



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS  
E MARCADORES DE ATIVAÇÃO NA HANSENÍASE E  
NAS REAÇÕES HANSÊNICAS**

**Mayume Dias Shibuya**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2014**

S555 Shibuya, Mayume Dias

Avaliação de subpopulações de monócitos e marcadores de ativação na hanseníase e nas reações hansênicas. / Mayume Dias Shibuya. – Salvador, 2014.

82 f.

Orientador: Profª Drª Paulo Roberto Lima Machado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Hanseníase. 2. Monócitos. 3. I. Machado, Paulo Roberto Lima. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616-002.73



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



## **AVALIAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E MARCADORES DE ATIVAÇÃO NA HANSENÍASE E NAS REAÇÕES HANSÊNICAS**

**Mayume Dias Shibuya**

**Professor-orientador: Paulo Roberto Lima Machado**

**Dissertação apresentada ao Colegiado do  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal da Bahia,  
como pré-requisito obrigatório para a obtenção  
do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da  
área de concentração em Imunologia.**

**Salvador (Bahia), 2014**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Membros Titulares:**

- Heitor Sá Gonçalves, graduado em Medicina pela Universidade Federal do Ceará, especialista em Dermatologia pela Universidade Federal de Goiás e Sociedade Brasileira de Dermatologia, Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará, atual Diretor Geral do Centro de Dermatologia Dona Libânia da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

- Maria Olívia Amado Ramos Bacellar, graduada em Farmácia Bioquímica pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Doutora em Imunologia pela UFBA, pesquisadora do Serviço de Imunologia da UFBA e do Tropical Medicine Research Center do NIH, EUA; professora dos Programas de Pós-graduação em Imunologia e de Ciências da Saúde da UFBA, bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

- Sergio Marcos Arruda, graduado em Medicina pela Universidade Federal de Santa Maria, mestrado e doutorado em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia, professor adjunto da escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, pesquisador titular da Fundação Oswaldo Cruz.

### **Membro Suplente:**

- Paulo Roberto Lima Machado, graduado em Medicina pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), especialista em Dermatologia pela UFBA, mestrado e doutorado em Medicina pela UFBA, pós-graduação em Imunodermatologia no INSERM U209 em Lyon, pesquisador do serviço de Imunologia da UFBA, professor adjunto de Dermatologia da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública

*“O começo de todas as  
ciências é o espanto de as  
coisas serem o que são”.*

*(Aristóteles)*

*Dedico este trabalho ao  
meu esposo Tiago, ao meu  
filho Pedro, aos meus pais  
Dilene e Wilson e ao meu  
irmão Leonardo.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado inteligência, perseverança e paciência para a concretização deste projeto, com a colaboração de pessoas especiais que contribuíram direta ou indiretamente.

À minha mãe, pelo seu apoio incondicional, suas orações e seu amor. Ao meu pai e ao meu irmão Leo, pelo apoio e carinho.

Ao meu marido Tiago, pela motivação, pelo exemplo, pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis. Ao meu filho Pedro, que ainda nem nasceu, mas já é estímulo para a busca de contínuo crescimento.

Ao Dr. Paulo Machado, agradeço especialmente pela oportunidade, sua paciência e seus ensinamentos. Pelo exemplo, capacidade e humildade, que vou sempre admirar e levar como modelo, minha eterna gratidão.

Ao Dr. Edgar, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Serviço de Imunologia.

Ao Dr. Lucas e Dra. Sara, pela colaboração, pelas sugestões e ensinamentos.

Ao Dr. Sergio Arruda, pela contribuição com os exames anatomopatológicos dos pacientes com hanseníase.

À Giovana, pelo excelente trabalho desenvolvido no laboratório de imunologia, parte fundamental deste projeto.

À toda equipe do Serviço de Imunologia, que de alguma forma contribuiu para concretização deste trabalho.

Aos colegas da Pós-graduação, por tornarem os momentos críticos mais leves e agradáveis, especialmente as amigas Taís, Jamile e Lidia.

À toda equipe do ambulatório de Hanseníase, médicos residentes, funcionários, graduandos e especialmente à Dra. Vitória Rêgo.

À equipe do Hospital Dom Rodrigo de Menezes, pela colaboração.

Ao corpo docente da Pós-graduação, pelas excelentes aulas e conhecimentos transmitidos.

Aos pacientes, pela colaboração e participação da pesquisa, sem os quais, nada teria se concretizado.

Às amigas, que mesmo distantes, sempre me incentivaram para que eu chegasse até aqui.

A todos, minha sincera gratidão.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

- Universidade Federal da Bahia
  - Faculdade de Medicina
  - Serviço de Imunologia
  - Ambulatório Magalhães Neto
  - Hospital Universitário Professor Edgar Santos
  - Hospital Dom Rodrigo de Menezes

## **FONTE DE FINANCIAMENTO**

- INCT – DT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doença Tropical), processo nº. 573839/2008-5

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	14
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
<b>I. RESUMO.....</b>	<b>19</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
II.1 Objetivo Geral.....	20
II.2 Objetivos Secundários .....	20
<b>III. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
IV.1 Hanseníase.....	23
IV.1.1 Epidemiologia e Aspectos Clínicos.....	23
IV.1.2 Reações Hansênicas.....	27
IV.1.3 Aspectos Imunológicos .....	29
IV.1.4 Sub-populações de Monócitos.....	32
IV.1.5 Moléculas Co-estimulatórias.....	34
<b>V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
V.1 Pacientes.....	36
V.1.2 Ambulatório Magalhães Neto e Hospital Dom Rodrigo de Menezes....	37
V.1.3 Pacientes Paucibacilares.....	37
V.1.4 Pacientes Multibacilares.....	38
V.1.5 Pacientes com Reações Hansênicas tipo 1.....	38
V.1.6 Pacientes com Reações Hansênicas tipo 2.....	39
V.2 Marcação para Citometria de Fluxo.....	39

V.2.1 Experimento <i>ex-vivo</i> .....	39
V.3 Desenho do Estudo.....	40
V.3.1 Fluxograma Ilustrativo.....	42
V.4 Critérios de Inclusão.....	43
V.5 Critérios de Exclusão.....	43
V.6 Análise Estatística.....	43
V.7 Considerações Éticas.....	44
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
VI.1 Características Clínicas e Epidemiológicas.....	45
VI.2 Avaliação dos Monócitos e Moléculas Co-estimulatórias nos indivíduos com Reações e sem Reações Hansênicas.....	47
VI.2.1 Frequência das Subpopulações de Monócitos nos Grupos com Reações e sem Reações Hansênicas.....	47
VI.2.2 Expressão da Molécula CD86 nas Subpopulações de Monócitos nos Grupos com Reações e sem Reações Hansênicas.....	48
VI.2.3 Expressão da Molécula CD40 nas Subpopulações de Monócitos nos Grupos com Reações e sem Reações Hansênicas.....	49
VI.2.4 Frequência das Subpopulações de Monócitos entre os Grupos Reacionais 1 e 2.....	50
VI.2.5 Expressão da Molécula CD86 nas Subpopulações de Monócitos de Pacientes com Reações Hansênicas tipo 1 e 2.....	51
VI.2.6 Expressão das Moléculas Co-estimulatórias CD80 e CD40 nos Monócitos de Pacientes com Reações Hansênicas tipo 1 e 2.....	52
VI.2.7 Expressão da Molécula MHC II nas Subpopulações de Monócitos de Pacientes com Reações Hansênicas tipo 1 e 2.....	53
<b>VII DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO.....</b>	<b>61</b>
<b>IX. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>

<b>X. SUMMARY.....</b>	<b>63</b>
<b>XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>73</b>
XII.1 Ficha Clínica.....	73
XII.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
XII.3 Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa.....	79

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS.....	33
<b>Tabela 2.</b> CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE INCLUÍDOS NO ESTUDO .....	46
<b>Tabela 3.</b> CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma do estudo.....	42
<b>Figura 2.</b> Frequência das subpopulações de monócitos nos grupos com reações e sem reações hansênicas.....	48
<b>Figura 3.</b> Expressão da molécula CD86 nas subpopulações de monócitos nos grupos com reações e sem reações hansênicas	49
<b>Figura 4.</b> Expressão da molécula CD40 nas subpopulações de monócitos nos grupos com reações e sem reações hansênicas	50
<b>Figura 5.</b> Frequência das subpopulações de monócitos entre os grupos reacionais 1 e 2.....	51
<b>Figura 6.</b> Expressão da molécula CD86 nas subpopulações de monócitos de pacientes com reações hansênicas tipo 1 e 2.....	52
<b>Figura 7.</b> Expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD40 nos monócitos de pacientes com reações hansênicas tipo 1 e 2.....	53
<b>Figura 8.</b> Expressão da molécula MHC II nas subpopulações de monócitos de pacientes com reações hansênicas tipo 1 e 2..	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD80	Grupo de diferenciação 80
CD86	Grupo de diferenciação 86
CD40	Grupo de diferenciação 40
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade II
PB	Paucibacilar
MB	Multibacilar
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	Monócitos clássicos
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>++</sup>	Monócitos intermediários
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	Monócitos não-clássicos
Th1	Células T auxiliaadoras tipo 1
Th2	Células T auxiliaadoras tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
IL	Interleucina
CDs	Células dendríticas
APC	Célula apresentadora de antígeno
OMS	Organização mundial de saúde
PQT	Poliquimioterapia
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
BCG	Bacilo Calmette-guerin
TT	Tuberculóide-tuberculóide

LL	Lepromatoso
BT	Borderline-tuberculóide
BB	Borderline-borderline
BL	Borderline-lepromatoso
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
RR	Reação reversa
SR1	Surto reacional tipo 1
SR2	Surto reacional tipo 2
ENH	Eritema nodoso hansênico
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
TLR	Toll-like receptor
PGL-1	Glicolipídio-fenólico 1
LPS	Lipopolissacarídeo
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
CCR5	Coreceptor para HIV-1
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação $\beta$
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CD40L	Ligante de CD40
PE	Ficoeritrina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophil protein
MH	Mal de hansen
MFI	Média de intensidade de fluorescência
RPM	Rotações por minuto

SBF

Soro bovino fetal

## I. RESUMO

**Introdução:** A hanseníase é infecção causada pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*, possui caráter crônico e granulomatoso, e tem preferência pelos nervos periféricos e pele. A sua apresentação clínica e o desenvolvimento de episódios inflamatórios exacerbados chamados reações hansênicas, dependem predominantemente da resposta imune celular do hospedeiro. Os monócitos são derivados da medula óssea e participam ativamente do desenvolvimento da resposta imune frente ao bacilo. Os monócitos se diferenciam em células dendríticas e macrófagos, ambos células apresentadoras de antígenos, importantes não somente na imunidade inata mas na conexão com a resposta imune adaptativa ao participar da ativação de células T auxiliares. **Objetivo:** Avaliar as subpopulações de monócitos e a ativação celular pela detecção das moléculas de superfície CD80, CD86, CD40 e MHC II na expressão clínica da hanseníase e nas reações hansênicas. **Metodologia:** Foram coletados 20 ml de sangue de pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) (n=34), reação tipo 1 (n=13) e reação tipo 2 (n=13). Foi realizada a separação de células mononucleares, caracterização e ativação celular por citometria de fluxo através da marcação de CD80, CD86, CD40 e MHC II. **Resultados:** Os pacientes com reações apresentaram maior frequência de monócitos inflamatórios e marcadores CD86 e CD40. MHC II e CD80 foram mais expressados nos indivíduos com reação tipo 1. **Conclusões:** Os resultados sugerem que a maior frequência de monócitos ativados e da molécula CD86 podem exercer um importante papel na patogênese das reações hansênicas. Outras moléculas como CD40, CD80 e MHC II também podem contribuir para amplificar a resposta inflamatória nos diferentes tipos de reações.

