



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



**GRAU DE ATIVAÇÃO E FREQUÊNCIA DAS SUB-POPULAÇÕES DE  
MONÓCITOS ENTRE OS PACIENTES COM FORMA MULTIBACILAR  
E PAUCIBACILAR DA HANSENÍASE.**

**Giovana Bergheme Franciscan**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2013**

F818 Francison, Giovana Bergheme

Grau de ativação e frequência das sub-populações de monócitos entre os pacientes com a forma multibacilar e paucibacilar da hanseníase. / Giovana Bergheme Francison. – Salvador, 2013.

90 f.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Hanseníase. 2. Monócitos. 3. Moléculas. 4. Saúde. I. Carvalho, Lucas Pedreira de. 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**



**GRAU DE ATIVAÇÃO E FREQUÊNCIA DAS SUB-POPULAÇÕES DE  
MONÓCITOS ENTRE OS PACIENTES COM FORMA MULTIBACILAR  
E PAUCIBACILAR DA HANSENÍASE.**

**GIOVANA BERGHEME FRANCISCON**

**Professor-orientador: LUCAS PEDREIRA DE CARVALHO**

**Co-Orientadora: SARA TIMÓTEO PASSOS**

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

Salvador (Bahia), 2013

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Membros Titulares:**

. Selma Maria Bezerra Jeronimo, graduada em Medicina e Ciências Biológicas pela UFRN, doutora em Ciências Biológicas pela UFSP. Professora titular da UFRN.

. Maria Ilma Andrade Santos Araujo, graduada em Medicina e Farmácia Bioquímica pela UFBA, doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fiocruz – RJ, Pós-doutora pela universidade de Cornell NY,EU. Pesquisadora do Serviço de Imunologia da UFBA e professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCs) e Imunologia (PPGIIm).

. Paulo Henrique Eufrazio de Oliveira, graduado em Fisioterapia pela Faculdade de Reabilitação da Asce, Doutor em Cinesiologia e Fisioterapia pela Universidade Nacional de San Martin. Coordenador do curso de Fisioterapia da União Metropolitana de Educação e Cultura, Membro da comissão permanente para o MERCOSUL do COFFITO.

### **Membro Suplente:**

. Lucas Pedreira de Carvalho (Professor-Orientador), graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Católica de Salvador, doutor em Patologia Humana pela UFBA, pós-doutor em Imunologia pela University of Pennsylvania. Professor do curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCs) e Imunologia (PPGIIm) e professor adjunto da UFBA.

*“Não há problema que não possa ser  
solucionado pela paciência.”*

*(Chico Xavier)*

*Dedico a realização desse projeto aos meus  
pais, Amauri e Regina, a minha irmã  
Bruna e a Júlio Lemos.*

## **Agradecimentos:**

Agradecer significa demonstrar gratidão, e para a conclusão de mais essa etapa da vida, não seria possível sem a presença de muitas pessoas.

Agradecer a Deus e todos os meus guias por permitirem a abertura de caminhos pelos quais consegui chegar até aqui. Dando-me sabedoria, paciência e perseverança para nunca desistir. Além de colocar no meu caminho pessoas maravilhosas que tornaram essa trajetória muito agradável.

Agradecer aos meus pais Amauri e Regina, por serem meus exemplos tanto na vida pessoal como na vida profissional me ensinando a ser a pessoa que sou hoje.

Agradecer a minha querida irmã Bruna, que por sua visão espetacular de sempre saber qual caminho devo seguir. Obrigada por seus conselhos.

Agradecer ao meu noivo Júlio Lemos, por ser um maravilhoso companheiro, compreensivo, amigo e estar sempre presente em todos os momentos da minha vida me apoiando incondicionalmente em todas as minhas decisões.

*Agradecer em especial a Dr. Lucas Carvalho e Dra. Sara Passos, por terem o dom de ensinar, permitirem a realização desse projeto e por serem exemplos de pesquisadores.*

*Deixo aqui o meu sincero voto de agradecimento, pela confiança, todo suporte e apoio de sempre. Tenham minha eterna admiração e gratidão.*

Agradecer a Dr. Edgar Carvalho, por permitir que a *Fisioterapia* fizesse parte do Serviço de Imunologia e pela confiança que me foi dada.

Agradecer a Dr. Paulo Machado por incentivar a realização desse trabalho no Ambulatório de Dermatologia.

Agradecer as minha queridas companheiras Rúbia Costa e Taís Menezes por toda a dedicação diária, por toda ajuda em momentos as vezes difíceis e por serem pessoas maravilhosas as quais quero ter como minhas eternas amigas.

Agradecer a toda equipe do Serviço de Imunologia, por me acolher e me ensinar a trabalhar com pesquisa.

Agradecer a Andrea Magalhães, por ser uma excelente professora e pela convivência diária.

Agradecer aos professores do PPgCS por todo conhecimento transmitido de forma brilhante e enriquecedora.

Agradecer a toda equipe do Ambulatório Magalhães Neto e Hospital Dom Rodrigo de Menezes. Em especial a equipe de genética por todas as nossas tardes e manhãs de coletas, sempre muito agradáveis.

Agradecer aos colegas da turma de pós-graduação em ciências da saúde, por todo o período que estivemos juntos.

Agradecer a todos os pacientes por colaborarem com a pesquisa.

Demonstro aqui a minha eterna gratidão a todos que fizeram parte direta ou indiretamente da realização desse projeto.

## **Instituições Participantes:**

### UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia
- Serviço de Imunologia
- Ambulatório Magalhães Neto
- Hospital Universitário Professor Edgard Santos

### HOSPITAL DOM RODRIGO DE MENEZES

### EQUIPE

- Sara Timóteo Passos, Co-orientadora, Doutora em Imunologia pela UFBA e Pós-doutora em Patobiologia pela University of Pennsylvania.
- Taís Menezes Cerqueira Campos, Estudante de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (matrícula 212116365)
- Rúbia Suely Santana Costa, Estudante de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (matrícula 211115900)
- Grupo Projeto Genética: Joyce Moura Oliveira, Jamile Leão Rêgo, Léa Castellucci, Lucas Frederico de Almeida e as estudantes de iniciação científica.
- Grupo Ambulatórios de Hanseníase: Equipe de técnicos, enfermeiros, farmacêuticos, fisioterapeutas, residentes e colaboradores.

