### 4.2.2.3 Linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1= 411,2±237,4, sendo o menor valor 69 e o maior 1049;
- Tipo 2= 222±144,6, sendo o menor valor 56 e o maior 321;
- Mista= 576,9±268,4, sendo o menor valor 233 e o maior 970;

Não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (figura 42).



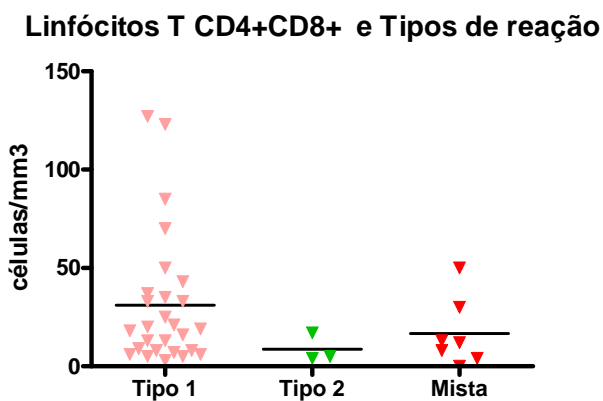
**FIGURA 42:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.

#### 4.2.2.4 Linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>

As médias das contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1= 31,04±33,76, sendo o menor valor 3 e o maior 127;
- Tipo 2= 8,667±7,234, sendo o menor valor 4 e o maior 17;
- Mista= 16,71±17,5, sendo o menor valor 0 e o maior 50;

Não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (Figura 43).



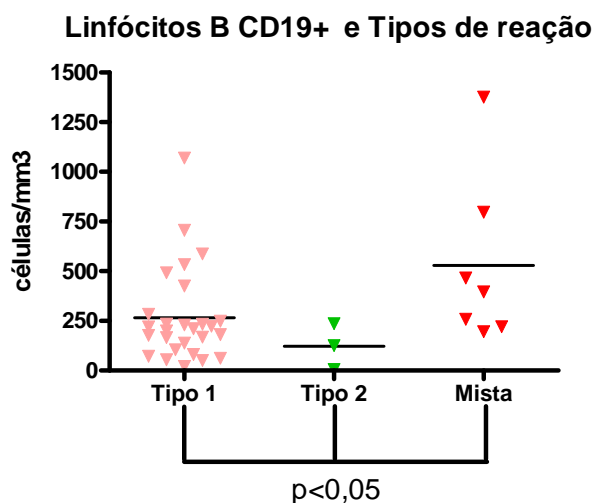
**FIGURA 43:** Média dos valores da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.

#### 4.2.2.5 Linfócitos B (CD19<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos B CD19<sup>+</sup> nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1= 265,4±235,8, sendo o menor valor 21 e o maior 1069;
- Tipo 2= 122,3±115, sendo o menor valor 6 e o maior 236;
- Mista= 529,7±426,4, sendo o menor valor 195 e o maior 1376;

Na comparação entre os três grupos simultaneamente foi encontrada significância estatística ( $p = 0,0495$ ), mas quando foram comparados dois grupos de cada vez, não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (figura 44).



**FIGURA 44:** Média dos valores da contagem de linfócitos B CD19<sup>+</sup> nos diferentes tipos de reação.

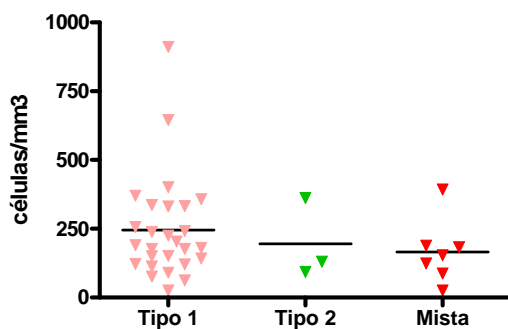
#### 4.2.2.6 Linfócitos NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos NK nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1= 245,3±187, sendo o menor valor 25 e o maior 911;
- Tipo 2= 195±145,8, sendo o menor valor 93 e o maior 362;
- Mista= 165±115,7, sendo o menor valor 25 e o maior 393;

Não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (Figura 45).

**Linfócitos NK CD3-CD16+CD56+ e Tipos de reação**



**FIGURA 45:** Média dos valores da contagem de linfócitos NK nos diferentes tipos de reação.

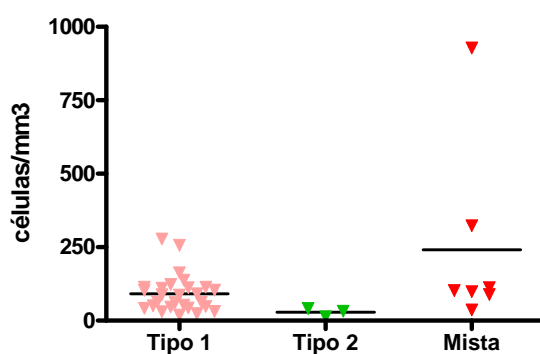
#### 4.2.2.7 Linfócitos NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>)

As médias das contagens de linfócitos NKT nos grupos de pacientes com reação tipo 1, tipo 2 e mista, dadas em células/mm<sup>3</sup>, foram:

- Tipo 1= 90,93±63,22, sendo o menor valor 19 e o maior 278;
- Tipo 2= 28,67±14,29, sendo o menor valor 13 e o maior 41;
- Mista= 241,3±316,2, sendo o menor valor 36 e o maior 928;

Não foi encontrada significância estatística entre nenhum dos grupos (figura 46).