**Palavras-chaves:** hanseníase, subpopulações monócitos, moléculas co-estimulatórias, hanseníase/imunologia.

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as subpopulações de monócitos extraídos do sangue periférico e o grau de ativação celular nos indivíduos com hanseníase e nas reações hansênicas.

### **II. 2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

1. Determinar a frequência das subpopulações de monócitos clássicos (CD14++CD16-), intermediários (CD14++CD16+) e não-clássicos (CD14+CD16++) em indivíduos com reações hansênicas e sem reações.
2. Avaliar o grau de ativação celular pela expressão das moléculas de superfície CD80, CD86, CD40 e MHC II nos grupos com reações hansênicas tipo 1 , tipo 2 e hanseníase sem reações.

### III. INTRODUÇÃO

A hanseníase é doença infecciosa granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, sendo transmitida pelas vias aéreas superiores de pessoa a pessoa, através do convívio de susceptíveis com doentes bacilíferos sem tratamento (Mendonça et al., 2008).

Suas apresentações clínicas estão correlacionadas com padrões imunológicos distintos, variando de uma vigorosa resposta imune mediada por células ao *M. leprae*, com padrão Th1 no pólo tuberculóide, a uma ausência de resposta celular específica aos antígenos do *M. leprae* no pólo lepromatoso, com predomínio da resposta Th2 e exacerbação da resposta humoral (Goulart et al., 2002). Sobre o espectro imunológico impõe-se ainda os episódios reacionais agudos que podem ocorrer antes, durante ou mesmo após o fim do tratamento poliquimioterápico (Kahawita et al., 2008). Estas reações inflamatórias afetam principalmente pele e nervos periféricos sendo os responsáveis pela morbidade e incapacidade da função nervosa (Goulart et al., 2002).

Células da linhagem monócito/macrófago derivam de células tronco mielomonocíticas na medula óssea. Estas se diferenciam em monoblastos e depois em monócitos. Quando se encontram nos tecidos são chamados macrófagos (Ziegler-Heitbrock et al., 2000).

Nos últimos anos, os monócitos foram caracterizados pelos marcadores de superfície e citometria de fluxo, e três subpopulações foram descritas: clássicos (CD14++CD16-), não-clássicos (CD14+CD16++) e intermediários (CD14++CD16+), aprovados pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de

Sociedades de Imunologia (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). A expansão dos monócitos CD16+ (intermediários e não-clássicos) tem sido descrita em muitos tipos de doenças, principalmente infecciosas ou inflamatórias (Fingerle et al., 1993; Soares et al., 2006; Castano et al., 2011). Estas subpopulações de monócitos são genericamente chamadas de “pró-inflamatórias” pela sua habilidade de alta produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Frankenberger et al., 1996; Belge et al., 2002; Wong et al., 2012).

Em um modelo de tráfico transendotelial, foi demonstrado que os monócitos pró-inflamatórios (CD16+) são capazes de se diferenciar em células dendríticas (CDs) sugerindo serem os precursores sanguíneos fisiológicos das CDs migratórias (Randolph et al., 2002; Strauss-Ayali et al., 2007).

Sabe-se que os monócitos circulantes se diferenciam em macrófagos nos tecidos, que são células apresentadoras de antígeno (APCs) juntamente com as células dendríticas. As APCs são importantes na imunidade inata, e também agem como conector ao sistema imune adaptativo, ao participar da ativação de células T auxiliares (Th) (Mayer & Nyland, 2006).

Segundo Murray e colaboradores (2007) e Hashimoto e colaboradores (2002), o *M. leprae* suprime a maturação de células dendríticas e a ativação de células T, respectivamente, quando comparado ao *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. O comportamento da resposta imune frente ao bacilo é determinante para definir a apresentação clínica e as reações hansênicas, motivo pelo qual buscamos neste estudo o envolvimento dos monócitos nos episódios inflamatórios reacionais.

## IV. REVISÃO DE LITERATURA

### IV.1 HANSENÍASE

#### IV.1.1 Epidemiologia e Aspectos Clínicos

A hanseníase permanece um importante problema de saúde pública. É infecção crônica granulomatosa que atinge a pele e nervos periféricos causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium leprae*. O acometimento dos nervos periféricos resulta em dano motor e sensitivo levando à incapacidade e deformidades características (Britton et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o acesso à informação, o diagnóstico precoce e o tratamento com a multidrogaterapia (MDT) são elementos cruciais na estratégia de eliminar a doença como um problema de saúde pública, definido ao atingir a prevalência de menos de 1 caso de hanseníase por 10.000 habitantes. As taxas de prevalência são classificadas em baixa (<1 caso/10.000 habitantes), média (1-4 casos/10.000), alta (5-9/10.000) e muito alta (10-19/10.000). A prevalência global da doença registrada em agosto de 2013 foi de 189.018 casos, enquanto o número de casos novos detectados em 2012 foi 232.857. Entretanto, existem focos de alta endemicidade em Angola, Brasil, República Africana Central, Índia, Madagascar, Nepal, República Unida da Tanzânia, República Democrática do Congo e Moçambique.

No Brasil, o coeficiente de prevalência vem diminuindo ao longo dos anos. Em 2011, foi registrada uma taxa de 1,24 por 10.000 habitantes. Apesar disso, o coeficiente de detecção geral

tende à estabilidade, com registro de 17,17 por 100.000 habitantes em 2012 (Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde 2012), indicando que a doença continua se perpetuando a despeito dos esforços para sua erradicação. A meta para o Brasil propõe atingir a eliminação da hanseníase até 2015.

A Bahia se encontra em área de alta endemicidade, com taxas registradas em 2012 de 17, 94 como coeficiente de detecção e 2543 casos novos notificados (Ministério da Saúde, 2012).

A doença é transmitida, principalmente, através do convívio com doentes ricos em bacilos ou multibacilares (MB) que não se tratam. As principais fontes de bactérias, são, provavelmente, as mucosas das vias aéreas superiores. Admite-se que o período de incubação varia de 6 meses a 21 anos. (Talhari et al., 2006).

Para melhor entendimento do quadro clínico e classificação, alguns aspectos imunológicos devem ser mencionados. Demonstrou-se que o *M. leprae* é um bacilo com alto poder infectante e baixo poder patogênico. Depois da sua entrada no organismo, não ocorrendo a sua destruição, este irá se localizar na célula de Schwann e na pele. Sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, nas quais o agente infectante não encontra resistência contra sua multiplicação. Neste caso, os linfonodos, olhos, testículos e fígado podem abrigar grande quantidade de bacilos. Sabe-se que apesar da alta produção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* nas formas multibacilares, ela é ineficaz para a eliminação dos bacilos. A defesa é efetuada pela resposta imunológica celular, capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada por citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e mediadores da oxidação, como os reativos do oxigênio (ROI), e

do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos (Araujo et al., 2003).

A resposta imune é de fundamental importância para a defesa do organismo frente à exposição ao bacilo, e sofre influência de fatores genéticos, ambientais, o estado nutricional do indivíduo, vacinação com BCG e taxa de exposição ao *M. leprae* ou outras micobactérias. A alteração da resposta imune está associada ao desenvolvimento de formas clínicas distintas, em que o predomínio da resposta celular está relacionado à forma clínica mais branda da doença (tuberculóide) e a deficiência de resposta celular, com a forma clínica mais grave (virchowiana) (Mendonça et al., 2008). Estima-se que 90% das pessoas têm imunidade natural contra o *M. leprae*, não adoecem mesmo convivendo longos períodos com doentes multibacilares sem tratamento (Talhari et al., 2006).

O Ministério da Saúde propõe a classificação operacional da hanseníase em paucibacilar (PB) se o indivíduo tem até 5 lesões de pele, e multibacilar (MB), se o doente tem mais de 5 lesões de pele. Esta classificação atende à necessidade da Organização Mundial de Saúde (OMS) de expandir a campanha pela erradicação da hanseníase (Ministério da Saúde, 2001).

A classificação de Ridley e Jopling (1966) propõe subdivisões baseadas em critérios imunológicos e histológicos. Assim, as formas clínicas são consideradas como um espectro em que os extremos são os tipos polares tuberculóide (TT) e virchowiano ou lepromatoso (LL) e os intermediários são os borderlines ou dimorfos (borderline-tuberculóide – BT, borderline-borderline – BB e borderline-virchowiano ou lepromatoso – BL) (Opromolla et al., 2000).

A forma clínica inicial da doença ou indeterminada, caracteriza-se por uma ou várias manchas, com perda da sensibilidade. Pode manifestar-se também por áreas com distúrbio da sensibilidade. A partir da forma indeterminada, o indivíduo pode curar-se espontaneamente ou desenvolver qualquer uma das formas do espectro clínico de acordo com sua resposta imune diante do bacilo.

Na hanseníase tuberculóide (TT), os indivíduos têm boa resistência, com predomínio de imunidade celular. Desenvolvem poucas lesões, distribuição assimétrica, podem ter acometimento de troncos nervosos e há poucos bacilos. A hanseníase virchowiana ou lepromatosa (LL) se caracteriza pelo surgimento de muitas manchas e placas de limites imprecisos, distribuição simétrica, acometimento de vários troncos nervosos, infiltração difusa da pele e disseminação dos bacilos. A imunidade celular é deficiente.

Nas formas borderline, os pacientes podem apresentar características dos dois pólos e podem oscilar de uma forma clínica para outra.

Com a finalidade de simplificar a classificação para a escolha do tratamento, a OMS preconiza a divisão em PB (hanseníase indeterminada, tuberculóide e a maioria dos borderline-tuberculóide, todos com baciloscopia negativa) e MB (borderline-borderline, borderline-virchowiano e virchowiano, todos com baciloscopia positiva) (Talhari et al., 2006). Os indivíduos PB recebem tratamento poliquimioterápico por 6 meses e os indivíduos MB recebem o tratamento por 12 meses.

A histopatologia da forma indeterminada não demonstra bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), mas focos de infiltrado inflamatório não granulomatoso, linfocitário, seletivamente

acompanhando e/ou penetrando ramos nervosos. Na forma tuberculóide são vistos granulomas de células epitelióides bem diferenciadas penetrados e contornados por linfócitos, acompanhando ramos nervosos cutâneos. Os granulomas também agridem a pele e podem conter gigantócitos de tipo Langerhans ou de tipo corpo estranho. Nos indivíduos com hanseníase virchowiana, os macrófagos fagocitam mas não conseguem destruir eficientemente os bacilos, assim, estabelecem-se granulomas macrofágicos, volumosos e repletos de bacilos. O citoplasma é homogêneo ou levemente vacuolar e núcleos vesiculosos. Como o *M. leprae* é rico em lipídios, sua destruição provoca acúmulo de gordura nos fagossomos dos macrófagos que se degeneram e o citoplasma se torna multivacuolar (célula de Virchow). No grupo dimorfo ou borderline, os indivíduos têm resistência parcial ao bacilo e desenvolvem manifestações clínicas e histopatológicas intermediárias entre os dois pólos (Opromolla et al., 2000).

#### **IV.1.2 Reações Hansênicas**

As reações hansênicas são a principal causa de hospitalização e incapacidade dos pacientes com hanseníase. Entende-se como sendo consequência da natureza dinâmica da resposta imune ao *M. leprae*, e podem ocorrer antes do diagnóstico, durante o tratamento ou após a MDT (Scollard et al., 1994; Stefani et al., 2009).

Os dois tipos de reações têm origem em fenômenos de instabilidade e hiperreatividade imunológica, em resposta à presença de antígenos do bacilo na pele e em nervos periféricos (Machado, 2005).