**Fontes de Financiamento:**

1. INCT – DT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doença Tropical)  
Processo Nº 573839/2008-5.
2. CAPES - Bolsa de Estudo

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS .....	14
ÍNDICE DE FIGURAS .....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	16
<b>I. RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>II. OBJETIVO .....</b>	<b>19</b>
II.1 Objetivo Geral .....	19
II.2 Objetivos Secundários .....	19
<b>III. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>IV. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
IV.1 Hanseníase .....	21
<i>IV.1.1 Patogênese da hanseníase .....</i>	<i>22</i>
<i>iv.1.2 Aspectos Clínicos e Imunológicos .....</i>	<i>23</i>
<i>IV.1.3 Sub-populações de Monócitos .....</i>	<i>25</i>
<i>IV.1.4 Moléculas Co-estimulatórias .....</i>	<i>27</i>
<b>V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
V.1 Pacientes e Indivíduos Sadios .....	29
<i>V.1.1 Ambulatórios Magalhães Neto e Hospital Dom Rodrigo de Menezes .....</i>	<i>29</i>
<i>V.1.2 Pacientes Paucibacilares .....</i>	<i>30</i>
<i>V.1.3 Pacientes Multibacilares .....</i>	<i>30</i>
<i>V.1.4 Indivíduos Sadios .....</i>	<i>30</i>
V.2 Grau de Incapacidade Funcional .....	30

V.3 Marcação para Citometria de Fluxo .....	31
V.3.1 <i>Experimento ex-vivo</i> .....	31
V.4 Desenho de Estudo .....	32
V.4.1 <i>Fluxograma ilustrativo do estudo</i> .....	32
V.5 Critério de Inclusão .....	33
V.6 Critérios de Exclusão .....	33
V.7 Análise Estatística .....	33
V.8 Considerações Éticas .....	33
<b>VI. ARTIGO</b> .....	36
<b>VII. RESULTADOS GERAIS</b> .....	48
VII.1 Características epidemiológicas e clínicas .....	48
VII.2 Grau de incapacidade funcional .....	49
VII.3 Análise dos monócitos em pacientes com hanseníase e indivíduos sadios ....	53
VII.3.1 <i>Frequência dos monócitos em pacientes com hanseníase antes do tratamento e indivíduos sadios</i> .....	53
VII.3.2 <i>Expressão de moléculas MHC II, CD86, CD80 e CD40 em pacientes com hanseníase antes do tratamento e indivíduos sadios</i> .....	53
VII.4 Caracterização das sub-populações de monócitos circulantes em hanseníase .....	54
VII.4.1 <i>Frequência de sub-populações de monócitos em pacientes hanseníase com as formas clínicas PB e MB antes do início do tratamento</i> .....	55
VII.4.2 <i>Grau de ativação de sub-populações de monócitos de pacientes com as formas PB e MB de hanseníase antes do início do tratamento e indivíduos sadios</i> .	56

VII.4.3 Avaliação da frequência das sub-populações de monócitos em pacientes hansênicos com as formas clínicas PB e MB antes do início e durante o tratamento .....	57
<b>VIII. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
VIII.1 Resumo dos Resultados .....	64
<b>IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO .....</b>	<b>65</b>
<b>X. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>66</b>
<b>XI. SUMMARY .....</b>	<b>67</b>
<b>XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>XIII. ANEXOS .....</b>	<b>61</b>
XIII.1 Ficha clínica .....	61
XIII.2 Ficha de avaliação do grau de incapacidade funcional .....	63
XIII.3 Termo de Consentimento livre e esclarecido .....	65
XIII.4 Ofício do comitê de ética em pesquisa (CEP) do HUPES .....	67
XIII.5 Normas para publicação do artigo na <i>Scandinavian Journal of Immunology</i> .	85

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Definição dos graus de Incapacidade Funcional para pacientes com hanseníase de acordo com OMS .....	32
<b>Tabela 2.</b> Características epidemiológicas e clínicas de pacientes e indivíduos sadios incluídos no estudo .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma do estudo .....	32
<b>Figura 2.</b> Grau de incapacidade funcional .....	49
<b>Figura 3.</b> Alteração da sensibilidade de pacientes com hanseníase antes e durante o tratamento .....	50
<b>Figura 4.</b> Análise dos nervos principais acometidos na hanseníase de pacientes com as formas PB e MB antes e durante o tratamento .....	51
<b>Figura 5.</b> Análise da força muscular de pacientes acometidos na hanseníase com as formas PB e MB antes e durante o tratamento .....	52
<b>Figura 6.</b> Frequência de monócitos CD14+ em pacientes antes do tratamento e indivíduos saudios .....	53
<b>Figura 7.</b> Grau de expressão de moléculas MHC II, CD86, CD80 e CD40 em monócitos CD14+ antes do tratamento e indivíduos saudios .....	54
<b>Figura 8.</b> Frequência da população de monócitos em pacientes com hanseníase .	55
<b>Figura 9.</b> Frequência das sub-populações de monócitos em pacientes com hanseníase antes do tratamento e indivíduos saudios .....	56
<b>Figura 10.</b> Grau de ativação das sub-populações de monócitos através das moléculas co-estimulatórias MHC II e CD86 .....	57
<b>Figura 11.</b> Frequência das sub-populações de monócitos em pacientes com a forma PB e MB .....	58
<b>Figura 12.</b> Grau de ativação celular utilizando as moléculas co-estimulatórias .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BB	Borderline-Borderline
BL	Borderline-Lepromatoso
BT	Borderline-Tuberculóide
IB	Índice Bacilar
VV	Virchoviano
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
LL	Lepromatoso-Lepromatoso
LPS	Lipopolissacárideo
OMS	Organização Mundial de Saúde
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
PGL-1	Glicolípido Fenólico-1
Th1	Células T auxiliaadoras do tipo 1
Th0	Células T auxiliaadoras do tipo 0
Th2	Células T auxiliaadoras do tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Linfócito Regulatório
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
NK	Células Natural Killer
CCL2 (MCP-1)	Proteína quimioatraente de monócitos-1
CCL3 (MIP-1)	Proteína inflamatória de macrófagos
CD14	Grupo de diferenciação 14
CD16	Grupo de diferenciação 16
CD14++CD16-	Monócitos Clássicos
CD14++CD16+	Monócitos Intermediários
CD14+CD16+	Monócitos Não-clássicos
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
CTLA-4 (CD152)	Citotóxico linfócito T associado a proteína 4
CD28	Grupo de diferenciação 28
CD80 (B7-1)	Grupo de diferenciação 80

CD86 (B7-2)	Grupo de diferenciação 86
CD40	Grupo de diferenciação 40
MHC II (HLA-DR)	Complexo de histocompatibilidade principal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
APC	Alofococianin
PE	Ficoeritrina
FITC	Isotiocianato de Flouresceína
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophil Protein
IS	Indivíduos Sadios
FC	Forma Clínica
n	Número da amostra
SSC	Side scatter
FSC	Forward scatter
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HCV	Vírus da hepatite tipo C
HBV	Vírus da hepatite tipo B
HTLV	Vírus linfotrópico de células T
MMSS	Membros superiores
MMII	Membros inferiores