**Linfócitos NKT CD3+CD16+CD56+ e Tipos de reação**



**FIGURA 46:** Média dos valores da contagem de linfócitos NKT nos diferentes tipos de reação.

#### 4.2.3 Comparação de grupos por forma clínica

Foram feitas análises estatísticas entre os grupos distintos de pacientes de acordo com as formas reacionais (BT, BB, BV e VV), porém não foram encontrados resultados estatisticamente significantes.

## 5 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença cujo espectro varia de acordo com a imunidade do hospedeiro, por isso se apresenta de várias formas que vão do polo em que há muita atividade imunológica celular (polo tuberculoide) até o polo em que há pouca ou nenhuma atividade imunológica celular (polo virchowiano) (ARAÚJO, 2003).

O Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em número de casos de hanseníase (OMS, 2012) e o Ceará é considerado endêmico, apresentando alto coeficiente de detecção geral a cada ano (CEARÁ, 2012).

No desenvolvimento da imunidade contra o *Mycobacterium leprae*, os linfócitos são células que têm um papel fundamental (MODLIN *et al.*, 1988). Este estudo buscou descrever as subpopulações de linfócitos em pacientes com formas reacionais de hanseníase e compará-los com os que não as apresentaram.

A maioria dos estudos com resposta imunológica na hanseníase avaliou os níveis de citocinas (ANTAS *et al.*, 2004) ou pesquisou as células presentes na lesão tecidual (MODLIN *et al.*, 1983a; MODLIN *et al.*, 1983b). Aquele que mais se assemelhou ao presente estudo foi conduzido por Rea *et al.* (1984) que utilizou também citometria de fluxo, mas pesquisou apenas linfócitos T totais, linfócitos T auxiliares e T supressores por meio de anticorpos monoclonais OKT3, OKT4 e OKT8, comparando pacientes com hanseníase com controles saudáveis e pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES). Neste estudo, 122 pacientes com hanseníase foram comparados a 23 controles saudáveis e 27 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, sendo observada linfopenia às custas de células OKT3, OKT4 e OKT8 nos pacientes com forma lepromatosa e sem formas reacionais. Ademais, foi observada redução de células OKT4 positivas em pacientes com hanseníase e reação reversa em padrão semelhante ao observado no grupo de indivíduos com lúpus. Em outro estudo, Modlin *et al.* (1985) compararam subpopulações de linfócitos T em pacientes com e sem ENH no sangue e na lesão, porém os resultados encontrados na lesão não podem ser comparados aos do sangue, considerando que os linfócitos são células importantes na formação do granuloma da hanseníase e que poderia haver migração destas células do sangue periférico para o sítio da lesão (CRAWFORD; HARDWICKE, 2011).

Mais recentemente, foram pesquisadas subpopulações linfocitárias e receptores de quimiocinas em sangue periférico, porém a comparação foi feita em grupos pequenos, com seis casos e cinco controles saudáveis e não foi considerada a presença de formas reacionais.



Foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas nos linfócitos NKT (MENDONÇA *et al.*, 2008b).

No presente estudo a comparação entre os grupos de pacientes com formas reacionais e sem formas reacionais não evidenciou diferença estatística em relação a nenhuma subpopulação linfocitária. Resultado diferente do encontrados por Modlin *et al.* (1985) em que foram comparados ENH (reação do tipo 2), com pacientes VV sem ENH e houve uma linfopenia e redução proporcional dos linfócitos T totais, T auxiliares e T citotóxicos no grupo sem reação. Já foi observado que na reação do tipo 1, apenas 30% dos granulomas apresentam linfócitos T CD8<sup>+</sup>, sendo a grande maioria localizados na periferia (MODLIN *et al.*, 1983b).

Quando foram comparados subgrupos de pacientes de acordo com a presença de formas reacionais de hanseníase: com reação (R+) ou sem reação (R-) e o período em que estavam em relação à MDT: antes (An), durante (Du) ou após (Ap) foram encontradas diferenças apenas entre as subpopulações de linfócitos NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) e NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>).

Entre os subgrupos nos linfócitos NK, foi encontrada significância estatística na comparação entre R-/Ap e R+/Ap (p=0,0228) em que ambos os grupos são de pacientes que já terminaram a MDT e a média de linfócitos entre os pacientes sem reação foi maior do que os com reação: R-/Ap (340±228 células/mm<sup>3</sup>) e R+/Ap (210±144 células/mm<sup>3</sup>).

Nos linfócitos NKT a média apresentou-se maior estatisticamente significativa no subgrupo R-/An (154±129 células/mm<sup>3</sup>) do que no R-/Ap (74,5±43,3 células/mm<sup>3</sup>), corroborando com resultado encontrado por MENDONÇA *et al.* (2008b). Também foram encontrados linfócitos NKT em lesões de pacientes com hanseníase tuberculoide e com reação do tipo 1 (MEMPEL *et al.*, 2000).