A reação reversa (RR) ou tipo 1 (SR1) caracteriza-se pelo desenvolvimento de inflamação aguda das lesões de pele e/ou nervos. A forma borderline é um forte fator de risco para desenvolvimento de SR1, mas as formas polares também podem experimentar. As lesões de pele tornam-se inflamadas, edematosas e podem ulcerar. Neurite aguda pode levar ao dano permanente da função neural se não tratado rapidamente e adequadamente (Lienhardt et al., 1994; Kahawita et al., 2008).

Reações tipo 2 (SR2) também conhecidas como eritema nodoso hansênico (ENH), ocorrem somente em virchowianos (LL) e borderline-virchowianos (BL) com alta carga bacilar e pouca ou nenhuma imunidade celular ao *M. leprae* (Stefani et al., 2009). Nódulos inflamados e pápulas, superficiais ou profundos, formas bolhosas, pustulares, necróticas ou ulceradas também podem ocorrer. Alguns nódulos podem persistir como uma paniculite crônica e dolorosa levando à fibrose e cicatriz (Kahawita et al., 2008).

ENH pode apresentar ainda sintomas sistêmicos como prostração, mal-estar, febre, edema periférico. Irite e episclerite, orquite, linfadenopatia, organomegalia, envolvimento de articulações e proteinúria transitória podem ocorrer.

Neurite na forma de nervos espessados, dolorosos e com diminuição da função pode fazer parte do ENH (Kahawita et al., 2009).

Durante a reação reversa encontra-se na derme um denso infiltrado celular, composto principalmente por monócitos e células CD4+, com edema associado ao granuloma. A análise das lesões mostra maior expressão de RNA mensageiro para IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , com diminuição de IL-4, IL-5 e IL-10.

Adicionalmente, clones de células T isoladas destas lesões são predominantemente do tipo Th1. Esta resposta Th1 exacerbada se reflete no aumento de níveis séricos de TNF- $\alpha$ , receptor solúvel de IL-2 e moléculas de adesão. Tem se documentado uma maior expressão de TNF- $\alpha$  em nervos periféricos do que na pele, sendo esta citocina implicada na patogenia da desmielinização inflamatória em modelos experimentais (Machado, 2005).

O ENH compreende reação inflamatória sistêmica relacionada à deposição de imunocomplexos, semelhante à imunorreação de Gell & Coombs, indicando mecanismos humorais envolvidos. A imunopatogênese do ENH é bastante complexa, tendo sido demonstrados, no soro dos pacientes, altos níveis circulantes de IL-1 e TNF- $\alpha$ , paralelamente ao aumento tecidual na expressão de RNA mensageiro para IL-6, IL-8 e IL-10, indicando resposta Th2 (Mendonça et al., 2008). Adicionalmente, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se encontram elevados no soro destes pacientes, e também nas lesões. Embora a reação tipo 2 (SR2) seja descrita como situação onde há intensa produção de citocinas Th2, paradoxalmente tem se documentado existência também de uma maior produção de IFN- $\gamma$  *in situ* e no sangue de pacientes em ENH. O IFN- $\gamma$  pode amplificar a produção de TNF- $\alpha$  e também contribuir para alguns efeitos deletérios nestes pacientes (Machado, 2005).

### **IV.1.3 Aspectos Imunológicos**

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares das micobactérias, denominados receptores

de reconhecimento de padrões (PRR). Exemplo são os receptores *Toll-like* (TLRs), essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta imune inata (Brightbill et al., 1999; Mendonça et al., 2008).

Os receptores TLR-2 são ativados por lipoproteínas do *M. leprae*, e a capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a produção de IL-12/23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. Estas apresentam o antígeno e causam ativação de células T pela produção de IL-12 (Demangell et al., 2000). Este processo pode levar à expansão e diferenciação de células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , que induz os elementos das resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo.

Em modelos murinos de infecção intracelular, resposta imune resistente versus suscetível, parece ser regulada por duas subpopulações de células T: Th1 e Th2. Células T que produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), chamadas Th1, aumentam a imunidade mediada por células . IFN- $\gamma$  ativa macrófago e IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou cura. Células T que produzem IL-4, IL-5 e IL-10, chamadas Th2, aumentam a resposta humoral. IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago resultando em infecção progressiva (Sieling et al., 1994; Goulart et al., 2002).

Na forma TT da doença, IFN- $\gamma$ , IL-2 e linfotóxina- $\alpha$  são secretadas nas lesões, resultando em atividade fagocítica intensa. Macrófagos sob a influência dessas citocinas, juntamente com os linfócitos, formam o granuloma. Os linfócitos CD4+ são encontrados

principalmente dentro do granuloma , e os CD8+ são encontrados na áreas externa que o envolvem (Modlin et al., 1988).

A forma LL é caracterizada por pobre formação de granuloma. A produção é predominantemente das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10. Tem-se descrito que a IL-4 diminui a expressão dos TLR2 nos monócitos e que a IL-10 suprime a produção de IL-12, o que está associado com a predominância de linfócitos CD8+ nas lesões virchowianas (Modlin et al., 1988; Mendonça et al., 2008).

Diversos estudos vem demonstrando o perfil de citocinas no sangue periférico com predomínio de citocinas Th1 nos pacientes do pólo TT e Th2 no pólo LL. Segundo Goulart e colaboradores, níveis de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , detectados por ELISA, estão mais altos no soro e sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes TT do que LL. Também nos sobrenadantes de culturas de CMSP de pacientes TT, a IL-2 está em níveis bastante superiores aos níveis encontrados na forma LL, onde IL-4 predomina no soro e sobrenadantes de culturas de CMSP (Goulart et al., 2002). Entretanto, Machado e colaboradores confirmaram observações prévias que a produção de IFN- $\gamma$  é maior em pacientes TT que pacientes LL, e correlacionaram níveis de IFN- $\gamma$  com a forma clinica da doença. Neste estudo foram testados diversos antígenos micobacterianos e todos estimularam alta produção de IFN- $\gamma$  nos pacientes TT e baixa produção nos pacientes LL. Houve exceção apenas do estímulo com BCG, em que houve reversão com altos níveis de produção de IFN- $\gamma$  em alguns pacientes LL (Machado et al., 1998).

As formas borderline do espectro da hanseníase são imunologicamente dinâmicas, ocorrendo oscilação entre as duas formas polares. Nos pacientes BT, BB e BL, a progressiva redução

da resposta mediada por célula da forma BT para a forma BL é acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos. A imunidade humoral está presente nas formas LL e BL, e exibe altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolípido-fenólico 1 (PGL-1), antígeno específico do *M. leprae*, sem contudo conferir proteção significativa (Goulart et al., 2002; Mendonça et al., 2008).

#### **IV.1.4 Sub-populações de Monócitos**

Monócitos são peças-chave do sistema imune e conectam as respostas imunes inata e adaptativa. São células críticas em muitas doenças inflamatórias. Eles têm origem de um precursor mielóide comum da medula óssea e se diferenciam nos tecidos em macrófagos e células dendríticas (CDs) (Ziegler-Heitbrock et al., 2000).

Baseada na expressão dos receptores lipopolissacarídeos (LPS) CD14 e CD16, foram definidas duas subpopulações de monócitos : CD14++CD16- e monócitos CD16-positivo (Passlick et al., 1989). Entretanto, Ancuta e colaboradores, publicaram que a subpopulação de monócitos CD16-positivo poderia ser subdividida em distintas subpopulações: CD14++CD16+ e CD14+CD16++ (Ancuta et al., 2003).

Recentemente, Zeigler-Heitbrock e colaboradores propuseram uma nova classificação dividindo as subpopulações de monócitos em clássicos (CD14++CD16-), intermediários (CD14++CD16+) e não-clássicos (CD14+CD16++) (Zeigler-Heitbrock et al., 2010). Wong e colaboradores (2012) demonstraram algumas

características fenotípicas e funcionais das subpopulações de monócitos. (Tabela 1).

**Tabela 1: CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS**

	<b>CLÁSSICOS</b>	<b>INTERMEDIÁRIOS</b>	<b>NÃO-CLÁSSICOS</b>
<b>FREQUÊNCIA</b>	85%	5%	10%
<b>RESPOSTA AO ESTÍMULO COM LPS</b>	IL-10, G-CSF, CCL2, RANTES, IL-6, IL-8	IL-6, IL-8	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8
<b>FUNÇÕES</b>	alta capacidade fagocítica	proliferação e ativação cels T, alta produção ROS, angiogênese	proliferação e ativação cels T, "patrulhamento" do endotélio

Fonte: adaptado de Wong et al., 2012.

Como os monócitos intermediários eram considerados parte da subpopulação de monócitos não-clássicos, foram negligenciados em diversos estudos anteriores. Porém, os monócitos intermediários mostraram relevância clínica como em pacientes com alto risco cardiovascular, onde a contagem elevada de monócitos intermediários prediz um desfecho desfavorável nestes indivíduos (Rogacev et al., 2011). Na infecção pelo HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana 1), os monócitos intermediários expressam CCR5, o corerceptor para o vírus HIV-1 (Zawada et al., 2011).

Soares e colaboradores sugeriram um papel deletério da subpopulação de monócitos CD16+ na leishmaniose cutânea, demonstrando forte correlação de sua expressão com o tamanho da lesão e os níveis de TGF- $\beta$  no plasma, quanto seu possível uso como marcador na severidade da doença e/ou desfecho desfavorável (Soares et al., 2006).

Há poucos estudos sobre o papel dos monócitos na hanseníase. Alguns, como o de Murray e colaboradores, demonstrou que o *M. leprae* não induziu ativação nem maturação de células dendríticas mensuradas pela expressão de marcadores de superfície e produção de citocinas inflamatórias como o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guerin (BCG), e provavelmente suprimiu a maturação destas células dendríticas (Murray et al., 2007). Segundo Hashimoto e colaboradores, as células dendríticas infectadas pelo *M. leprae* são menos eficazes na estimulação e ativação de linfócitos T quando comparadas com as células dendríticas infectadas pelo *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. O *M. leprae* é o único patógeno que permanece resistente à imunidade de células T mediada por células dendríticas, pelo menos nos primeiros estágios da infecção (Hashimoto et al., 2002). Sinsimer e colaboradores observaram que ao estimular cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos saudáveis, o antígeno do *M. leprae* é capaz de ativar pobremente os macrófagos e células dendríticas (Sinsimer et al., 2010).

#### **IV.1.5 Moléculas Co-estimulatórias**

Os indivíduos com hanseníase TT apresentam resposta imune celular eficiente, enquanto que, os indivíduos LL têm resposta celular deficiente, que é multifatorial, e também apresentam anergia da célula T diante do antígeno de *M. leprae*. A ativação, proliferação e produção de citocinas de células T antígeno-específicas dependem de dois sinais distintos das células

apresentadoras de antígeno (APC). O primeiro é proveniente da interação entre antígeno/MHC com o receptor da célula T (TCR). O segundo, depende das moléculas co-estimulatórias. Entre estas, CD80 e CD86, e seus receptores nas células T, CD28 e CD152 (CTLA-4), são os mais estudados e os mais importantes (Sridevi et al., 2004). Um estudo recente indicou que CD80 e CD86 parecem diferir em suas habilidades de diferenciar e manter células Th1 e Th2 (Zea et al., 1998; Sridevi et al., 2004). Há evidências na literatura que sugerem a importância das moléculas co-estimulatórias na regulação da resposta imune normal e em algumas doenças, embora não esteja claro como o sinal co-estimulatório influencie a resposta imune celular em indivíduos com hanseníase.

Santos e colaboradores demonstraram forte expressão de CD80 em CMSP isoladas de pacientes com hanseníase LL durante reação hansênica tipo 2 (ENH), em contraste com a baixa expressão desta molécula em pacientes LL antes do ENH. Também verificou forte expressão de CD80 em CMSP isoladas de pacientes com reação hansênica tipo 1 (SR1) (Santos et al., 2006).