## I. RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A hanseníase é uma doença de caráter granulomatoso e crônico causada pelo *Mycobacterium leprae*, o qual tem tropismo por nervos periféricos e pele. Apresenta-se de forma espectral e polarizada. Enquanto pacientes com a forma multibacilar (MB) da doença não montam uma resposta Th1 facilitando assim a multiplicação do *Mycobacterium*, indivíduos com a forma paucibacilar (PB) produzem IFN-gama em resposta a antígenos de *M. leprae*. Os monócitos são tipos celulares circulantes derivados da medula óssea que se diferenciam em macrófagos e células dendríticas no tecido. Recentemente, os monócitos circulantes foram classificados em clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e não-clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). O grau de ativação dessas células está associado à intensidade da resposta de linfócitos T. **Objetivo:** Determinar o grau de ativação das sub-populações de monócitos em pacientes com hanseníase antes e durante o tratamento e identificar o perfil do grau de incapacidade funcional apresentado pelos pacientes incluídos no estudo. **Metodologia:** Foram coletados 20 ml de sangue heparinizado de pacientes PB (n=22) e MB (n=12) e realizada a separação de células mononucleares e a caracterização e o grau de ativação dos monócitos foi determinado por citometria de fluxo através da marcação de CD14, CD16, MHC II, CD80, CD86 e CD40. **Resultados:** Os pacientes com a forma multibacilar apresentaram a frequência de monócitos não-clássicos aumentada. Não houve diferença na expressão de CD80 e MHC II entre monócitos de pacientes com a forma paucibacilar e multibacilar da hanseníase. No entanto, monócitos de pacientes com a forma paucibacilar apresentaram uma baixa expressão de CD86 antes de iniciar o tratamento, a qual foi restaurada durante o tratamento. A maioria dos pacientes apresentaram grau zero de incapacidade funcional. **Conclusão:** Pacientes com a forma paucibacilar da hanseníase apresentam uma diminuição do grau de expressão da molécula co-estimulatória CD86 a qual é restaurada durante o tratamento com a PQT. Todos os pacientes não apresentaram alteração no grau de incapacidade funcional devido à hanseníase.

**Palavras-chaves:** Hanseníase, sub-populações de monócitos e moléculas co-estimulatórias.

## **II. OBJETIVOS**

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

Determinar o grau de ativação celular das sub-populações de monócitos em pacientes com hanseníase antes e durante o tratamento.

### **II.2 OBJETIVOS SEGUNDÁRIOS**

1. Identificar o perfil do grau de incapacidade funcional apresentados pelos pacientes com a forma MB e PB da hanseníase.

2. Determinar a frequência das sub-populações de monócitos em grupos de pacientes com a forma MB e PB da hanseníase e avaliar se o tratamento pode alterar esta frequência.

3. Determinar o grau de ativação celular das sub-populações de monócitos através da expressão das moléculas MHC II, CD86, CD80 e CD40 em grupos de pacientes com a forma MB e PB da hanseníase e avaliar se o tratamento pode alterar o grau de ativação destas células.

### III. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecto-parasitária crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Trata-se de uma doença de apresentação espectral caracterizada por formas clínicas contrastantes de acordo com a resposta imune desencadeada por influência da interação do meio ambiente, resposta imune do hospedeiro e do agente etiológico *M. leprae* (Machado et al., 2004). O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório que parasita os macrófagos e células de Schwann, apresentando replicação lenta e longo período de incubação que pode chegar a 5 anos (Machado et al., 2004; Costa et al., 2008). A hanseníase é apresenta situação epidemiológica com tendência a estabilidade na maior parte do país, porém este fato não é uma realidade nas regiões Norte, Centro-oeste e Nordeste do Brasil (Ramos-e-Silva & Rebello, 2001; Brasil, 2010). A resposta imune desencadeada pela infecção pelo *M. leprae* está associada ao fenótipo clínico apresentado pelo paciente. Os pacientes com hanseníase apresentam espectro clínico dicotômico, sendo a forma tuberculóide caracterizada por uma resposta imune Th1 e forma lepromatosa que apresenta resposta Th2 (Modlin, 2010). Os monócitos são células sanguíneas circulantes derivadas da medula óssea, sendo precursoras dos macrófagos teciduais. Eles são recrutados para locais de inflamação, onde se diferenciam em macrófagos (Auffray et al., 2009; Cros et al., 2010). Os monócitos são classificados em sub-populações de acordo com a expressão das moléculas CD14 e CD16. Existem três sub-populações, denominadas de monócitos clássicos, com expressão de CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>, os monócitos intermediários, CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> e os monócitos não clássicos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> (Zeigler-Heitbrock et al., 2010; Zawada et al., 2011). A avaliação de parâmetros como grau de incapacidade funcional juntamente com estudos experimentais funcionais, possibilita a busca por biomarcadores podendo apresentar relação com o grau de incapacidade nas diversas formas clínicas frente a infecção pelo *M. Leprae* (Khambati et al., 2009). Por isso, o objetivo geral do presente estudo foi determinar a frequência e o grau de ativação das sub-populações de monócitos em pacientes com hanseníase antes e durante o tratamento.

## IV. REVISÃO DE LITERATURA

### IV.1 HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença causada por uma infecção crônica pelo *Mycobacterium leprae* e que envolve primariamente os nervos superficiais periféricos e a pele, sendo que outros órgãos também podem ser afetados (Stingel, 1990; Bhat & Prakash, 2012). É considerada endêmica em países tropicais e subtropicais como Índia e Brasil, e segundo dados do Ministério da Saúde, apesar da situação epidemiológica da doença se apresentar com tendência a estabilidade na maior parte do país, isso não é uma realidade nas regiões Norte, Centro-oeste e Nordeste do Brasil (Costa et al., 2008; Ramos-e-Silva & Rebello, 2001). De acordo com dados oficiais da OMS (Organização Mundial da Saúde), durante o ano de 2011, 130 países e territórios registraram a prevalência da hanseníase, sendo 192,246 casos e em 2010 a prevalência foi de 228,474 casos. Países como Angola, Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia apresentam alta endemicidade, porém, altamente empenhados em eliminar a doença (WHO, 2012).

O tratamento da hanseníase é baseado em um esquema com combinação de três drogas (Teo et al., 2002), conhecido como poliquimioterapia (PQT), introduzido pela OMS em 1982. As três drogas envolvidas neste tratamento atuam como inibidores de TNF – citocina pró-inflamatória presente em altos níveis em pacientes hansenícos (Foss, 1997). Para a realização da PQT o paciente é classificado como multibacilar (MB) e paucibacilar (PB), sendo esta classificação de acordo com o número de lesões e baciloscopia. Os pacientes MB apresentam mais de 6 lesões, baciloscopia positiva e recebem a PQT-MB por 12 meses. Já os pacientes PB, apresentam menos de 6 lesões, baciloscopia negativa e recebem a PQT-PB por 6 meses (Goulart et al., 2002). Para o tratamento com a PQT os pacientes são definidos em PB e MB (Brasil, 2010), no entanto a definição da forma clínica dos pacientes com hanseníase é baseada na classificação de Ridley & Jopling (1966) na qual os pacientes são definidos como TT (tuberculóide), BT (borderline-tuberculóide), BB (borderline-borderline), BL (borderline-lepromatoso) e LL (lepromatoso-lepromatoso).

A lesão neural causada pela ação dos bacilos nas regiões de preferência, que são os nervos periféricos, determinam alterações sensitivas e motoras que levam a instalação de variados graus de incapacidade física que podem interferir na vida social e econômica dos pacientes. Deste modo é importante classificar esses graus de incapacidade funcional e correlacioná-los com os variados graus da doença.

Resultando em identificação precoce, evitando a instalação de um grau avançado de incapacidade, além do comprometimento do sistema nervoso periférico antes, durante e mesmo após o término do tratamento, ou seja, após a alta da medicação específica (PQT). A hanseníase é uma doença que causa incapacidades e deformidades duradouras. Por isso, em muitos países, atividades para controlar e tratar a hanseníase estão sendo integradas ao sistema geral de atenção à saúde, o que reduz o estigma associado à doença.