Na comparação de grupos por forma reacional (tipo 1, tipo 2 e mista) foi encontrada significância estatística apenas em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) quando comparados simultaneamente os três grupos (p=0,0495), mas não na comparação de dois a dois. Um aumento na quantidade de células CD19<sup>+</sup> foi observado nos pacientes que apresentaram forma reacional mista. A análise entre os grupos de pacientes com diferentes formas reacionais ficou limitada pelo número reduzido de pacientes no grupo com reação tipo 2 e mista, respectivamente, 3 e 7 em comparação ao número de pacientes com reação tipo 1 (27).

Foi demonstrada através de imunohistoquímica a presença de linfócitos B, inclusive de plasmócitos, em lesões ativas de pacientes com forma VV, BL com biópsia negativa e TB (IYER, *et al.*, 2007), porém não tivemos conhecimento de trabalhos que estudaram a presença de linfócitos B em sangue periférico.

Na análise entre os grupos de pacientes por forma clínica também não foram encontradas diferenças significativas. Provavelmente, a limitação para esta comparação se deveu à necessidade de um tamanho amostral maior que permitisse a formação de subgrupos com número maior de pacientes.

Apesar de todos os pacientes deste estudo terem sido submetidos à biópsia de lesão cutânea, não foi possível relacionar estes achados de resultados das biópsias (exame histopatológico) com aqueles encontrados na citometria de fluxo. Para que tal relação fosse realizada seria necessária a realização de imunohistoquímica para caracterização de subpopulações linfocitárias no tecido. Esta análise permitiria uma compreensão mais clara do papel de linfócitos na resposta imunológica ao *M. leprae*.

## 6 CONCLUSÕES

No presente estudo a comparação entre os grupos de pacientes com e sem formas reacionais não evidenciou diferença estatística em relação às subpopulações linfocitárias estudadas, porém quando comparados subgrupos de pacientes de acordo com a presença de formas reacionais de hanseníase e o período em que estavam em relação à MDT foi encontrada redução de linfócitos NK ( $CD3^-CD16^+ CD56^+$ ) no grupo de pacientes pós-tratamento com reação em relação ao grupo pós-tratamento sem reação. A população de células NKT ( $CD3^+CD16^+ CD56^+$ ) estava reduzida no grupo sem reação pós-tratamento quando comparado ao grupo sem reação antes do tratamento. Também se observou um aumento na população  $CD19^+$  nos indivíduos com reação do tipo mista, quando comparados simultaneamente com os de tipo 1 e tipo 2.

## REFERÊNCIAS

AKIRA S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, p. 499–511, 2004.

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.

APOSTOLOU, I.; TAKAHAMA, Y.; BELMANT, C.; KAWANO, T.; HUERRE, M.; MARCHAL, G.; CUI, J.; TANIGUCHI, M.; NAKAUCHI, H.; FOURNIÉ, J.J.; KOURILSKY, P.; GACHELIN, G. Murine natural killer T (NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 96, p. 5141–5146, 1999.

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

ARRUNATEGUI-CORREA, V.; LENZ, L.; KIM, H.S. CD1d-independent regulation of NKT cell migration and cytokine production upon *Listeria monocytogenes* infection. **Cellular Immunology**, v. 232, p. 38–48, 2004.

ASZ-SIGALL, D.; LÓPEX-GARCIA, L.; NEME-YUNES, Y.; YUEN- PALOS, R.; VEGAMEMIJE, M.E.; ARENAS, R. Type 1 reaction in a borderline leprosy case successfully treated with multidrug therapy and ofloxacin. **International Journal of Dermatology**, v. 47, p. 1084–1086, 2008.

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.

BAFICA, A; SCANGA, C.A.; FENG, C.G.; LEIFER, C.; CHEEVER, A.; SHER, A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1715–1724, 2005.

BARBOSA, J.C. **Pós-alta em hanseníase no Ceará: olhares sobre políticas, rede de atenção à saúde, limitações funcionais, de atividades e participação social das pessoas atingidas.** [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2009.

BARRERA, S.L.; FINIASZ, M.; FINK, S.; ILARREGUI, J.; ALEMAN, M.; OLIVARES, L.; FRANCO, M.C.; PIZZARIELLO, G.; DEL CARMEN SASIAIN, M. NK cells modulate the cytotoxic activity generated by *Mycobacterium Leprae* -hsp65 in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 135, p. 105–113, 2004.

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.

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

BENDELAC, A; LANTZ, O.; QUIMBY, M.E.; YEWDELL, J.W.; BENNINK, J.R.; BRUTKIEWICZ, R.R. CD1 recognition by mouse NK1+T lymphocytes. **Science**, v. 268, p. 863-865, 1995.

BENDELAC, A; RIVERA, M.N.; PARK, S.H.; ROARK, J.H. .Mouse CD1<sup>+</sup> specific NK1T cells: development, specificity, and function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 535–562, 1997.

BENDELAC, A; BONNEVILLE, M.; KEARNEY, J.F. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. **Nature Reviews. Immunology**, v. 1, p. 177-186, 2001.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, p. 257–263, 2004.