Os dados de Palermo e colaboradores, corroboram os dados da literatura de que, para que haja ativação das células T pelos antígenos, com proliferação e liberação de citocinas, são necessários dois sinais. O primeiro é produzido pela interação entre o receptor da célula T e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da célula apresentadora de antígeno (APC). E o segundo, é mediado pela interação entre as moléculas co-estimulatórias presentes na superfície das APCs com seus ligantes nas células T (Palermo et al., 2012).

A molécula CD40 expressa nas células B, tem seu papel definido na imunidade humoral. A interação entre CD40 e seu ligante CD40L, presente nas células T ativadas, é essencial para a proliferação das células B, expressão de marcadores de ativação, produção de imunoglobulina e troca de isotipos. Também é necessária para formação de células B de memória e centros germinativos. Expressão deficiente de CD40L em humanos leva à incapacidade de produzir outros isotipos que não sejam IgM (Síndrome hiper IgM), e a uma ausência de centros germinativos. Adicionalmente, a interação CD40-CD40L é crucial no desenvolvimento de doenças autoimunes em modelos animais, tem impacto na regulação do crescimento de alguns carcinomas e está envolvida na seleção tímica (Laman et al., 1996).

## **V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

### **V.1 PACIENTES**

Estudo de corte transversal em que foram selecionados 34 pacientes de hanseníase sem reações hansênicas, sendo 22 da forma paucibacilar e 12 da forma multibacilar. Para comparação, foram selecionados 26 pacientes com reações hansênicas, sendo 13 com reação tipo 1 ou reação reversa e 13 com reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico. O grupo de pacientes com reações não estava usando corticosteróides nem imunossupressores.

Os indivíduos foram captados no ambulatório Magalhães Neto do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos e no Hospital Dom

Rodrigo de Menezes, em uma amostra selecionada por conveniência.

Entraram no estudo todos os indivíduos que estavam de acordo com os critérios de inclusão. O diagnóstico de hanseníase e das reações hansênicas foi feito através do exame clínico, biópsia da pele e baciloscopia da linfa.

### **V.1.2 Ambulatório Magalhães Neto e Hospital Dom Rodrigo de Menezes**

Os pacientes foram selecionados do ambulatório de dermatologia Magalhães Neto do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos, local de referência na Bahia para o tratamento de hanseníase e suas complicações. Está em funcionamento desde 1992 e atende cerca de 60 pacientes por mês com hanseníase. Foi necessário selecionar alguns pacientes do Hospital Dom Rodrigo de Menezes para completar a amostra, este também é local de referência para o tratamento da hanseníase.

### **V.1.3 Pacientes Paucibacilares**

São aqueles diagnosticados com hanseníase da forma clínica indeterminada, tuberculóide (TT) ou borderline tuberculóide (BT), todas com baciloscopia negativa. Geralmente apresentam poucas manchas hipocrômicas ou eritematosas, algumas podem esboçar uma borda elevada nas forma TT e BT. Distribuição assimétrica e com alteração da sensibilidade.

#### **V.1.4 Pacientes Multibacilares**

São os pacientes com hanseníase da forma clínica borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB), borderline virchowiana ou lepromatosa (BL) e virchowiana ou lepromatosa (LL), todas com baciloscopia positiva. Clinicamente manifestam manchas, placas, nódulos ou infiltração na pele, com acometimento extenso da pele e tendência ao surgimento simétrico das lesões pelo corpo.

#### **V.1.5 Pacientes com Reação Hansênica tipo 1**

Apresentam reação tipo 1 pacientes com as formas tuberculóide e borderline, onde ocorre um aumento abrupto da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae*. Normalmente, a reação manifesta-se por exacerbação das manchas com edema das mesmas, eritema e descamação, podem aumentar em número e em tamanho, e associar-se com febre, astenia e neurite.

Dividimos as reações hansênicas em duas categorias: grave e leve/moderada. A reação tipo 1 foi considerada grave quando o paciente apresentava placas e manchas disseminadas pelo corpo todo, associadas ou não a sintomas sistêmicos como mal-estar, febre, artralgias. A reação tipo 1 foi considerada leve/moderada quando o paciente apresentava placas ou manchas em áreas localizadas, sem associação de sintomas sistêmicos.

### **V.1.6 Pacientes com Reação Hansênica tipo 2**

Este tipo de reação ocorre em pacientes multibacilares, LL e BL, e caracteriza reação inflamatória sistêmica de imunopatologia mais complexa. Clinicamente surgem nódulos subcutâneos dolorosos que podem ulcerar, manchas e placas infiltradas disseminadas pelo corpo. Podem estar associados neurite e acometimento de outros órgãos ou sistemas como orquite, nefrite, iridociclite entre outros. O paciente frequentemente se queixa de febre, dor no corpo, astenia, artralguas.

A reação tipo 2 foi considerada grave pela presença de nódulos disseminados ou não, associados a sintomas sistêmicos como prostração, febre, artralguas e/ou edema das articulações, vômitos. A reação tipo 2 leve/moderada consistia em nódulos localizados associados à prostração ou não, com febre ou não.

## **V.2 MARCAÇÃO PARA CITOMETRIA DE FLUXO**

### **V.2.1 Experimento *Ex-vivo***

Foram coletados 20 ml de sangue periférico heparinizado e iniciado o protocolo de separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). As CMSP foram isoladas através de gradiente de concentração com Fycoll-Hypaque. Após o processo de 3 lavagens com NaCl 0,9%, as CMSP foram ressuspensas em meio de cultura com RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF inativado, hepes e gentamicina 100 IU/ml. CMSP foram marcadas *ex-vivo* com os seguintes anticorpos para determinar as sub-

populações de monócitos: anti-CD14 - APC / anti-CD16 - PE e os anticorpos anti-MHC II – FITC/ anti-CD80 – FITC/ anti-CD40 – PE/ anti-CD86 – PerCP-Cy5.5 para avaliar o grau de ativação celular. Após o protocolo de marcação *ex-vivo* as células foram adquiridas no citômetro CANTO II BD.

Para o controle do experimento foram utilizados isotipos controles IgG1 em todas as fluorescências e o seguinte protocolo: após a separação de CMSP foram adicionados aos tubos para FACS  $1 \times 10^6$  células. Essas foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM, 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi solto. Em seguida adicionou-se 2µl de cada anticorpo e completou o conteúdo para 20µl com solução salina não estéril. Foi mantido por 4°C durante 15 minutos ao abrigo da luz. Adicionou-se 200µl de solução salina não estéril e foram centrifugados por 5 minutos, 1500 RPM a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet solto. Para finalizar a parte experimental, foi adicionado 250µl de paraformaldeído a 4% para fixar o material e em outro momento ser adquirido no citômetro de fluxo.

### **V.3 DESENHO DO ESTUDO**

Trata-se de estudo de corte transversal em que os indivíduos selecionados foram separados em 3 grupos: hanseníase sem reação (n=34), hanseníase com reação tipo 1 (n=13) e hanseníase com reação tipo 2 (n=13) para comparação. Após termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ter sido assinado pelo paciente, foi aplicado questionário para coleta de dados. Ao final, 20

ml de sangue foi coletado em tubo heparinizado e levado para iniciar o protocolo de separação de CMSP.

### V.3.1 Fluxograma Ilustrativo

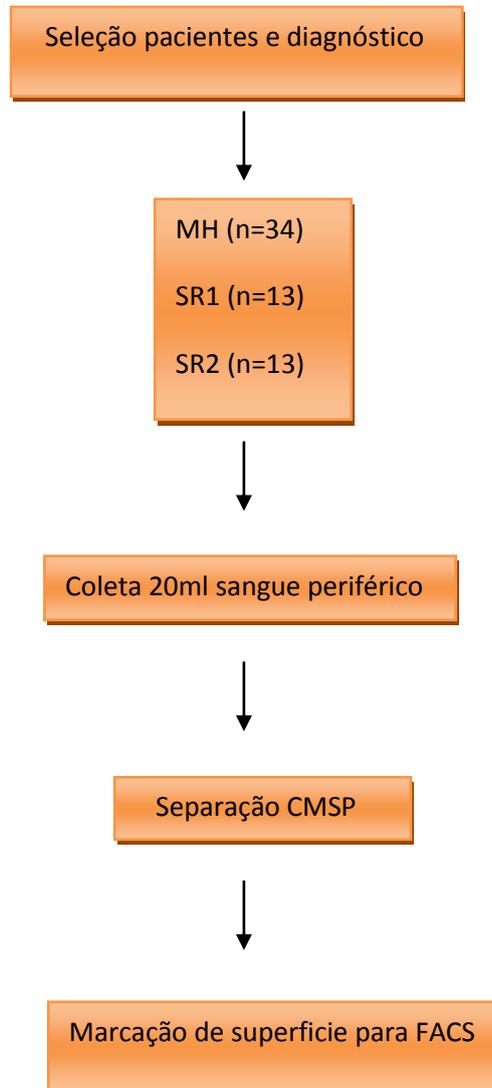


Figura 1: Fluxograma do estudo

#### **V.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- diagnóstico confirmado de hanseníase através de exame clínico, exame histopatológico por biópsia de pele e baciloscopia da linfa;
- classificação de acordo com Ridley & Jopling (1966) nas formas clínicas I, TT, BT, BB, BL, LL;
- concordância em participar e assinatura do TCLE

#### **V.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- uso de corticosteróide, talidomida ou imunossupressores
- gestantes
- menores de 18 anos e maiores de 65 anos

#### **V.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi utilizado para comparação entre duas variáveis contínuas independentes, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para análise de três variáveis contínuas independentes, foi utilizado a teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

O programa escolhido foi o Graphpad prism 5.0 (Graphpad software, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **V.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo foi elaborado segundo as diretrizes éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos (Resolução 196/96 CNS, 1996), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP) do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) cadastro 50/10, parecer datado de 07/10/2010. Para a coleta no Hospital Dom Rodrigo de Menezes, foi aprovado um adendo do projeto pelo CEP/CONEP sob parecer nº. 50/2010.

## **VI. RESULTADOS**

### **VI.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS**

Os indivíduos do presente estudo foram assim distribuídos: 34 com hanseníase sem surto reacional (SR), onde 18 são do sexo feminino e 16 do sexo masculino. A idade média é de 42 anos. O tratamento poliquimioterápico recebido por 22 deles foi PQT paucibacilar e 12 receberam PQT multibacilar. O índice bacilar (IB) médio dos indivíduos PB foi zero e o IB médio dos indivíduos MB foi 2,5. Quanto à forma clínica, 11 foram classificados como forma indeterminada (I), 8 como tuberculóide (TT), 3 como borderline tuberculóide (BT), 3 como borderline borderline (BB), 3 como borderline virchowiano (BL) e 7 como virchowiano ou lepromatoso (LL).

O grupo com surto reacional tipo 1 (SR1) foi composto por 13 indivíduos, dos quais 6 são do sexo feminino e 7 do sexo masculino. A idade média é de 44 anos, o tratamento PQT-PB foi indicado para 3 indivíduos e o tratamento PQT-MB foi indicado para 10 indivíduos. O IB médio foi de 1. Quanto à forma clínica, 6 foram classificados como BT, 5 como BB e 2 como BL.

O grupo com surto reacional tipo 2 (SR2) foi composto por 13 indivíduos, dos quais 4 são do sexo feminino e 9 são sexo masculino. A idade média é de 38 anos e o tratamento dispensado aos 13 pacientes foi PQT-MB. O IB médio foi de 3. Quanto à forma clínica, 6 deles foram classificados como BL e 7 como LL (Tabela 2).