A Fisioterapia que está inserida em uma equipe multidisciplinar, tem um papel importante no tratamento de pacientes hanseníacos, através de instrumentos como as avaliações periódicas, orientações quanto à auto-cuidados, prescrição de exercícios e na prevenção precoce de deformidades, evitando graus avançados de incapacidade funcional (Gabino et al., 2003; Raposo et al., 2011).

#### IV.1.1 PATOGENESE DA HANSENÍASE

A espécie humana é o principal hospedeiro do *M. leprae*, um bactéria intracelular obrigatória, imóvel, gram positivo e álcool-ácido resistente, em forma de bastonete e possui afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos. (WHO, 2012; Brasil, 2010). Uma grande dificuldade para realizar exames e pesquisas em laboratórios é a impossibilidade de cultivar o *M. leprae in vitro*. A hanseníase acomete todas as faixas etárias, em ambos os sexos, porém dados da OMS refere uma proporção de 2:1 homens para mulheres, mas ressalva que esse dado não é universal e sim, regional. A forma de transmissão se dá através do contato entre indivíduos infectados com o *M. leprae* e indivíduos saudáveis, por meio do convívio, além da susceptibilidade genética. Dados revelam que 95% da população são naturalmente resistentes à infecção (Costa et al., 2008). A pele e as vias aéreas são os principais locais de entrada do bacilo no indivíduo, sendo o trato respiratório o local mais provável para a ocorrência da infecção (Brasil, 2010).

#### IV.1.2 ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS

Os pacientes com hanseníase são classificados de acordo com o número de lesões e presença de bacilo-álcool-ácido-resistente (BAAR), através da baciloscopia em: paciente PB, deve ter menos de 6 lesões, sem a presença de BAAR na biópsia e dentro desta classificação de paciente PB, as formas clínicas são tuberculóide (TT) e borderline-tuberculóide (BT), e paciente classificados como MB, deve possuir mais de 6 lesões, BAAR presente na biópsia e nesta classificação de paciente MB, as formas clínicas são borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL), lepromatoso-lepromatoso (LL) e a forma históide. A forma históide é pouco frequente e pode estar associada com a reativação da hanseníase por tratamento incompleto (Moreno et al., 2012). Para classificar as variadas formas clínicas inseridas em um amplo espectro clínico, a classificação recomendada é a de Ridley & Jopling, sendo baseada no aspecto histopatológico e que permite uma oscilação para ambos os pólos, tuberculóide ou lepromatoso também chamado de virchowiano. (Mendonça et al., 2008; Ridley & Joplin, 1966).

Os pacientes inseridos num mesmo espectro clínico da hanseníase apresentam variados tipos de lesões, sendo possível classifica-lo pelo número e aspecto das lesões. Os pacientes classificados como indeterminados caracterizam-se pela presença de máculas hipocrômicas ou áreas circulares de pele aparentemente normal, com limites pouco precisos com alteração de sensibilidade térmica, dolorosa, tátil e hipoidrose (Opromolla & Ura, 2002).

Quadros de pacientes com a forma clínica tuberculóide, são caracterizados por máculas ou placas em pequeno número, forma e tamanho variados, bem delimitados e de tom castanho, podendo ser planas ou com a borda levemente elevada e com o centro plano e hipocrômico. Existe a presença de alteração de sensibilidade nessas lesões (Opromolla & Ura, 2002).

A histopatologia é capaz de diferenciar os pacientes em pólos: resistente, denominado Tuberculóide (TT) e pólo de susceptível que é o virchowiano (VV). A histopatologia apresentada no pólo TT é caracterizada pela presença de granuloma de células mononucleares, principalmente linfócitos, macrófagos indiferenciados, monócitos, bacilos raríssimos ou ausentes. No pólo VV a histopatologia apresenta extensos granulomas de células macrofágicas volumosas, não epitelióides,

abarroadas de bacilos e os linfócitos apresentam-se de forma escassa e difusa no interior dos granulomas (Barreto, 2005).

Entre os dois pólos definidos encontram-se os subgrupos denominados borderline caracterizados por uma resistência parcial a PQT, podendo estar mais próximo do polo TT. A histopatologia para esse subgrupo é muito semelhante à do pólo de origem, porém apresenta-se com múltiplas lesões generalizadas e baciloscopia positiva. O subgrupo próximo ao pólo VV apresenta características histopatológicas semelhantes ao pólo de origem, granulomas formados por macrófagos indiferenciados, com muitos linfócitos e baciloscopia rica em bacilos. O subgrupo intermediário, denominado borderline-borderline, é o mais instável, possui nas lesões granulomas frouxos, com células epitelióides pouco diferenciadas, escassos linfócitos e baciloscopia rica em bacilos (Barreto, 2005).

O estudo da hanseníase é um modelo experimental muito atraente para a investigação da resposta imunológica frente à infecção de caráter espectral e resposta imune em pólos opostos e bem definidos (Modlin, 2010; Mendonça et al., 2008).

A resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro é um fator decisivo para a determinação da forma clínica, e essa resposta está principalmente relacionada a múltiplas interações e fatores solúveis como a ação de citocinas (Costa et al., 2008).

Na resposta imune inata efetiva, caracterizada por ser inespecífica, a resistência do hospedeiro associada à baixa virulência do *M. leprae* inicia o processo da infecção (Mendonça et al., 2008). O reconhecimento do *Mycobacterium* através de receptores e apresentação antigênica inicia uma resposta imune específica, onde os linfócitos T diferenciam-se em Th1 havendo degradação do parasito pela produção e ação de citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF, levando a eliminação do bacilo que é refletida em poucas lesões de pele e nervos. Após o reconhecimento antigênico, na incapacidade de impedir a proliferação do bacilo, são geradas múltiplas lesões na pele e nervos, pela diferenciação do linfócito T em Th2 e ação da citocina IL-4 (Mendonça et al., 2008).

### IV.1.3 SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS

Os monócitos são um tipo de célula sanguínea circulante derivada da medula óssea, precursora dos macrófagos teciduais ou células dendríticas. Esses são recrutados para locais de inflamação, onde se diferenciam em macrófagos e células dendríticas. Os monócitos circulantes têm importante papel na resposta inflamatória, sendo essencial para a resposta imune frente a patógenos, bactérias, fungos, parasitas e vírus (Auffray et al., 2009; Cros et al., 2010). Antigamente os monócitos eram subdivididos em duas sub-populações, de monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) e pró-inflamatórios atualmente conhecidos como não-clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (Passlick et al., 1989).