Biópsias. In.: LUGO, A.R. *et al* (Ed.). **Dermatologia Ibero-Americana Online**, Disponível em: <<http://piel-l.org/libreria/item/917>>. Acesso em 3 mai. 2011

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.

BLEHARSKI J.R; LI, H.; MEINKEN, C.; GRAEBER, T.G.; OCHOA, M.T.; YAMAMURA, M.; BURDICK, A.; SARNO, E.N.; WAGNER, M.; RÖLLINGHOFF, M.; REA, T.H.; COLONNA, M.; STENGER, S.; BLOOM, B.R.; EISENBERG, D.; MODLIN, R.L. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. **Science**, v.301, p. 1527–1530, 2003.

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: Editora do Ministério da Saúde, 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso 7. Ed. rev. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2008b.

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

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, p. 1209-1219, 2004.

BROSSAY, L; CHIODA, M.; BURDIN, N.; KOEZUKA, Y.; CASORATI, G; DELLABONA, P.; KRONENBERG, M. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 1521-1528, 1998.

CALIGIURI, M. Human natural killer cells. **Blood**, v.112, p. 461–469, 2008.

CAMACHO, I.D.; VALENCIA, I.; RIVAS, M.P.; BURDICK, A.E. Type 1 Leprosy Reaction Manifesting after discontinuation of Adalimumab Therapy. **Archives of Dermatology**, v. 45, p. 349-351, 2009.

CARDOSO, C.C.; PEREIRA, A.C.; BRITO-DE SOUZA, V.N.; DURAES, S.M.B.; RIBEIRO-ALVES, M.; NERY, J.A.C.; FRANCO, A.S.; VANDERBORGHT, P.R.; PARELLI, F.P.C.; ALTER, A.; SALGADO, J.L.; SAMPAIO, E.P.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, M.L.W.R.; SARNO, E.N.; SCHURR, E.; MIRA, M.T.; PACHECO, A.G.; MORAES, M.O. TNF -308G. A Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Among Brazilians: A Genetic Epidemiology Assessment, Meta-Analysis, and Functional Study. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 204, n. 8, p. 1256–1263, 2011.

CASTRO, N.C.; BELTRÁN, C. Frecuencia de infección por *Mycobacterium leprae* en convivientes de pacientes con lepra, Antioquia 2001-2002. **Revista CES Medicina**, v. 18, n. 1p. 61-67, 2004.

CEARÁ, Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico- Hanseníase**. Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde / Núcleo de Epidemiologia / SESA/CE. Fortaleza, 2012.

CHATTREE, V; KHANNA, N.; BISHT, V.; RAO, D.N. Inhibition of apoptosis, activation of NKT cell and upregulation of CD40 and CD40L mediated by *M. leprae* antigen(s) combined with Murabutide and Trat peptide in leprosy patients. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 309, p. 87–97, 2008.

CHIMELLI, L; FREITAS, M.; NASCIMENTO, O. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. **Journal of Neurology**, v. 244, p. 318–323, 1997.

CONGRESSO DE MADRID Classificação, Resolução Técnica, VI Congresso Internacional de Leprologia. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. 21, p. 504–516, 1953

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

COOPER, C.L; MUELLER, C.; SINCHAI SRI, T.A.; PIRMEZ, C.; CHAN, J.; KAPLAN, G.; YOUNG, S.M.; WEISSMAN, I.L.; BLOOM, B.R.; REA, T.H. *et al.* Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. **The Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.1565-1581, 1989.

CUEVAS, J.; RODRÍGUES-PERALTO, J.L.; CARRILLO, R.; CONTRERAS, F. Erythema Nodosum Leprosum: Reactional Leprosy. **Seminars of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 26, p. 126-130, 2007.

CUNHA, S.S; RODRIGUES, L.C.; PEDROSA, V.; DOURADO, I.M.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. **Leprosy Review**, v. 75, p. 357-366, 2004.

CRAWFORD, C. L; HARDWICKE, P. Experimental leprosy: a model of epithelioid cell granuloma. **International Journal of Dermatology**, v. 50, p. 255–261, 2011.

CROFT, M. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: hVEM-BTLA. **Trends in Immunology**, v. 26, p. 292–294, 2005.

CRUZ, D.; WATSON, A.D.; MILLER, C.S.; MONTOYA, D.; OCHOA, M.T.; SIELING, P.A.; GUTIERREZ, M.A.; NAVAB, M.; REDDY, S.T.; WITZTUM, J.L.; FOGELMAN, A.M.; REA, T.H.; EISENBERG, D.; BERLINER, J.; MODLIN, R.L. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p. 2917–2928, 2008.

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

DURIE, F.H.; FOY, T.M.; MASTERS, S.R.; LAMAN, J.D.; NOELLE, R.J. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. **Immunology Today**, v. 15, p. 406-411, 1994.

DUTHIE, M.S.; GOTO, W.; IRETON, G.C.; REECE, S.T.; SAMPAIO, L.H.; GRASSI, A.B.; SOUSA, A.L.; MARTELLI, C.M.; STEFANI, M.M.; REED, S.G. Antigen-Specific T-Cell Responses of Leprosy Patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1659–1665, 2008.