**Tabela 2: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE INCLUÍDOS NO ESTUDO**

GRUPO	n	SEXO n(%)	IDADE m(min-max)	PQT(n)	Índice Bacilar m±DP	Forma Clínica					
						I	TT	BT	BB	BL	LL
sem SR	34	18(F-53) 16(M-47)	42(18-65)	PB(22) MB(12)	PB:0 MB:2,5(1,9)	11	8	3	3	3	7
SR1	13	6(F-46) 7(M-54)	44(26-65)	PB(3) MB(10)	1(0,97)	0	0	6	5	2	0
SR2	13	4(F-31) 9(M-69)	38(18-49)	MB(13)	3(1,2)	0	0	0	0	6	7

Não SR- sem surto reacional n-Tamanho da amostra m-Média PQT- Poliquimioterapia I-Indeterminada TT-Tuberculóide BT-Borderline tuberculóide BB- Borderline borderline BL-Borderline lepromatoso LL-Lepromatoso PB-Paucibacilar MB-Multibacilar F-Feminino M-Masculino DP-Desvio padrão

Quanto à gravidade das reações hansênicas, no grupo com surto reacional do tipo 1, 7 pacientes apresentaram reação reversa leve a moderada, caracterizada por poucas manchas ou placas sem sintomas como febre ou indisposição. Os outros 5 pacientes apresentaram reação reversa mais grave, caracterizada por inúmeras manchas ou placas distribuídas pelo corpo, e apenas 1 apresentou febre e indisposição. Houve 1 paciente que manifestou o surto tipo 1 sob a forma de neurite apenas.

No grupo com surto reacional do tipo 2, todos apresentaram eritema nodoso leproso, dos quais 9 variavam de leve a moderado, com poucos nódulos pelo corpo, indisposição, mal-estar. A febre surgiu em apenas 2. Quatro apresentaram ENL grave, caracterizado por inúmeros nódulos eritematosos e dolorosos espalhados pelo corpo, febre, mal-estar, artralguas e/ou edema das

articulações e prostração. Apenas 1 paciente com ENL leve não apresentou nenhum sintoma sistêmico (Tabela 3).

**Tabela 3: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS**

	n	SEXO (%)	IDADE m	GRAVIDADE DA REAÇÃO	FEBRE	PROSTRAÇÃO	ARTRITE/ ARTRALGIA	NEURITE
<b>REAÇÃO 1 (RR)</b>	13	6(F-46) 7(M-54)	44	grave: 5 leve/moderada: 7	-	-	1	1(isolada)
<b>REAÇÃO 2 (ENH)</b>	13	4(F-31) 9(M-69)	38	grave: 4 leve/moderada: 9	4 2	4 7	3 -	1 2

n – Tamanho da amostra RR - Reação reversa ENH – Eritema nodoso hansênico  
 m– Média F – Feminino M – Masculino  
 RR grave: lesões corpo todo com ou sem sintomas sistêmicos  
 RR leve/moderada: lesões localizadas sem sintomas sistêmicos  
 ENH grave: lesões disseminadas ou não, associadas a sintomas sistêmicos  
 ENH leve/moderado: lesões localizadas com ou sem sintomas sistêmicos

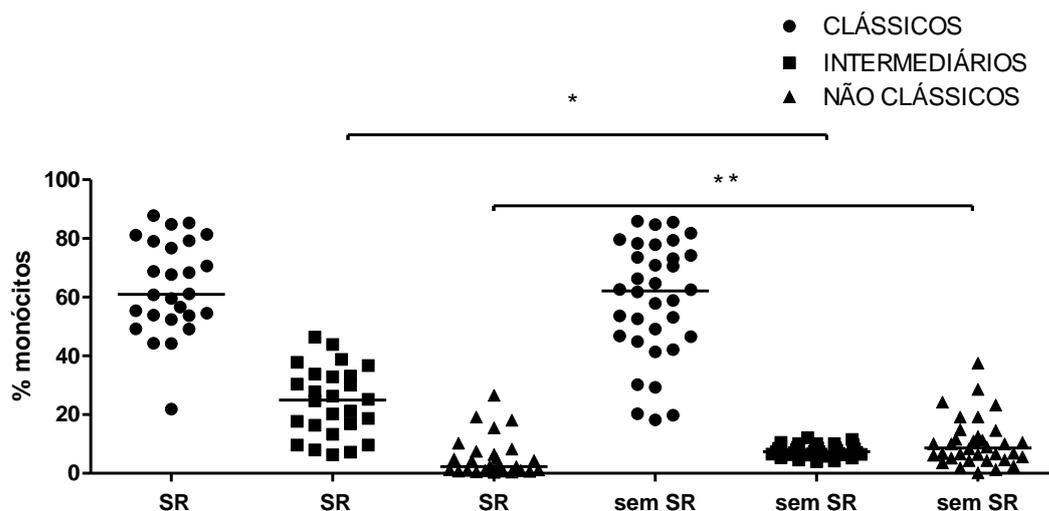
## VI.2 AVALIAÇÃO DOS MONÓCITOS E MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS NOS INDIVÍDUOS COM REAÇÕES E SEM REAÇÕES HANSÊNICAS

### VI.2.1 FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NOS GRUPOS COM REAÇÕES E SEM REAÇÕES

A figura 2 mostra a frequência das subpopulações de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos distribuídos em 2 grupos, hanseníase sem reação e hanseníase com reações. Houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos monócitos intermediários, que foi maior no grupo com reações

hansênicas. Quanto aos monócitos não-clássicos, foi significativa sua expressão menor no grupo com reações.

**Figura 2: FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NOS GRUPOS COM REAÇÕES E SEM REAÇÕES HANSÊNICAS**



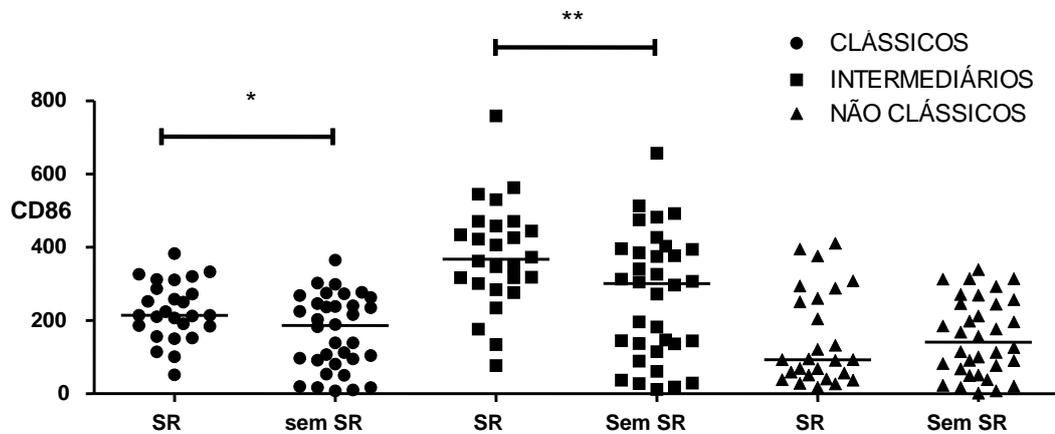
Pacientes com reações hansênicas (n=26) e pacientes sem reações (n=34). Análise estatística pelo Teste de Mann-Whitney. \*p<0,0001 e \*\*p=0,05

## VI.2.2 EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD86 NAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NOS GRUPOS COM REAÇÕES E SEM REAÇÕES

A figura 3 mostra a expressão da molécula co-estimulatória CD86 nas subpopulações de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos.

A comparação entre os grupos de pacientes com ou sem reações hansênicas mostra uma expressão maior nas subpopulações de monócitos clássicos e intermediários.

**Figura 3: EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD86 NAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NOS GRUPOS COM REAÇÕES E SEM REAÇÕES**

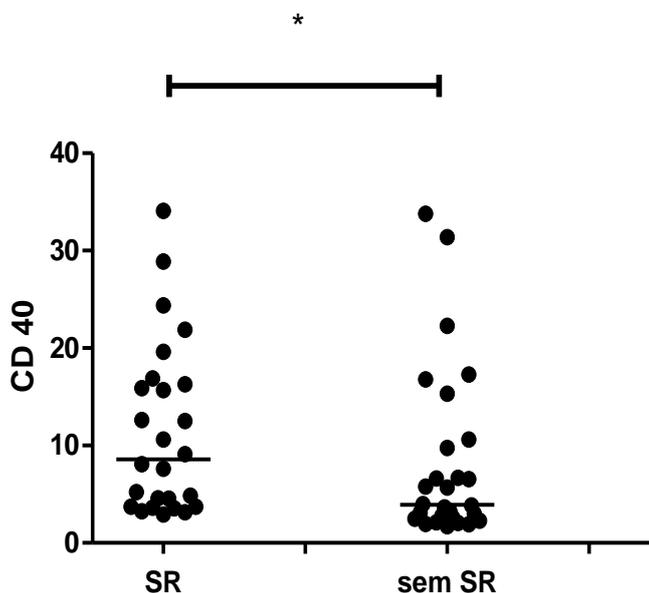


Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD86. Pacientes com reação hansênica (n=26) e pacientes sem reação (n=34). Análise estatística pelo Teste de Mann-Whitney. \*p=0,0374 e \*\*p=0,0181

### VI.2.3 EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CO-ESTIMULATÓRIA CD40 NAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NOS GRUPOS COM REAÇÃO E SEM REAÇÃO HANSÊNICA

A figura 4 mostra uma maior expressão da molécula CD40 nos monócitos do grupo com reações ao compará-lo com o grupo sem reações hansênicas.

**Figura 4: EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD40 NOS MONÓCITOS DOS GRUPOS COM REAÇÕES E SEM REAÇÕES**

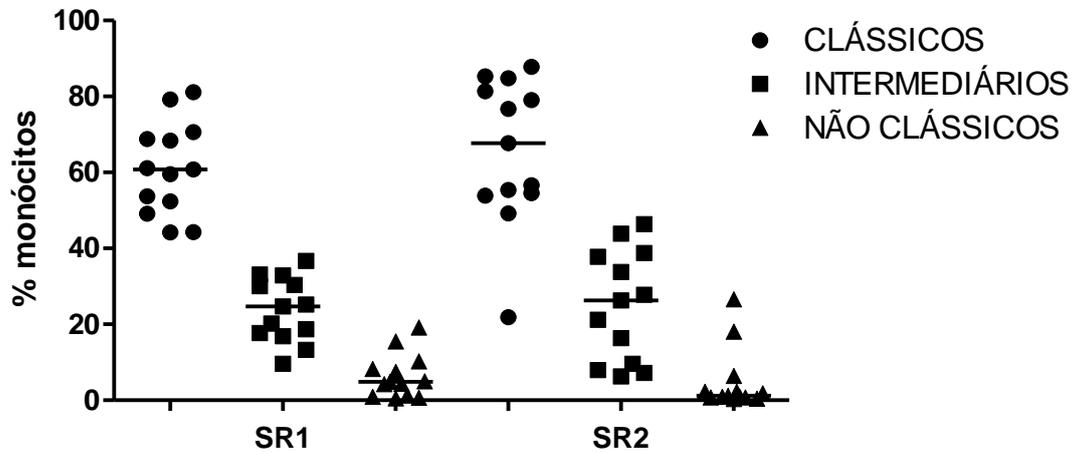


Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD40. Pacientes com reação (n=26) e pacientes sem reação hansênica (n=34). Análise estatística pelo Teste de Mann-Whitney. \*p=0,03

#### VI.2.4 FREQUÊNCIA DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS ENTRE OS GRUPOS REACIONAIS 1 E 2

A figura 5 mostra a frequência de subpopulações de monócitos entre indivíduos com reações hansênicas tipos 1 e 2. Entre os indivíduos com reações hansênicas, tanto tipo 1 como tipo 2, há predomínio da subpopulação de monócitos clássicos sobre as demais. Não há diferença estatisticamente significante entre os grupos.