Recentemente, com a descoberta de uma terceira sub-população de monócitos, a qual possui uma expressão intermediária de CD14 e CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), foi proposta uma nova classificação dos monócitos em clássicos, intermediários e não-clássicos (Zeigler-Heitbrock et al., 2010). A classificação das sub-populações de monócitos foi recomendada por Zeigler-Heitbrock com a utilização dos anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 (Zeigler-Heitbrock, 2000). A mais frequente população existente dentre as 3 classificadas são os monócitos clássicos com fenótipo CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (Passlick et al., 1989; Zeigler-Heitbrock, 2000; Moniuszko et al., 2009;) que representam em média 85% dos monócitos. Através de estímulos como LPS, os monócitos clássicos são capazes de produzir citocinas e quimiocinas como IL-6, IL-8, CCL2 e CCL3 em altos níveis e IL-10 de forma moderada (Cros et al., 2010). De maneira contrastante as sub-populações de monócitos CD16<sup>+</sup>, intermediários e não-clássicos, possuem uma frequência média de 5%, podendo variar de 5-15% (Zeigler-Heitbrock, 2000). Através de estímulos como LPS, os monócitos intermediários, são capazes de produzir citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF e IL-10 (Cros et al., 2010; Zawada et al., 2011). Devido à expressão de genes que codificam moléculas de MHC II e genes envolvidos no processamento de antígenos, os monócitos intermediários são bons apresentadores de antígenos (Zawada et al., 2010). TNF é uma citocina capaz de regular a resposta imune por ativação, migração, proliferação e expressão de receptores por outras células. Em uma comparação entre as sub-populações de monócitos estimulados com LPS avaliando o poder da produção de TNF, foi observado que os monócitos CD16<sup>+</sup> são os maiores produtores de TNF quando comparados com os monócitos clássicos

(Belge et al., 2002). Por último e não menos importante, estão os monócitos não-clássicos com fenótipo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, são considerados mais maduros por possuir maior expressão de CD16, molécula muito expressa em macrófagos, além disso, esta sub-população produz citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de células para o local da inflamação (Zawada et al., 2010; Zeigler-Heitbrock et al., 2010). Os monócitos CD14<sup>dim</sup> ou CD14<sup>+</sup> são tipos celulares geneticamente distintos de células NK (Cros et al., 2010). Os monócitos CD16<sup>+</sup> (intermediários e não-clássicos) são considerados potentes indutores da inflamação, devido a uma menor habilidade de produção de IL-10 (Aguilar-Ruiz et al., 2011).

O poder fagocítico de sub-populações que possuem fenótipo CD16 positivo ou negativo, foi determinado, sendo que CD16<sup>-</sup> possui maior poder de fagocitose e de maneira oposta, as sub-populações com fenótipo CD16<sup>+</sup> possuem menor poder de fagocitose (Zawada et al., 2011), sendo estes considerados potentes indutores da inflamação. Vale ressaltar que as sub-populações que possuem o fenótipo CD16<sup>+</sup> são os monócitos intermediários e os não-clássicos (Aguilar-Ruiz et al., 2011).

Poucos estudos foram realizados para avaliar o papel dos monócitos em pacientes com hanseníase. Dados da literatura mostram alguns estudos que avaliaram células dendríticas, macrófagos e monócitos em indivíduos saudáveis estimulados com antígeno específico de *M. leprae*. Murray e colaboradores (2007) observaram *in-vitro*, que a exposição ao antígeno não é capaz de induzir a maturação e ativação de células dendríticas. Hashimoto e colaboradores (2002) descrevem que nas fases iniciais da infecção o *M. leprae* permanece resistente a imunidade de células T mediadas por células dendríticas. Em outros estudos, foi observado que ao estimular culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos saudáveis o antígeno do *M. leprae* é capaz de ativar de maneira pobre os macrófagos e células dendríticas (Sinsimer et al., 2010; Manca et al., 2012).

Nesse estudo em que monócitos de indivíduos saudáveis foram estimulados com antígeno de *M. leprae*, foi possível concluir que o PGL-1 (glicolípido Fenólico-1) é capaz de modular a indução da produção de citocinas e quimiocinas por monócitos como um primeiro estímulo e, como um segundo estímulo é capaz de inibir a produção de outras citocinas e quimiocinas, tendo um importante papel no

desenvolvimento das variadas formas clínicas da doença (Manca et al., 2012). Desta maneira faz-se necessário realizar pesquisas como a do presente estudo para elucidar o papel das sub-populações de monócitos em pacientes com hanseníase nas diversas formas clínicas comparando com indivíduos saudáveis.

#### IV.1.4 MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS

As moléculas CD80 e CD86 são as moléculas co-estimulatórias mais bem caracterizadas que estão expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) e participam na modulação da resposta imune por linfócitos T tanto na indução como na manutenção da tolerância (Migliori, 2010), se ligando ao receptor específico CTLA-4 ou CD28. Estas também são importantes para realizar a função de um segundo sinal desencadeando a ativação ou bloqueio das vias de apresentação antigênica de uma célula T a uma célula apresentadora de antígeno. O MHC (complexo de histocompatibilidade principal) é uma molécula necessária para a ativação de células T desencadeada por uma resposta a antígenos (Santos et al., 2001; Santos et al., 2006).

Moléculas como CD80 (B7-1), CD40, CD86 (B7-2) e MHC II são essenciais para que ocorra a cascata de ativação de células T. Células dendríticas, células B e macrófagos ativados expressam em sua superfície a molécula CD80, que possui função de co-estimulação para ativação ou desativação de linfócitos T através dos seus ligantes CD28 e CD152 (CTLA-4) (Santos et al., 2006).

As moléculas B7 expressas em células de pacientes MB antes, durante e após episódios reacionais, podem servir como preditor de ocorrência para quadros reacionais. Os autores encontraram que B7 pode estar aumentada em quadros reacionais e que exista uma relação entre a presença de células B7+ em locais de infecção e da imunidade eficaz *in vivo* para o *M. leprae* (Santos et al., 2006).

Ambas as moléculas CD80 e CD86 possuem funções semelhantes, mas apresentam cada uma suas características próprias, quando relacionadas à expressão nas APCs, pela afinidade a receptores CD28 e CTLA-4. Dados revelam que CD80 possui uma maior avidéz de se ligar aos receptores quando comparada a

molécula CD86 e que após a ligação de CD80 a uma indução da ligação de CD86 aos receptores, tendo maior afinidade pelo receptor CTLA-4 (Migliori, 2010).

A molécula CD40 é outra molécula co-estimulatória expressa na superfície de células B, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. Sua função está relacionada à participação na ativação e maturação de células B dependente de células T e na ativação de macrófagos, células dendríticas e células endoteliais (Souza, 2007; Yamauchi et al., 2000).

Em um estudo que avaliou a expressão de moléculas como MHC II e CD86 na superfície de monócitos que derivaram células dendríticas, infectados com *M. leprae*, conclui que a molécula MHC II promove um aumento na regulação após a infecção e o CD86 promove uma baixa regulação após a infecção (Hashimoto et al., 2002). Importante ressaltar que o *M. leprae* é o único patógeno resistente a células dendríticas na fase inicial da infecção (Hashimoto et al., 2002).

Devido ao importante papel na ativação celular, as moléculas co-estimulatórias são necessárias para compreender a resposta imune na hanseníase. Estudos tendo como objetivo o papel das moléculas CD80 e CD86 foram realizados com pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis estimulados em cultura com antígenos de *M. leprae* (Santos et al., 2001; Sridevi et al., 2004).

É necessário o desenvolvimento de estudos que avaliem a expressão de moléculas co-estimulatórias nas sub-populações de monócitos para identificar o grau de ativação celular dos monócitos nas variadas formas clínicas de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis.