EAGER, T.N.; KARANDIKAR, N.J.; BLUESTONE, J.A.; MILLER, S.D. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 972–981, 2002.

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 e Sociedade**, v.13, p.76-88, 2004.

ESFANDBOD, M. Tuberculoid Leprosy. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p.17, 2011.

ESQUENAZI, D.; MOREIRA, A.L.; MIRANDA, A.; NERY, J.A.; ALVARENGA, F.F.; SARNO, E.N.; PEREIRA, G.M. Clinical, immunological and histological aspects of an uncommon type II reaction in patients with lepromatous leprosy. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 33, p. 294–297, 2008.

EXLEY M.; GARCIA, J.; BALK, S.P.; PORCELLI, S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p. 109-120, 1997.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 4ª 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.

FINE, P.E.M.; STERNE, J.A.C.; PONNIGHAUS, J.M.; BLISS, L.; SAUL, J.; CHIHANA, A.; MUNTHALI, M.; WARNDORFF, D.K. Household and Dwelling Contact as Risk Factors for Leprosy in Northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 91-102, 1997.

FOSS, N.T., OLIVEIRA, E.B., SILVA, C.L. Correlation between TNF production, increase of plasma-C- reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to Concanavalin A during erythema nodosum leprosum. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. 61, p. 218-226, 1993.

FUJII, S.; SHIMIZU, K.; SMITH, C.; BONIFAZ, L.; STEINMAN, R.M. Activation of natural killer T cells by alphagalactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 267-279, 2003.

GALY, A.; TRAVIS, M.; CEN, D.; CHEN, B. Human T, B, natural killer and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. **Immunity**, v. 3, p. 459-473, 1995.

GARBINO, J.A. Ensaio clínico e neurofisiológico sobre a resposta no nervo ulnar, na hanseníase em reação tipo 1 e tipo 2, sob diferentes regimes de esteróides via oral. 2006. 114f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. São Paulo, 2006.

GARBINO, J.A.; NAAFS, B.; URA, S.; SALGADO, M.H.; VIRMOND, M. Neurophysiological patterns of ulnar nerve neuropathy in leprosy reactions. **Leprosy Review**, v.81, n.3, p.206-215, 2010.

GOULART, I.M.B.; ARBEX, G.L.; CARNEIRO, M.H.; RODRIGUES, M.S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.453-460, 2002.

HAGGE, D.A.; SAUNDERS, B.M.; EBENEZER, G.J.; RAY, N.A.; MARKS, V.T.; BRITTON, W.J.; KRAHENBUHL, J.L.; ADAMS, L.B. Lymphotoxin-  $\alpha$  and TNF Have Essential but Independent Roles in the Evolution of the Granulomatous Response in Experimental Leprosy. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 4, 2009.

HASHIMOTO, K.; MAEDA, Y.; KIMURA, H.; SUZUKI, K.; MASUDA, A.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M. Infection of *M. leprae* to monocyte derived dendritic cells and its influence on antigen presenting function. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5167–5176, 2002.

HASLETT, P.A.J.; ROCHE, P.; BUTLIN, C.R.; MACDONALD, M.; SHRESTHA, N.; MANANDHAR, R.; LEMASTER, J.; HAWKSWORTH, R.; SHAH, M.; LUBINSKY, A.S.; ALBERT, M.; WORLEY, J.; KAPLAN, G. Effective Treatment of Erythema Nodosum Leprosum with Thalidomide Is Associated with Immune Stimulation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 2045–2053, 2005.

HERMANS, I.F.; SILK, J.D.; GILEADI, U.; SALIO, M.; MATHEW, B.; RITTER, G.; SCHMIDT, R.; HARRIS, A.L.; OLD, L.; CERUNDOLO, V. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 5140-5147, 2003.

HEUKELBACH, J.; CHICHAVA, A.O.; DE OLIVEIRA, A.R.; HÄFNER, K.; WALTHER, F.; DE ALENCAR, C.H.; RAMOS, A.N. JR.; FERREIRA, A.C.; ARIZA, L. Interruption and Defaulting of Multidrug Therapy against Leprosy: Population-Based Study in Brazil's Savannah Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p.1031, 2011.

HYODO, Y.; MATSUI, K.; HAYASHI, N.; TSUTSUI, H.; KASHIWAMURA, S.; YAMAUCHI, H.; HIROISHI, K.; 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. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 1662–1668, 1999.

ILHAN, F.; CICEK, D.; GÖDEKMERDAN, A.; TAHRAN, G.; BULUT, V. CD5+ B cells ratio in lepromatous leprosy. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 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, W.R. JR.; CHAE, G.T.; PORCELLI, S.A. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections. **Clinical Immunology**, v. 127, n. 2, p. 214–224, 2008.

IMBIRIBA, E.B.; HURTADO-GUERRERO, J.C.; GARNELO, L.; LEVINO, A.; CUNHA, MDA. G.; PEDROSA, V. Epidemiological profile of leprosy in children under 15 in Manaus (Northern Brazil), 1998-2005. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 6, p. 1021-1026, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, p. 987–995, 2004.