**Figura 5: FREQUÊNCIA DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS ENTRE OS GRUPOS COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPOS 1 E 2**

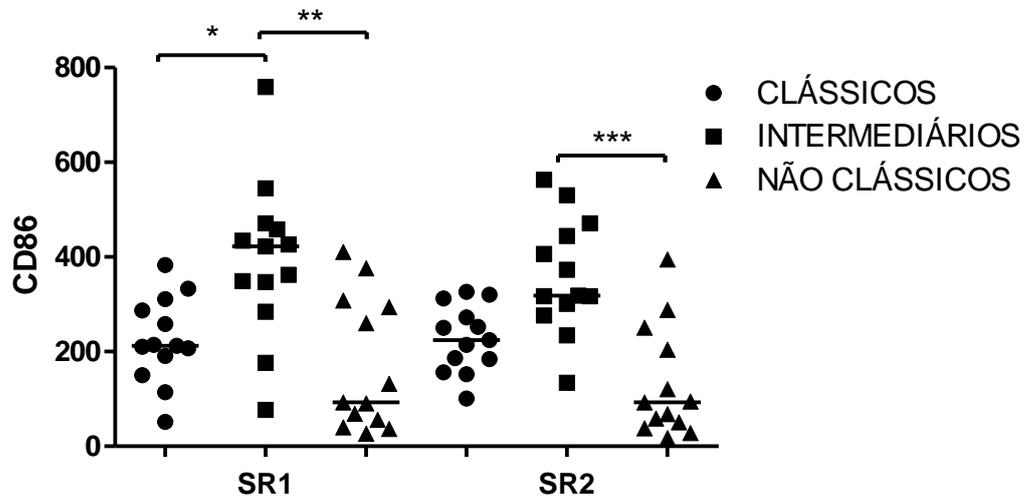


Pacientes com reação tipo 1 (n=13) e pacientes com reação tipo 2 (n=13). Análise estatística pelo Teste de Mann-Whitney.

## VI.2.5 EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CO-ESTIMULATÓRIA CD86 NAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPOS 1 E 2

A Figura 6 mostra a expressão da molécula co-estimulatória CD86 nas subpopulações de monócitos nos grupos com reações hansênicas tipos 1 e 2. Sua expressão é predominante e estatisticamente significativa nas subpopulações de monócitos intermediários tanto no surto reacional 1 quanto no surto reacional 2.

**Figura 6: EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD86 NAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPOS 1 E 2**

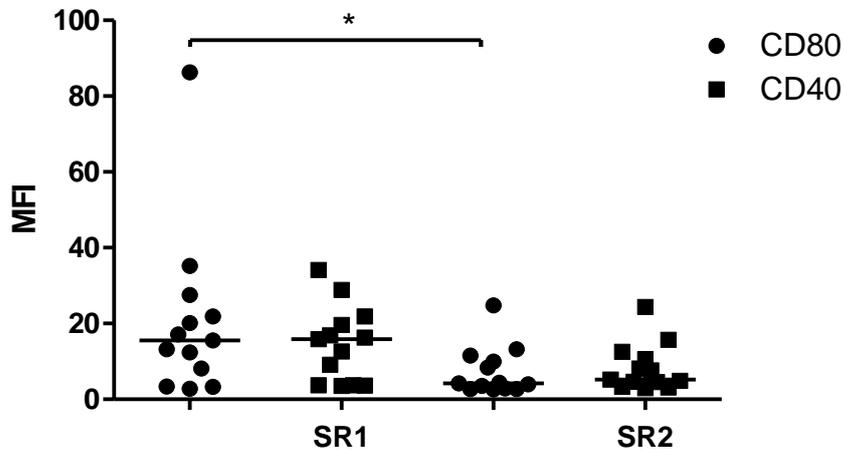


Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD86. Pacientes do grupo reacional tipo 1 (n=13) e pacientes do grupo reacional tipo 2 (n=13). Análise estatística pelo Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn utilizados para analisar a diferença entre os grupos. \*p=0,0048 \*\*p=0,0015 \*\*\*p=0,0002

## VI.2.6 EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS CD80 E CD40 NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPOS 1 E 2

A figura 7 mostra expressão significativa da molécula CD 80 no grupo reacional tipo 1 quando comparado ao grupo reacional tipo 2. Não houve diferença para a molécula CD40 entre os grupos reacionais.

**Figura 7: EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS CD80 E CD40 NOS MONÓCITOS DE PACIENTES COM REAÇÃO HANSÊNICA 1 E 2**

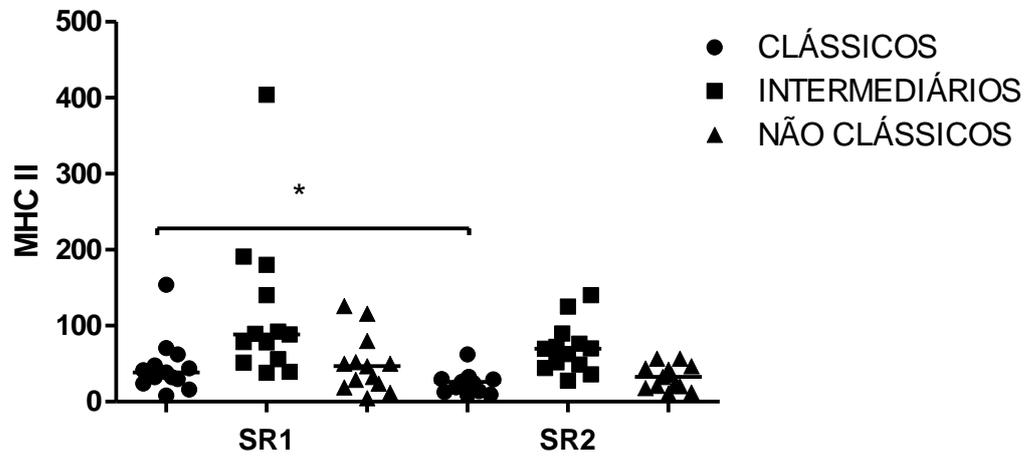


Média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas CD80 e CD40. Pacientes do grupo reacional tipo 1 (n=13) e pacientes do grupo reacional tipo 2 (n=13). Análise estatística pelo Teste de Mann-Whitney. \*p=0,0257

## VI.2.7 EXPRESSÃO DA MOLÉCULA MHC II NAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPOS 1 E 2

A figura 8 mostra a expressão da molécula MHC II nos grupos reacionais hansênicos tipos 1 e 2. A expressão foi maior e estatisticamente significativa nos monócitos clássicos do grupo reacional tipo 1 comparado ao grupo reacional tipo 2. Nas demais subpopulações não houve diferença.

**Figura 8: EXPRESSÃO DA MOLÉCULA MHC II NAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPOS 1 E 2**



Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula MHC II. Pacientes do grupo reacional tipo 1 (n=13) e pacientes do grupo reacional tipo 2 (n=13). Análise estatística pelo teste de Mann-Whitney. \*p=0,0257

## VII. DISCUSSÃO

Os resultados epidemiológicos do presente estudo constatarem proporção mais elevada do sexo feminino (53%) na distribuição de casos de pacientes com hanseníase sem reações hansênicas. Apesar de haver dados na literatura em que o predomínio do sexo masculino é mais freqüente, também há trabalhos que mostram que pode haver distribuição semelhante nos dois sexos ou preponderância feminina (Lana et al., 2000; Grossi, 2005). Quanto à idade média (42 anos) de aparecimento da doença, está de acordo com a literatura. Como as doenças de longo período de incubação, a maioria dos casos situa-se entre 20 e 50 anos, o que permite afirmar que a hanseníase é uma doença do adulto jovem e do adulto (Lana et al., 2000). Quanto à forma clínica, na nossa amostra de pacientes com hanseníase sem reações há predomínio da forma paucibacilar (n=22) sobre a multibacilar (n=12), o que contraria alguns estudos da literatura, onde a maioria dos indivíduos é diagnosticada tardiamente, geralmente em alguma forma clínica multibacilar, especialmente em áreas desfavorecidas economicamente (Ribeiro Junior et al., 2012).

No grupo de reações hansênicas, tanto tipo 1 como tipo 2, o predomínio é nos indivíduos do sexo masculino, especialmente para o eritema nodoso leproso (9 homens).

Monócitos são células que participam tanto da resposta imune inata como da adaptativa servindo de link entre as duas, possuindo capacidade de diferenciar-se em macrófagos e células dendríticas. As CDs, que são células profissionais apresentadoras de antígenos, são muito eficientes na ativação de células T. Elas conferem ao

sistema imune inato a habilidade de ativar a resposta imune mediada por células contra os patógenos (Modlin et al., 2010).

Há estudos que já descreveram a frequência de subpopulações de monócitos em indivíduos saudáveis como Strauss-Ayali e colaboradores, onde a subpopulação de monócitos pró-inflamatórios (CD14+CD16+) consiste de 5-10% do total de monócitos no sangue periférico (Strauss-Ayali et al., 2007). Recentemente, os monócitos receberam uma nova nomenclatura e divisão em três subpopulações de acordo com expressão de CD14 e CD16 em clássicos (CD14++CD16-), intermediários (CD14++CD16+) e não-clássicos (CD14+CD16++) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Franciscon (2013) demonstrou que as subpopulações de monócitos clássicos são os mais frequentes tanto em indivíduos saudáveis como em portadores de hanseníase pauci e multibacilar. No presente estudo, verificamos a frequência das subpopulações de monócitos para o grupo de pacientes com reações hansênicas e comparamos com o grupo de indivíduos sem reações. Os monócitos clássicos predominam nos dois grupos, mas o que foi estatisticamente significativo foi o aumento dos monócitos intermediários no grupo com reações, reforçando nossa hipótese de que monócitos pró-inflamatórios têm papel relevante na patogênese dos episódios reacionais. Entretanto, os monócitos não-clássicos mostraram diminuição no grupo reacional quando comparados ao grupo sem reações. Estes dados indicam que embora os monócitos não-clássicos sejam considerados pró-inflamatórios, na vigência das reações a subpopulação de monócitos intermediários tem maior participação no processo inflamatório.

A expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície das células dendríticas têm papel crucial na origem de resposta eficiente das células T (Santos et al., 2006). Dados prévios da literatura são escassos e controversos quanto à expressão de CD80 e CD86 na hanseníase, sugerindo que CD80 ora tem papel na anergia de pacientes virchowianos ora expressão aumentada como preditor de estados reacionais (Santos et al., 2007; Palermo et al., 2012). Palermo e colaboradores (2012) demonstraram expressão de CD86 deficiente em monócitos de pacientes virchowianos (LL), em contraste com Franciscon (2013) que encontrou expressão aumentada de CD86 em pacientes multibacilares. No presente estudo, encontramos forte expressão de CD86 nos monócitos clássicos e nos monócitos intermediários do grupo reacional quando comparado ao grupo sem reações hansênicas, corroborando os dados de alguns estudos sobre a importância da molécula CD86 na imunidade celular. Para exemplificar, Hashimoto e colaboradores (2002) demonstraram que, enquanto o BCG aumentou expressão nas CDs de MHC I, MHC II e CD86 e induziu vigorosa resposta imune celular, o *M.leprae* inibiu a expressão de MHC I, MHC II e CD86. Na asma brônquica não-atópica, Rutkowski e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão de CD86 e CD80 em monócitos isolados do sangue periférico estavam significativamente aumentados ao compará-lo ao grupo de indivíduos saudáveis. Este dado sugere que a maior expressão destas moléculas co-estimulatórias aumenta a habilidade dos monócitos em apresentar antígenos aos linfócitos e, aumenta o processo inflamatório na asma brônquica não-atópica.

Quanto à molécula CD80 não encontramos diferença entre os grupos sem reação e com reação hansênica (dados não

mostrados). Por outro lado, quando comparamos a expressão de CD80 entre os grupos reacionais 1 e 2, a expressão foi maior no surto reacional do tipo 1 e significativa ao compará-la ao surto tipo 2.