## V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### V.1 PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS

O presente estudo selecionou a amostra por conveniência, todos os casos novos diagnosticados com hanseníase, sem tratamento que estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão foram incluídos no estudo. Foram selecionados 22 pacientes com a forma PB e 12 pacientes com a forma MB foram incluídos no presente estudo. Foi realizada uma análise pareada com a coleta sendo feita no dia 0 e repetida na metade do tratamento, sendo dia 90 para pacientes com a forma PB e dia 180 para pacientes com a forma MB. Os pacientes candidatos para a realização do estudo foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão no ambulatório de dermatologia do Magalhães Neto e para complementar a amostra foram inseridos no estudo 2 pacientes do Hospital Dom Rodrigo de Menezes e esses também foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão. Para a confirmação do diagnóstico foram preconizadas as orientações do Ministério da Saúde, onde é realizada uma avaliação clínica, teste de sensibilidade, exame de baciloscopia e a biópsia aspirativa de uma das lesões dos pacientes para confirmação da forma clínica da doença. Para o grupo controle composto por indivíduos sadio, foi coletado 20 ml de sangue periférico de indivíduos com idades entre 18 a 65 anos que se disponibilizaram a participar do estudo. Estes indivíduos não apresentavam infecção pelo o bacilo do *M. leprae* e apresentam sorologia negativa para HIV, HTLV-1, HCV ou HBV além de não serem contatos de pacientes com hanseníase.

#### *V.1.1 AMBULATÓRIO MAGALHÃES NETO E HOSPITAL DOM RODRIGO DE MENEZES*

Este trabalho foi desenvolvido no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – Ambulatório Magalhães Neto. Este ambulatório atende cerca de 60 pacientes com hanseníase por mês, estando em funcionamento desde o ano de 1992, sendo referência no estado da Bahia para o tratamento de episódios reacionais.

Para complementar a amostra foi necessária coleta de dados e de material de pacientes no Hospital Dom Rodrigo de Menezes, citado como centro de referência para o atendimento de doenças dermatológicas.

#### V.1.2 PACIENTES PAUCIBACILARES:

São indivíduos diagnosticados com hanseníase, que são caracterizados por uma ou mais regiões hipopigmentadas da pele e regiões com perda de sensibilidade devido ao dano de nervos periféricos que foram acometidos. Esses pacientes apresentam resposta imune Th1, com altos níveis de TNF e IFN- $\gamma$  (Manca *et al.*, 2012).

#### V.1.3 PACIENTES MULTIBACILARES:

São indivíduos diagnosticados com hanseníase e que se caracterizam por lesões nodulares ou placas simétricas na pele, derme espessa e frequente envolvimento da mucosa nasal resultando em congestão nasal e sangramento nasal, mas tipicamente a detecção da destruição do nervo é tardia (Manca *et al.*, 2012). Estes pacientes apresentam resposta Th2 (Modlin, 2010) e esta resposta é caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (Mendonça *et al.*, 2008).

#### V.1.4 INDIVÍDUOS SADIOS:

Indivíduos saudáveis, não infectados pelo bacilo do *M. leprae* e com sorologia negativa para HIV, HTLV-1, HCV ou HBV.

## V.2 GRAU DE INCAPACIDADE FUNCIONAL

O grau de incapacidade funcional foi avaliado através do protocolo indicado pelo Ministério da Saúde/Organização Mundial da Saúde onde avalia o grau de incapacidade em uma escala que varia entre zero a dois. Esta avaliação foi realizada por um fisioterapeuta habilitado para executar o teste. A escala com os graus para a avaliação do grau de incapacidade funcional está demonstrada na tabela 1.

## V.3 MARCAÇÃO PARA CITOMETRIA DE FLUXO

### V.3.1 EXPERIMENTO EX-VIVO

Após a coleta do sangue periférico heparinizado foi 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 0,9% de NaCl, 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 de 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.

**Tabela 1:** Definição dos graus de incapacidade funcional para pacientes com hanseníase de acordo com OMS.

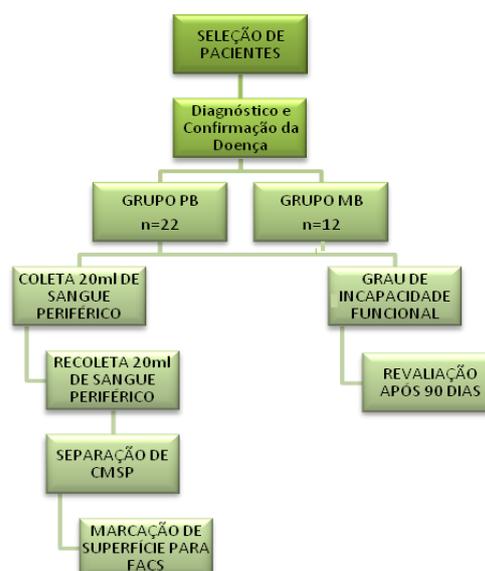
GRAU	CARACTERISTICAS
0	Nenhum problema com olhos, mãos e pés devido à hanseníase.
I	Diminuição ou perda da sensibilidade nos olhos. Diminuição ou perda da sensibilidade nas mãos e/ou pés (não sente 3g ou toque da caneta)
II	Olhos: lagoftalmo e /ou ectrópio; triquíase; opacidade corneana central; acuidade visual menor que 0,1 ou não conta os dedos a 6m. Mãos: lesões tróficas e/ou lesões traumáticas; garra; reabsorção; mão caída. Pés: lesões tróficas e/ou traumáticas; garras; reabsorção; pé caído; contratura de tornozelo.

FONTE: Ministério da Saúde – 2010.

#### V.4 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal com inquéritos repetidos.

##### V.4.1 FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO ESTUDO



**FIGURA 1.** Fluxograma do estudo.

## V.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes diagnosticados de acordo com o espectro clínico de hanseníase que ainda não iniciaram o tratamento com a PQT nos centros de tratamento referenciado e que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

## V.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não foram incluídos no estudo:

- Os pacientes em uso de corticosteroides.
- Mulheres grávidas.
- Pacientes com co-infecção por HIV, HTLV-1, HCV ou HBV.
- Pacientes menores de 18 anos ou com mais de 65 anos.
- Pacientes com quadros de reações hansênicas.

## V.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizadas para análise estatística pareada as análises dos dados obtidos entre os dias 0 e 90 para o grupo PB e entre os dias 0 e 180 para o grupo MB o teste não-paramétrico de Wilcoxon Matched Pairs Test. Para as análises entre as sub-populações de monócitos foi utilizado ANOVA Kruskal-wallis Test e Post Test Dunn. Para análise das variáveis frequência e MFI de monócitos dos grupos PB e MB nas análises pareadas, avaliando a expressão de CD40 e CD80 foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-whitney. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## V.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os pacientes e indivíduos participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido que foi aprovado pelo CEP/CONEP do Hospital Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia. Para a coleta no Hospital Dom Rodrigo de Menezes foi aprovado um adendo do projeto acima citado do CEP/CONEP sob parecer nº 50/2010. O projeto está de acordo com a lei 196/96 que confere ao indivíduo a não maleficência e a beneficência, não inferindo a dignidade do indivíduo. Este estudo foi financiado pelo INCT-DT processo nº 573839/2008-5.