IYER, A.; HATTA, M.; USMAN, R.; LUITEN, S.; OSKAM, L.; FABER, W.; GELUK, A.; DAS, P. Serum levels of interferon- $\gamma$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ , soluble interleukin-6R and soluble cell activation markers for monitoring response to treatment of leprosy reactions. **Clinical and Experimental Immunology**, v.150, p. 210–216, 2007.

IYER, A. M. **Immunopathology of Leprosy**: Towards the search for diagnostic and prognostic biomarkers in elucidating pathobiology and their utility in patient care. 2009. 170f. Thesis - Department of Pathology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, 2009.

JANEWAY JR, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.

JL,B.; PERANI, E.G.; PETINOM, C.; GROSSET, J.H. Bactericidal activities of combinations of new drugs against *Mycobacterium leprae* in nude mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 393–399, 1996.

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.

KAUFMANN, S.H. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Immunology Today**, v. 9, p. 168-174, 1988.

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, p. 4549–4563, 2010.

KERR-PONTES, L.R.S.; BARRETO, M.L.; EVANGELISTA, C.M.N.; RODRIGUES, L.C.; HEUKELBACH, J.; FELDMIEIER, H. Socioeconomic, environmental and behavioral risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, p. 994-1000, 2006.

KIMURA, H.; MAEDA, Y.; TAKESHITA, F.; TAKAOKA, L.E.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria infected macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.60, p.278–286, 2004.

KRATZ, A.; CAMPOS-NETO A, HANSON MS, RUDDLE NH: Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 1461–1472, 1996.

LEE, P.S.; LIN, C.N.; CHUANG, S.S. Immunophenotyping of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphomas by Multiparameter Flow Cytometry. **Pathology, Research and Practice**, 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.

LENSCHOW, D.J.; WALUNA, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 233–258, 1996.

LEWINSOHN, D.M.; ALDERSON, M.R.; BRIDEN, A.L.; RIDDELL, S.R.; REED, S.G.; GRABSTEIN, K.H. Characterization of human CD8 $\beta$  T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected antigen-presenting cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.187, p.1633–1640, 1998.

LI, H.Y.; HU, L.F.; WU, P.W.; LUO, J.S.; LIU, X.M. Fixed-duration multidrug therapy in multibacillary leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. Jun;65(2):230-7, 1997.

LINSLEY, P.S.; BRADY, W.; GROSMIRE, L.; ARUFFO, A.; DAMLE, N.K.; LEDBETTER, J.A. Binding of the B cell activation B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin-2 mRNA accumulation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 721– 730, 1991.

LONG, E.O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 875–904, 1999.

MACLENNAN, I.C. Germinal centers. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 117-139, 1994.

MASTRANGELO, G.; SILVA NETO, J.; SILVA, G.V.; SCOZZATO, L.; FADDA, E.; DALLAPICOLA, M.; FOLLETO, A.L.; CEGOLON, L. Leprosy reactions: the effect of gender and household contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p. 92-96, 2011.

MAEDA, Y.; MUKAI, T.; SPENCER, J.; MAKINO, M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. **Infection and Immunity**, v.73, N. 5, p. 2744–2750, 2005.

MAKINO, M., MAEDA, Y., ISHII, N. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. **Cellular Immunology**, v.233, p. 53–60, 2005.

MANETTI, R.; GEROSA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; PARRONCHI, P.; PICCINNI, M.P.; SAMPOGNARO, S.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; TRINCHIERI, G. Interleukin 12 induces stable priming for interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN- $\gamma$  production in established Th2 cell clones. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1273-1283, 1994.

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. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 487-513, 2005.

MEANS, T.K.. Human Toll-Like Receptors Mediate Cellular Activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 3920–3927, 1999.

MELO NAVES, M.; GOMES PATROCINIO, L.; PATROCINIO, J.A.; NAVES MOTA, F.M.; DINIZ DE SOUZA, A.; NEGRÃO FLEURY, R.; BERNARDES GOULART, I.M. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 23, n. 2, p. 177-180, 2009.

MEMPEL, M.; FLAGEUL, B.; SUAREZ, F.; RONET, C.; DUBERTRET, P.; GACHELIN, G.; MUSETTE, P. Leprous and Cutaneous Sarcoid Granulomas : Presence of V $\alpha$ 24-Invariant

Natural Killer T Cells in T-Cell-Reactive Leprosy Together with a Highly Biased T Cell Receptor *V $\alpha$*  Repertoire. **The American Journal of Pathology**, v. 157. n.2, p. 509- 523, 2000.

MENDIRATTA, V.; JAIN, A.; CHANDER, R.; KHAN, A.; BARARA, M. A nine-year clinico-epidemiological study of Histoid Hansen in India. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5.n. 2, p. 128-131, 2011.

MENDONÇA, V.A.; COSTA, R.D.; MELO, G.E.B.A.; ANTUNES, C.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 343-350, 2008a.

MENDONÇA, V.A.; MELO, G.E.B.A.; TEIXEIRA, M.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; ANTUNES, C.M.; TEIXEIRA, A.L. Análise de receptores de quimiocinas na superfície de leucócitos de indivíduos infectados pelo *Mycobacterium leprae*: resultados preliminares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 95-98, 2008b.