A molécula co-estimulatória CD40 é expressa juntamente com CD80 e CD86 nas células dendríticas em resposta à citocina IL-12, um indutor da resposta imune Th1, através do estímulo à produção de INF- $\gamma$  e fator de crescimento para células T (Santos et al., 2006; Banchereau et al., 2000). Hashimoto e colaboradores (2002) demonstraram que CD40L (ligante do CD40) deve ter papel importante na maturação das células dendríticas, e aumenta a função apresentadora de antígenos das células dendríticas infectadas pelo *M. tuberculosis*. Entretanto, a ligação com moléculas CD40 nas células dendríticas infectadas pelo *M. leprae* aumentou a expressão de CD86 mas não alcançou o nível necessário para estimular uma resposta das células T. Por outro lado, tem se descrito a participação de CD40 na resposta imune humoral através do estímulo de células B (Laman et al., 1996). No presente estudo, encontramos expressão significativa da molécula CD40 no grupo reacional quando comparado ao grupo sem reações, o que sugere um papel para CD40 nos dois tipos de reação, através da amplificação da via de imunidade celular (SR1) ou humoral (SR2).

Depois de verificarmos a frequência de monócitos e ativação celular destes através da expressão de moléculas co-estimulatórias entre os grupos com reação e sem reação hansênica, estudamos as mesmas variáveis entre os grupos reacionais apenas, buscando diferenças entre as reações tipo 1 e tipo 2.

Quanto à frequência de monócitos, não houve diferença entre os grupos de reação tipo 1 e tipo 2, mantendo o padrão de

predomínio dos monócitos clássicos em ambos grupos. Existe um maior número de monócitos não-clássicos nos pacientes do grupo reacional tipo 1 comparado aos do grupo reacional tipo 2 mas não estatisticamente significativa.

A molécula CD86 é mais expressada na subpopulação de monócitos intermediários tanto na reação tipo 1 quanto na reação tipo 2, quando comparada às subpopulações de monócitos clássicos e não-clássicos dos mesmos grupos. Este dado indica que a maior expressão de CD86 em monócitos intermediários pode ser importante na patogênese das reações hansênicas.

A molécula CD40 não mostrou diferença de expressão entre os grupos. Mesmo com dados controversos na literatura sobre o papel de CD80, nosso estudo corrobora a hipótese de participação ativa na resposta imune celular na infecção pelo *M. leprae*, não podendo afirmar o mesmo sobre a molécula CD40.

O complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) tem papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune. Presente nas células apresentadoras de antígenos, participa da ativação de células T facilitando o reconhecimento de patógenos e ativando estas células. Há estudos que mostram que a deficiência de MHC II diminui a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos e macrófagos, quando são estimulados com o agonista do receptor toll-like 4 (TLR4) (Liu X et al., 2011). Embora não tenhamos encontrado diferença na expressão de MHC II nas subpopulações de monócitos entre os grupos com reação e sem reação hansênica (dados não mostrados), quando comparamos os grupos de reação tipo 1 e tipo 2, existe uma maior expressão de MHC II nos monócitos clássicos no SR1, dado que sugere que no contexto do SR1 esta molécula possa contribuir com estímulo da resposta

inflamatória. Outro ponto que nos chamou atenção foi a expressão, acima da média do grupo, de MHC II no SR1 (figura 8) de um único indivíduo. Curiosamente, é o mesmo sujeito que apresenta expressão bastante aumentada de CD80 no SR1 (figura 7), destoando do restante do grupo. É importante frisar que, este indivíduo, apresentava surto reacional tipo 1 grave, com placas eritematosas distribuídas por todo o corpo. A análise estatística foi realizada com e sem os dados deste sujeito, e a retirada destes não alterou o resultado da análise, que manteve a diferença estatisticamente significativa.

## VIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

1. Avaliar o papel das subpopulações de monócitos *in situ* nas reações hansênicas
2. Verificar a influência do tratamento medicamentoso das reações hansênicas no comportamento das subpopulações de monócitos
3. Comparar resultados de pacientes em tratamento e virgens de tratamento com MDT
4. Estudar se há diferenças de subpopulações de monócitos entre as formas clínicas da hanseníase

## **IX. CONCLUSÕES**

Os monócitos intermediários e a molécula CD86 têm maior expressão em pacientes com reações hansênicas, podendo exercer um importante papel na sua patogênese. Outras moléculas como CD40, CD80 e MHC II também podem contribuir para amplificar a resposta inflamatória nos diferentes tipos de reações.

## X. SUMMARY

**Background:** Leprosy is a chronic and granulomatous infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which has preference for periferic nerves and skin. The clinical presentations and the exacerbated inflammatory episodes named leprosy reactions, depends on the host immune response, predominantly cellular or humoral. Monocytes are derived from bone marrow and have active participation on the host immune response development against *M.leprae*. Monocytes become dendritic cells and macrophages, both of them are APCs, crucial in innate immune response and connect to adaptive immune response when they activate auxiliary T cells.

**Objective:** Evaluate monocytes subsets and the activation degree through deteccion of surface molecules CD80, CD86, CD40 and MHC II on the clinical expression of leprosy and the reactions.

**Methodology:** 20 ml of blood heparinized were collected from PB (n=22), MB (n=12), SR1 (n=13), SR2 (n=13) and was performed the separation of mononuclear cells and the activation degree was determined by flow cytometry by staining of MHC II, CD80, CD86 and CD40. **Results:** Patients with leprosy reactions presented increased CD86, CD40 and intermediate monocytes expression. CD80 and MHC II were more expressive in the leprosy reaction type 1 group. **Conclusions:** Intermediate monocytes and CD86 can be crucial in leprosy reactions pathogenesis. The others molecules CD40, CD80 and MHC II can also contribute to increase the inflammatory response in different leprosy reactions.

Key-words: leprosy, monocytes subsets, costimulatory molecules

## XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., Gabuzda, D. (2003) Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 1701–1707.

Araújo, MG. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.3, p.373-382, 2003.

Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2000; 18: 767-811.

Belge KU, Dayyini F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberg M, Frankenberg B, Espevi T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *The Journal of Immunology*. 168:3536-42, 2002.

Brightbill, HDDH; Libraty, SR; Krutzik RB; Yang, JT; Belisle, JR; Bleharski, M; Maitland, MV; Norgard, SE; Plevy, ST; Smale, PJ; Brennan, BR; Bloom, PJ; Modlin, RM. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, v.285, p.732–736, 1999.

Britton, WJ; Lockwood, DNJ. Leprosy. *The Lancet*, v.363, p.1209-1219, 2004.

Castano D, Garcia LF, Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*,91:348–60, 2011.

Costa RD, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Costa AMDD, Costa MD, Nishi MP, Teixeira MM, Teixeira AL, Antunes CMF. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(2):99-103, 2008.

Costa RD. Estudo do perfil de citocinas inflamatórias, moléculas anti-inflamatórias e neurotrofina em pacientes com hanseníase, em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 148p., 2008.

Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunology and Cell Biology* 2000;78:318-24.

Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82:3170-6.

Franciscon GB. Grau de ativação e frequência das sub-populações de monócitos entre os pacientes com forma multibacilar e paucibacilar da hanseníase, em Bahia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 90p., 2013.

Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996) Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87, 373-377.

Grossi, MAF. Estudo das possíveis mudanças na classificação da hanseníase com utilização do teste ML FLOW e suas implicações no tratamento e controle da endemia, em Minas Gerais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 196p., 2005.

Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4):365-75, 2002.

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. M. *leprae* infection in monocytes-derived dendritic cells and its influence on antigenpresenting function. *Infection and Immunity*. 9(70):5167-76, 2002.

Kahawita, I P; Walker, SL; Lockwood, DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v 83, n. 1, p. 75-82, 2008.

Kahawita IP, Lockwood, DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 329-337, 2008.

Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. Functions of CD40 and its ligand gp39 (CD40L). *Critical Reviews in Immunology*, 16:59-108,1996.

Lana FCF, Lima RF, Araújo MG, Fonseca PTS. Situação epidemiológica da hanseníase no município de Belo Horizonte/MG-Período 92/97. *Hansenologia Internationalis*, 25(2): 121-132, 2000.

Lienhardt C, Fine PE. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Leprosy Review* 1994;65:9-33.

Liu X, Zhan Z, Li D, Xu L, Ma F, Zhang P, Yao H, Cao X. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nature Immunology* 2011 May;12(5):416-24.

Machado P, Abrams J, Santos S, Brennan P, Barral A, Barral-Neto M. Production of host-protective (IFN-gamma), host-impairing (IL-10, IL-13) and inflammatory (TNF-alpha) cytokines by PBMC from leprosy patients stimulated with mycobacterial antigens. *European Journal of Dermatology*. Vol. 8(2): 98-103,1998, Revues.

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 79(6):647-664, Nov/dez. 2004.

Machado PRL., Imunologia da Hanseníase. In: Talhari S., Neves RG. *Hanseníase*. 3. ed., gráfica Tropical: Manaus, 97-112 p., 1997.

Mayer G, Nyland J., Cells involved in immune responses and antigen recognition. In: Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Immunology* . 7. ed., Elsevier: United Kingdom, 564p., 2006.

Mendonça VA, Costa RS, Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia na Hanseníase. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 83(4):343-50, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. *Hanseníase - Atividades de Controle e Manual de Procedimentos*. Brasília, 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. *Guia para Hanseníase*. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Gestão de Políticas Estratégicas. ATDS; 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional>

Modlin; RL; Melancon-Kaplan, J; Young, SMM; Pirmez, C; Kino, H.; Convit, J; Rea, TH; Bloom, BR. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.85, p.1213-1217, 1988.

Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Current Opinion in Immunology*, 22:48–54, 2010.

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. *The Journal of Immunology*. 178:338-44, 2007.

Newton S, Ding Y, Chung C, Chen Y, Lomas-Neira J, Ayala A. Sepsis-induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response. *Surgical Infections*. 5(4):375-83, 2004.

Opromolla, D. V. A. *Noções de hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 126p., 2000.

Passilick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocytes subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 74(7):2527-34, 1989.

Palermo ML, Trindade MAB, Duarte AJS, Cacere CR, Bernard G. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 107(Suppl. I): 167-173, 2012.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16<sup>+</sup> (FcγRIII<sup>+</sup>) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 517-27, 2002.

Ribeiro Júnior AF, Vieira MA, Caldeira AP. Perfil epidemiológico da hanseníase em uma cidade endêmica no Norte de Minas Gerais.

*Revista Brasileira de Clinica Médica* São Paulo, jul-ago;10(4):272-7, 2012.

Ridley DS & Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. *International Journal Leprosy*. 34:255-73, 1966.

Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infectious Diseases*, 11:464-70, 2011.

Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *European Heart Journal* 32(1):84-92, 2011.

Rutkowski R, Moniuszko TY, Stasiak-Barmuta A, Kosztyla-Hojna B, Alifier M, Rutkowski K, Tatarczuk-Krawiel A. CD80 and CD86 Expression on LPS-Stimulated monocytes and the effect of CD80 blockade on IL-4 and IFN- $\gamma$  production in nonatopic bronchial asthma. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51: 421-28, 2003.

Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, Van HH. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) coestimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi Japanese Journal of Leprosy*. 78(1):15-24, 2001.

Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van HH, Nery JA, Miranda A. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clinical and Experimental Dermatology* 32:75-80, 2006.

Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangdaeng S, Morens DM: Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *International Journal of Leprosy and other Mycobacteriosis Diseases*, 62(4):559-67, 1994.

Sieling, P. A., X.-H. Wang, M. K. Gately, J. L. Oliveros, T. McHugh, P. F. Barnes, S. F. Wolf, L. Golkar, M. Yamamura, Y. Yogi, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *Journal of Immunology* 153:3639, 1994.

Sinsimer D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* Actively Modulates the Cytokine Response in naïve human Monocytes. *Infection and Immunology*. 78(1):293-300, 2010.

Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Neto M, Van Weyenbergh J. Cd16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *Journal of Leukocyte Biology*. 79:36-9, 2006.

Sridevi K, Neena K, Chitralkha KT, Arif AK, Tomar D, Rao DN. Expression of coestimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ ) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using M.

leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trat protein. *International Immunopharmacology*. 4:1-14, 2004.

Stefani MM, Guerra JG, Sousa ALM, Costa MB, Oliveira MLW, Martelli CT, Scollard DV. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BioMedCentral Infectious Diseases*, 9:75, 2009.

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 82:244-52, 2007.

Talhari, S.; Neves, R.G. *Dermatologia Tropical: Hanseníase*. 4. ed. Manaus: Editora Tropical, 2006, p.15-16.

WHO – World Health Organization. *Leprosy: Global situation*. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/en/>. Acesso em 18 de outubro de 2013.

Wong KL, Yeap WY, JJY Tai, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research*, 53:41–57, 2012.

Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, Longo DL, Alvord WG, Valderrama L, et al. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infection and Immunity*, 66:499– 504, 1998.

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocytes subset. *Blood*. 118 (12):50-61, 2011.

Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human monocytes. *Journal of leuckcytes biology*. 67:603-6, 2000.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116:74-80, 2010.

## XII. ANEXOS

### XII.1 FICHA CLÍNICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGAR SANTOS  
AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE  
SERVIÇO DE IMUNOLOGIA



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS EM  
HANSENÍASE

### FICHA CLÍNICA

#### A- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. INICIAIS – RG HUPES: \_\_\_\_\_
2. DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_
3. IDADE: \_\_\_\_\_ ANOS
4. GÊNERO: a) Masculino ( )      b) Feminino ( )
5. FOTOTIPO (Fitzpatrick): a) I ( ) b) II ( ) c) III ( ) d) IV ( ) e) V ( ) f) VI ( )
6. PROFISSÃO: \_\_\_\_\_
7. TELEFONE: \_\_\_\_\_
8. COMUNICANTES COM MH: ( ) Sim      ( ) Não      Quantos? \_\_\_\_\_

#### B- DADOS CLÍNICOS

1. MÊS E ANO DE DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE: \_\_\_\_\_
2. CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE: a) I ( ) b) TT ( ) c) BT ( ) d) BB ( )  
e) BL ( ) f) LL ( )
3. SURTO REACIONAL: a) Tipo I ( ) b) Tipo II ( ) c) Não-classificado ( ) d) Não ( )
4. BACILOSCOPIA: a) Negativa ( ) b) Positiva ( )      IB= \_\_\_\_\_
5. AP: \_\_\_\_\_

6. APRESENTA OUTRAS DOENÇAS CRÔNICAS? ( ) Sim ( ) Não  
Quais? \_\_\_\_\_

7. ENCONTRA-SE EM USO DE MEDICAMENTO? ( ) Sim ( ) Não  
Quais? \_\_\_\_\_

8. COLETA DE SANGUE:

a) Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ PQT: ( ) Sim ( ) Não SR1 ( ) SR2 ( ) sem SR ( )  
Pred ( ) Talid ( ) ImSup ( )

b) Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ PQT: ( ) Sim ( ) Não SR1 ( ) SR2 ( ) sem SR ( )  
Pred ( ) Talid ( ) ImSup ( )

c) Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ PQT: ( ) Sim ( ) Não SR1 ( ) SR2 ( ) sem SR ( )  
Pred ( ) Talid ( ) ImSup ( )

d) Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ PQT: ( ) Sim ( ) Não SR1 ( ) SR2 ( ) sem SR ( )  
Pred ( ) Talid ( ) ImSup ( )

9. PQT ( ) MB ( ) PB DATA INÍCIO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

DATA ALTA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

( ) ESQUEMA ALTERNATIVO. QUAL? \_\_\_\_\_

RESPONSÁVEL PELA AVALIAÇÃO: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## XII.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS – UFBA

Rua Augusto Viana, s/n – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS NA HANSENÍASE”

**Investigador Principal:** Paulo Roberto Lima Machado, Médico, Ambulatório de Hanseníase, Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João da Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA

**Nome do**

**Paciente:** \_\_\_\_\_

#### **Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a associação entre resposta imune e genética com as formas clínicas da hanseníase e estados reacionais. Esta participação implica na sua concordância em submeter-se a uma coleta de amostra de sangue e retirada de um fragmento da lesão de pele (biópsia). Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

#### **Participação Voluntária:**

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada. Você não será diretamente beneficiado com os resultados dos testes realizados na pesquisa, mas poderá solicitá-los a qualquer tempo.

#### **Finalidade do estudo:**

Este estudo têm a finalidade de avaliar a influência da resposta imune e genética nas formas clínicas da hanseníase e estados reacionais.

**Procedimentos:**

Caso concorde em participar do estudo, você doará 40 mililitros de sangue venoso, que será coletado por profissional capacitado para tal, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Além disso será feita uma biópsia da lesão de pele após anestesia local, procedimento usado normalmente para o diagnóstico da doença. Com a parte líquida do sangue nós iremos verificar se você tem infecção por germes que causam hepatite (vírus B e C), além do vírus HIV (causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), HTLV e outros vírus que possam modificar a resposta do seu sistema de defesa. O resultado destes exames lhe será fornecido. A outra parte do sangue será usada para estudar sua resposta de defesa contra a bactéria que causa hanseníase e para estudar alguns marcadores genéticos. Você pode solicitar estes resultados.

**Confidencialidade:**

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análise dos Riscos e Benefícios:**

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. A biópsia de pele é a retirada de pequeno fragmento da lesão de pele, sendo rotina para o diagnóstico de sua doença. Será feita somente após anestesia local por médico do ambulatório de hanseníase, para evitar desconforto ou dor e poderá deixar uma pequena cicatriz.

**Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:**

Este estudo visa avaliar a existência de interação da resposta imunológica e genética com a Hanseníase. O conhecimento preciso dessa interação poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias no controle da doença e principalmente dos episódios reacionais.

**Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

**Esclarecimentos:**

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Paulo Roberto Lima Machado, coordenador do

projeto, médico do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, João das Botas, s/n – Canela, telefone (71) 3237-7353, ou com Dra Lidia Maria Medeiros Machado, coordenadora do estudo no hospital Dom Rodrigo de Menezes, telefone (71) 8202-4284, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos , na pessoa do Dr. Roberto Badaró, no endereço Rua Augusto Viana S/N – Canela, telefone (071) 3283-8043.

**Consentimento:**

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome ou colocar sua impressão digital abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

---

Assinatura ou impressão digital do Participante ou Responsável

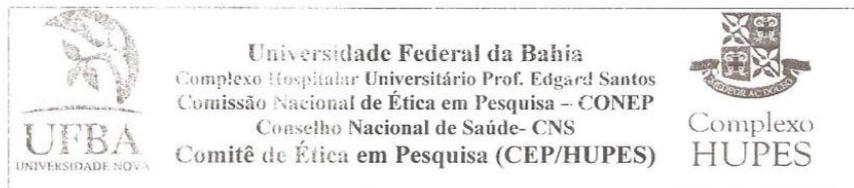
---

Assinatura do Pesquisador

Local: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

## XII.3 OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER ADENDO CEP/HUPES N.º 50/2010

O Pesquisador Responsável, Paulo Roberto Lima Machado, encaminhou ao Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo HUPES o adendo ao projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da resposta imune e marcadores genéticos na hanseníase”, que foi protocolado sob nº 50/2010, avaliado e aprovado em parecer datado em 09 de dezembro de 2010.

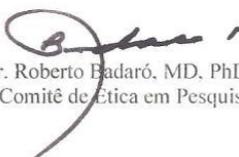
O referido adendo solicita:

- Inserção do Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes como centro colaborador;
- Atualização do Anexo I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido modificado de acordo com as recomendações CONEP nº 759/2010.

Protocolo CEP/HUPES – 50/2010

O CEP/HUPES avaliou e aprovou as solicitações do adendo em:

22/03/2012

  
Prof. Dr. Roberto Badaró, MD, PhD  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/HUPES

Comitê de Ética em Pesquisa- CEP/HUPES  
Rua Augusto Viana, s/n - Canela - Salvador - Bahia CEP: 40.110-060  
Tel.: (71) 3283-8043 FAX: (71) 3283-8141  
E-mail: cep.hupes@gmail.com

1

Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS NA HANSENÍASE.

Pesquisador Responsável : Paulo Roberto Lima Machado

Data da Versão 16/06/2010

Cadastro 50/10

Data do Parecer 07/10/2010

Grupo e Área Temática I.1 Genética Humana

Objetivos do Projeto

Objetivo 1: Determinar o perfil de citocinas in vitro e identificar quais as células produtoras dessas citocinas em grupos de pacientes com lepra tuberculóide, com lepra lepromatosa, pacientes borderline, em resposta ao antígeno de M. leprae em comparação ao grupo controle - indivíduos saudáveis.

Objetivo 2: Identificar mecanismo(s) envolvido na mudança do padrão de resposta imune em pacientes com episódios reacionais, tais como ativação de células T, NK e macrófagos.

Objetivo 3: Avaliar a frequência de monócitos pró-inflamatórios (CD14+CD16+) em pacientes com as formas tuberculóide, lepromatosa e borderline.

Objetivo 4: Verificar se polimorfismos nos genes candidatos IL-10, IL-8, IL-9, IL-13, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , PARK2/PACRG e ErbB2 estão afetando os níveis de expressão dos genes ou a função da proteína expressa e, se podem influenciar os estados reacionais nos pacientes com hanseníase.

Objetivo 5: Avaliar a expressão gênica global em lesões hansênicas.

Sumário do Projeto

Este projeto tem como objetivo estudar as alterações imunológicas que ocorrem em pacientes portadores de hanseníase, utilizando as técnicas de determinação de citocinas in situ e em sangue periférico além de estudar através de técnica de biologia molecular estudar os possíveis genes reguladores das citocinas envolvidas nos mecanismos imunopatogênicos da doença. Os pesquisadores farão biópsias e colherão sangue de todos os pacientes para a realização desse estudo. Esse projeto tem uma equipe de pesquisadores nacionais e com demonstrada experiência no estudo dessa patologia e no domínio das técnicas que vão ser utilizadas. O consentimento informado é claro e expressa a real natureza do estudo e os benefícios e riscos da participação do paciente no estudo. Fica confuso e discordante da folha de rosto o número de pacientes a serem envolvidos no estudo. A folha de rosto diz que irá incluir 250 pacientes e na descrição do projeto soma-se 410 pacientes. Os pesquisadores informam que irão incluir no estudo os seguintes pacientes: 40 pacientes no Grupo 1 (sem reação hansênica), 20 pacientes no Grupo 2 (com reação tipo 1 ou reação reversa), e 20 pacientes no Grupo 3 (com reação tipo 2 ou eritema nodoso leproso). Para os objetivos 4 e 5 planeja-se incluir 150 pacientes no Grupo 1 (sem reação hansênica), 50 pacientes no Grupo 2 (com reação tipo 1 ou reação reversa), e 50 pacientes no Grupo 3 (com reação tipo 2 ou eritema nodoso leproso). Farão a coleta de sangue e realizarão biópsia de pele para realização do estudo.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não

Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 410 Na Instituição
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	não informado
Data de término prevista	2 anos
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Parecer:

Projeto Aprovado

Informações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ e ao término do estudo.

Para projetos do Grupo 1 do fluxograma acrescentar:

Seu projeto (Registro 50/10 Grupo I Área temática especial GENÉTICA HUMANA) está sendo encaminhado a CONEP e só poderá ser iniciado após parecer aprovatório desta.

  
ROBERTO BADARÓ, MD PHD  
Coordenador CEP  
CHUPES

Relatórios Parciais : 16 08 2011  
16 10 2011  
16 04 2012

Relatório FINAL : setembro 2012