**ARTIGO**

"Downregulation of CD86 expression in monocytes from paucibacillary leprosy patients". [artigo a ser submetido Scandinavian Journal of Immunology, *vide* Normas de Publicação no **ANEXO XIII.5**]

## VI. ARTIGO

### **Downregulation of CD86 expression in monocytes from paucibacillary leprosy patients**

Bergheme G<sup>\*</sup>; Passos S<sup>\*#</sup>; Campos T<sup>\*</sup>; Shibuya M<sup>\*</sup>; Carvalho, EM<sup>\*#</sup>; Machado PRL<sup>\*#</sup> and Carvalho, LP<sup>\*#£</sup>

<sup>\*</sup>Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua João das Botas, s/n, Salvador, BA, Brazil.

<sup>#</sup>INCT-DT (National Institute of Science and Technology-Tropical Diseases)

<sup>£</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

#### **Corresponding author:**

Lucas Pedreira de Carvalho, PhD  
Rua João das Botas, s/n, 5<sup>o</sup> andar  
CEP – Salvador-BA – Brazil  
E-mail: carvalholp@ig.com.br  
Phone number: 55 71 3237-7353

## Abstract

Leprosy is a chronic granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*, which has tropism for skin and peripheral nerves. While patients with multibacillary (MB) disease do not mount a Th1 response, thus facilitating the multiplication of Mycobacterium, individuals with paucibacillary (PB) produce IFN-gamma in response to antigens of *M. leprae*. Little attention has been given to the role of monocytes in different clinical forms of leprosy. Circulating monocytes population is known to be heterogeneous and according to CD14 and CD16 expression they are divided in classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). The degree of activation of these cells is associated with the intensity of T lymphocytes response. Here we determined the degree of activation of subsets of monocytes in leprosy patients before and during treatment. The phenotypic characterization and the degree of activation of monocytes was determined by flow cytometry. Patients with multibacillary showed the frequency of non-classical monocytes increased. There was no difference in the expression of CD80 and MHC II between monocytes from patients with paucibacillary and multibacillary leprosy. However, monocytes of patients with paucibacillary showed a low expression of CD86 before starting the treatment, which was restored during treatment. Most patients had zero degree of functional disability. Patients with leprosy have paucibacillary a decreased level of expression of costimulatory molecule CD86 which is restored during treatment with MDT. All patients showed no change in the degree of functional disability due to leprosy.

Keywords: Leprosy, monocytes and costimulatory molecules.

## Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and endemic in Brazil. It is a disease characterized by spectral clinical forms and immune response [1]. The immune response induced by infection with *M. leprae* is associated with the clinical phenotype developed by the patient. Individuals with the tuberculoid form of the disease develop Th1 immune response whereas the lepromatous form of leprosy is associated with Th2 response [2].

Monocytes are circulating blood cells derived from bone marrow and is the precursor tissue macrophages. They are recruited to sites of inflammation, where they differentiate into macrophages [3,4]. Monocytes are sorted into subpopulations according to the expression of the molecules CD14 and CD16. There are three subpopulations, termed monocyte classical with expression of CD14 + + CD16-, monocytes intermediate, CD14 + + CD16 + cells and monocytes non-classical CD14 + CD16 + + [5,6]. Physiotherapy which is embedded in a multidisciplinary team, has an important role in the treatment of leprosy patients, through instruments such as periodic assessments, guidance on self-care, exercise prescription and early prevention of deformities, avoiding degrees of disability functional [7,8]. The evaluation of parameters such as degree of disability with functional experimental studies, allows the search for biomarkers and may have relation with the degree of disability in the different clinical forms against infection with *M. leprae* [9]. Therefore, the overall objective of this study was to determine the frequency and degree of activation of subpopulations of monocytes in leprosy patients before and during treatment and evaluating the degree of functional incapacity.

## Materials and methods

This study was selected a convenience sample with all new cases diagnosed with leprosy in the dermatology clinic in Ambulatório Magalhães Neto and 2 patients in the Hospital Dom Rodrigo de Menezes, who were without treatment according to the inclusion and exclusion criteria in the study. We selected 22 patients with the PB (paucibacillary) and 12 patients with the MB (multibacillary). The analysis paired with the collection being made on day 0 and repeated on half of the treatment, and 90 days for patients with the PB and 180 days for patients with the MB. The degree of disability was assessed using the protocol set by the World Health Organization which assesses the degree of disability on a scale ranging from zero to two, where the degree zero patients have no degree of functional disability due to leprosy and the patient has degree two sequels due to the presence of leprosy. This assessment was performed by a physiotherapist enabled to run the test. After collecting 20 ml of heparinized peripheral blood was initiated protocol separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were isolated by concentration gradient with Fycoll-Hypaque. After the process of three washes with 0.9% NaCl, PBMC were resuspended in culture with RPMI-1640 medium supplemented with 10% inactivated FCS, HEPES and gentamycin 100 IU / ml. PBMC were stained *ex-vivo* with the following antibodies for determining subpopulations of monocytes: anti-CD14 - / APC anti-CD16 - PE and anti-MHC II antibodies - FITC / anti CD80 - FITC / anti CD40 - PE / anti-CD86 - PerCP-Cy5.5 to assess the degree of cellular activation. After tagging protocol *ex-vivo* cells were acquired on BD cytometer CANTO II. We used for statistical analysis of paired data obtained between days 0 and 90 for the PB group and between days 0 and 180 MB for the group the nonparametric Wilcoxon Matched

Pairs Test. For analysis between subpopulations of monocytes were used ANOVA and Kruskal-Wallis Test and Post Test Dunn. To analyze the variables frequency and MFI of monocytes from PB and MB groups in the paired analyzes, evaluating the expression of CD40 and CD80 was used the nonparametric Mann-Whitney. Was considered statistically significant  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

The study sample consisted of 8 healthy subjects, 22 patients with paucibacillary and 12 patients with multibacillary. The healthy subjects had a mean age of 29 years, 50% female. Patients with paucibacillary had a mean age of 42 years, and 27% were male (Table 1). The average bacillary index was 0 (zero) and time of MDT was 6 months. Clinical forms presented in this group of patients was indeterminate (I) with 11 patients, tuberculoid (TT) and 8 patients with borderline-tuberculoid (BT) in 3 patients (data not shown). The group of patients with multibacillary composed of 12 patients had a mean age of 42 years, 83% male. The bacillary index medium has two, ranging from 0 to 6. The MDT time was 12 months. Clinical forms in the clinical spectrum were composed of 7 patients lepromatous (LL), 3 lepromatous patients borderline (BL) and 3 patients borderline-borderline (BB) (data not shown), (Table 1).

Functional disability is classified as a sequel to the most serious affecting leprosy patients. To evaluate and monitor the evaluated of patients diagnosed, it is necessary to conduct a detailed evaluation that includes analysis of muscle strength in the hands and feet, the sensitivity of the hands and feet and the presence or absence of changes in the nerves most affected lower limb and upper limbs. The results in the groups of patients with the PB and MB leprosy in a paired analysis before diagnosis and during treatment with MDT for disability are shown in Figure 1.