MERCER, J.C.; RAGIN, M.J.; AUGUST, A. Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1337–1343, 2005.

MILLER, J.S.; ALLEY, K.A.; MCGLAVE, P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34<sup>+</sup> NK progenitor. **Blood**, v. 83 p. 2594-2601, 1994.

MIRA, M.T.; ALCAÏS, A.; NGUYEN, V.T.; MORAES, M.O.; DI FLUMERI, C.; VU, H.T.; MAI, C.P.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, N.B.; PHAM, X.K.; SARNO, E.N.; ALTER, A.; MONTPETIT, A.; MORAES, M.E.; MORAES, J.R.; DORÉ, C.; GALLANT, C.J.; LEPAGE, P.; VERNER, A.; VAN DE VOSSE, E.; HUDSON, T.J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v.12, n.427, p.636–640, 2004.

MIRA, M.T.; ALCAÏS, A.; NGUYEN, V.T.; VU, H.T.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, N.B.; VERNER, A.; HUDSON, T.J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature genetics**, v.33, n.3, p. 412-415, 2003.

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.

MODLIN, R.L.; HOFMAN, F.M.; TAYLOR, C.R.; REA, T.H. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.8, p.182–189, 1983a.

MODLIN, R.L.; GEBHARD, J. F.; TAYLOR, C. R.; REA, T. H. *In situ* characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy **Clinical Experimental Immunology**, v. 53, p. 17-24, 1983b.

MODLIN, R.L.; BAKKE, A.C.; VACCARO, S.A.; HORWITZ, D.A.; TAYLOR, C.R.; REA, T.H. Tissue and blood T-lymphocyte subpopulations in erythema nodosum leprosum. **Archives of Dermatology**, v. 121, p. 216-219, 1985.

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. **Science Direct**, v. 22, p. 48-54, 2010.

MORETTA, A.; BOTTINO, C.; VITALE, M.; PENDE, D.; CANTONI, C.; MINGARI, M.C.; BIASSONI, R.; MORETTA, L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 197–223, 2001.

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

NATH, I., VEMURI, N., REDDI, A.L., JAIN, S., BROOKS, P., COLSTON, M.J., MISRA, R.S. RAMESH, V. The effect of antigen presenting cells on the cytokines profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. **Immunology letters**, v. 75, p. 69-76, 2000.

NIEDA, M.; OKAI, M.; TAZBIRKOVA, A.; LIN, H.; YAMAURA, A.; IDE, K.; ABRAHAM, R.; JUJI, T.; MACFARLANE, D.J.; NICOL, A.J. Therapeutic activation of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. **Blood**, v. 103, p. 383-389, 2004.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Report on the sixth meeting of the WHO Technical Advisory Group on Elimination of Leprosy. (Geneva, 9 and 10 February 2004) Disponível em:

<[http://www.searo.who.int/LinkFiles/Reports\\_4-6thMtnng\\_WTAG\\_Elimination\\_Leprosy\\_Geneva.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Reports_4-6thMtnng_WTAG_Elimination_Leprosy_Geneva.pdf)> . Acesso em 21 de agosto de 2011.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE- WORLD HEATH ORGANIZATION. WHO recommended MDT regimens. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/mdt/regimens/en/index.html>>. Acesso em: 20 setembro de 2010.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE- WORLD HEATH ORGANIZATION. World Health Statistics 2012. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em 30 de julho de 2012.

ORME, I.M.; ROBERTS, A.D.; GRIFFIN, J.P.; ABRAMS, J.S. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Immunology**, v.151, p.518–525, 1993.

OTTENHOFF, T. H.; VRIES, R.R. DE. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. 55, p. 521–534, 1987.

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.

PENNA, G. O.; PINHEIRO, A.M.; NOGUEIRA, L.S.; CARVALHO, L.R.; OLIVEIRA, M.B.; CARREIRO, V.P. Clinical and epidemiological study of leprosy cases in the University Hospital of Brasília: 20 years - 1985 to 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n.6, p. 575- 580, 2008.

PEREIRA, H.L.A.; RIBEIRO, S.L.E.; PENNINI, S.N. SATO, E.I. Leprosy-related joint involvement. **Clinical Rheumatology**, v. 28, v. 79-84, 2008.

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.

RASHED, H.A.; MEARAG, I.; SALEH, N.M.; SAIED, A. Histopathological lesions of apparently normal skin in leprosy patients. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 39, n.3, p. 933-942, 2009.



REA, T.H.; BAKKE, A.C.; PARKER, J.W.; MODLIN, R.L.; HORWITZ, D.A. Peripheral blood T lymphocyte subsets in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. 52, p. 311-317, 1984.

RENNERT, P.D.; BROWNING, J.L.; MEBIUS, R.; MACKAY, F.; HOCHMAN, P.S. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 1999–2006, 1996.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v.34, n. 3, p. 255-273, 1966.

RODRIGUES, L.C.; KERR-PONTES, L.R.; FRIETAS, M.V.; BARRETO, M.L. Long lasting BCG protection against leprosy. **Vaccine**, v. 25, p. 6842- 6844, 2007.

RODRIGUEZ, J.N. The histoid leproma: its clinical characteristics and significance. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v.37, p.1-21, 1969.

RONET, C.; DARCHE, S.; LEITE DE MORAES, M.; MIYAKE, S.; YAMAMURA, T.; LOUIS, J.A.; KASPER, L.H.; BUZONI-GATEL, D. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 899–908, 2005.

SALES, A.M.; LEON, A.P.; DÜPPRE, N.C.; HACKER, M.A.; NERY, J.A.C.; SARNO, E.N.; PENNA, M.L. F. Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 5, p.1013, 2011.

SANTOS D.O.; SANTOS, S.L.; ESQUENAZI, D.; NERY, J.A.; DEFROYT, M.; LORRÉ, K.; VAN HEUVERSWYN, H. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. **Japanese Journal of Leprosy**, v.70, p. 15–24, 2001.

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

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, p. 113–116, 2007.

SEINO, K.; MOTOHASHI, S.; FUJISAWA, T.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M. Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. **Cancer Science**, v. 97, p. 807–812, 2006.

SERGEANTSON, S. HLA and susceptibility to leprosy. **Immunology Review**, v. 70, p. 89–112, 1983.

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.

SINSIMER, D.; FALLOWS, D.; PEIXOTO, B.; KRAHENBUHL, J.; KAPLAN, G.; MANCA, C. Mycobacterium leprae Actively Modulates the Cytokine Response in Naïve Human Monocytes. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 293–300, 2010.

SPENCER, J.S.; DOCKRELL, H.M.; KIM, H.J.; MARQUES, M.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINS, M.V.; MARTINS, M.L.; LIMA, M.C.; SARNO, E.N.; PEREIRA, G.M.; MATOS, H.; FONSECA, L.S.; SAMPAIO, E.P.; OTTENHOFF, T.H.; GELUK, A.; CHO, S.N.; STOKER, N.G.; COLE, S.T.; BRENNAN, P.J.; PESSOLANI, M.C. Identification of Specific Proteins and Peptides in *Mycobacterium leprae* Suitable for the Selective Diagnosis of Leprosy. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 7930-7938, 2005.

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

SOUZA, L.W.F. Reações hansênicas em pacientes em alta por cura pela poliquimioterapia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, 2010.

SRIDEVI, K.; KHANNA, N.; CHITRALEKHA, K.T.; ARIF, A.K.; TOMAR, D.; RAO, D.N. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR  $\alpha\eta$ , TCR  $\gamma\delta$ ) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trt protein. **International Immunopharmacology**, v. 4, p.1– 14, 2004.

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.

STEWART, C.A.; VIVIER, E.; COLONNA, M. Strategies of natural killer cell recognition and signaling. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 298, p. 1–21, 2006.

TAPPING, R.; TOBIAS, P. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 264–268, 2003.

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, p. 281-286, 2010a.

TEIXEIRA, M.A.G.; MAGALHÃES DA SILVEIRA, V.E.; FRANÇA, E.R. Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares, atendidos em dois centros de referência para hanseníase, na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 287-292, 2010b.

TONTI, E.; GALLI, G.; MALZONE, C.; ABRIGNANI, S.; CASORATI, G.; DELLABONA, P. NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. **Blood**, v. 113, p. 370-376, 2009.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Advances in Immunology**, v. 47, p. 187–376, 1989.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1. **Blood**, v. 84, p. 4008-4027, 1994.

UNDERHILL D.M.; OZINSKY A.; SMITH K.D.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 96, p. 14459–14463, 1999.

URA, S. Tratamento e controle das reações hansênicas. **Hansenologia Internationalis**, v. 32, p. 67-70, 2007.

VALENTINI, A., NERY, J.A.C., SALLES, A.M., VIEIRA, L.M.M., SARNO, E.N. Edema na hanseníase: aspectos clínicos e terapêuticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 131-138, 1999.

VAN KAER, L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, p. 31-42, 2005.

VIEIRA, L.M.; SAMPAIO, E.P.; NERY, J.A.; DUPPRE, N.C.; ALBUQUERQUE, E.C.; SCHEINBERG, M.A.; SARNO, E.N. Immunological status of ENL (Erythema Nodosum Leprosum) patients: Its relationship to bacterial load and levels of IL-2R. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 103- 111, 1996.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 217–251, 2002.

VIJAYAKUMARAN, P. Fixed duration therapy (FDT) in MB leprosy (clinicobacteriological experience). **Indian Journal of Leprosy**, v. 68, p. 297-300, 1996.

WADE, H.W. The histoid variety of lepromatous leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v. 31, p. 129-143, 1963.

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.

WARE, C.F. Network communications: lymphotoxins. LIGHT, and TNF. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 787–819, 2005.

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

WELSH, O.; GÓMEZ, M.; MANCIAS, C.; IBARRA-LEAL, S.; MILLIKAN, L.E. A new therapeutic approach to type II reaction. **International Journal of Dermatology**, v. 38, p. 931–933, 1999.

YAMAMURA M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, p. 277-279, 1991.

YAMAMURA M.; WANG, X.H.; OHMEN, J.D.; UYEMURA, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 1470-1475, 1992.

**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.

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