Figure 2 shows the frequency monocytes of patients with clinical forms PB and MB, and healthy subjects according to CD14 expression. No difference in the frequency of circulating monocytes from patients and healthy subjects, both keeping the median below 5%.

Data in the literature show that the population of monocytes classical is the most frequent peripheral blood, followed by intermediate and non-classical. Here we compare the frequency of these subpopulations of monocytes from patients with paucibacillary and multibacillary forms, with those of healthy individuals. It was observed that the population of monocytes were more frequent in the classical three study groups. However, the subpopulation of non-classical monocytes of patients with the MB, were in a higher frequency compared to the frequency of this subpopulation in the other groups (Figure 3).

To determine the degree of activation of monocytes, we analyzed the expression of MHC class II (Figure 4A) and CD86 (Figure 4B). It was observed that monocytes and intermediates of classical patients with the PB expressing CD86 less than that of patients with MB.

The next step was to evaluate whether there were changes in the profile of the frequency subpopulations of monocytes from patients with clinical forms of leprosy PB and MB before and during treatment. For this, we analyzed paired and found that there were no differences in the frequencies of monocytes from patients with the PB and MB (data not shown) before and during treatment (Figure 5A). As seen a decreased expression of CD86 on monocytes and intermediate non-classical the PB patients, we evaluated the expression of this molecule on paired samples after treatment in order to identify a possible restoration of expression of this molecule

influenced by the treatment. As expected the expression of CD86 was recovered after treatment. In contrast, no significant differences in the expression of MHC class II before and during treatment (Figure 5 B and C).

It was found in this study that 95% of patients with both clinical forms showed grade 0 of disability. The immunological evaluation showed that PB has decreased expression of CD86, when compared to healthy individuals, which is restored after treatment. Clinical forms of individuals infected with *M. leprae* are associated with the immune response developed by the host. While patients with paucibacillary develop Th1 response with high levels of IFN-gamma in patients with multibacillary mount Th2 response which favors the growth of Mycobacterium. The activation of monocytes is associated with increased Th1 response and destruction of intracellular microbes. The present study included patients with both forms of the disease in its early stages, and aimed to assess the degree of functional disability in patients with multibacillary and paucibacillary forms and determine the degree of activation of subpopulations of circulating monocytes. The guidance on self-care is very important for patients with leprosy, they are educated about hydration, cleanliness and type of shoes, it is possible to avoid the appearance of nerve lesions and worsening of pre-existing injuries always associated with measuring recommended [10]. We noticed that the patients included in this study had no worsening of the degree of incapacity keeping about 95% of patients in grade 0 in the evaluation of disability that occurred during treatment, patients in both PB and MB patients.

Another objective of the study was to evaluate the degree of activation of monocytes from patients with the PB and MB leprosy. For this we assessed the expression of MHC II and costimulatory molecules on these cells. The activation of these cells is required for the development of cellular immune response and deletion of *M. leprae*. First evaluated the frequency of peripheral blood monocyte, with no difference between patients and healthy subjects, all showing frequency below 5%. Recently it was described that the population of monocytes is heterogeneous according to expression of CD14 and CD16 [5,6]. As expected, this study showed that the subpopulation is the most frequent of classical monocytes in all groups studied. However, patients with the MB had a higher frequency of the subpopulation of non-classical monocytes compared to healthy individuals and patients PB. The presence of pro-inflammatory cytokines such as TNF and GM-CSF can enhance expression of CD16 in monocytes. Thus, future studies should be conducted to determine not only the factors that contribute to the differentiation of these cells, as well as the role of these cells in the immune response against *M. leprae*. Although the expression of MHC class II in the present study was not different between healthy individuals and leprosy patients, the expression of CD86 was lower in PB patients. This data was different than I expected, since patients with the PB have increased Th1 response. A possible explanation for this phenomenon is that the presence of circulating soluble factors may be modulating the expression of CD86 in these patients. The monocyte population evaluated in this study were not infected, and data published by our group support this hypothesis, where infected cells are able to activate uninfected cells through the secretion of cytokines [11]. Are conflicting data in the literature regarding the association of the CD86 molecule with Th1 or Th2. While some authors to an associated CD86 differentiation to Th2 pole [12-17], other studies in diseases such as asthma, contrary to reports that the CD86 molecule is associated to the pole Th1 immune response [18].

The present study showed that the three subpopulations of monocytes, classical and non-classical intermediate, showed a decrease of CD86, which was

restored after 90 days of treatment with MDT in the group of patients with the PB. Future studies should be conducted to determine the molecules in *M. leprae* and the host soluble factors involved in this mechanism. Patients with leprosy form PB show a decrease in the level of expression of costimulatory molecule CD86 which is restored during treatment with MDT. Most patients in both clinical forms showed grade 0 corresponding to functional disability evaluation stratified, showing that patients are being diagnosed early and evolving without sequel e during treatment.

## References

1. Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismo de resposta imune às infecções. *An Bras de Dermatol* 2004;79: 647-64.
2. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2010;22:48–54.
3. Auffray C, Seiweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:669-92.
4. Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 2010;33:375-86.
5. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:74-80.
6. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocytes subset. *Blood* 2011;118:50-61.
7. Gabino JA, Nery JA, Virmond M, Stump PRN, Baccarelli R, Marques JRW. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento da Neuropatia. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2003.
8. Raposo MT, Caminha AVQ, Heukelbach J, Sánchez-González MA, Medeiros JLA, Nemes MIB. Assessment of physical impairments in leprosy patients: a comparison between the world health organization (WHO) disability grade and the eye-hand-foot score. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2011;53:77-81.
9. Khambati FA, Shetty VP, Ghate SD, Capadia GD. Sensitivity and specificity of nerve palpation, monofilament testing and voluntary muscle testing in detecting peripheral nerve abnormality, using nerve conduction studies as gold standard: a study in 357 patients. *Lepr Rev* 2009;80:34-50.
10. Rodini FC, Gonçalves M, Barros AR, Mazzer N, Elui VM, Fonseca MC. Prevenção de incapacidades na hanseníase com apoio em um manual de autocuidados para pacientes. *Fisioter Pesq* 2010;17:157-66.
11. Carvalho LP, Pearce EJ, Scott P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania brasiliensis*: infected cells produce high levels of TNF- $\alpha$ , whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell response. *J Immunol* 2008;181:6473-80.

12. Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin Exp Dermatol* 2006;32:75-80.
13. Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) coestimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* 2001;78:15-24.
14. Migliori IK. Uso de RNA de interferência para modulação das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em células dendríticas. Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2010.
15. van Rijt LS, Vos N, Willart M, et al. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of Th2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:166-73.
16. Tsuyuki BS, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med* 1997;185:1671-9.
17. Schlienger K, Downey J, Smith A, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 1998;313:1972-75.
18. Balkhi MY, Latchumanan VK, Singh B, Sharma P, Natarajan K. Cross-regulation of CD86 by CD80 differentially regulates T helper responses from Mycobacterium tuberculosis secretory antigen-activated dendritic cell subsets. *J Leukoc Biol* 2004;75:874-83.

**Table 1.** Epidemiological and demographic characteristics of patients and controls included in the study.

Group	N	Age	Sex	Bacillary Index	MDT
		Av (min-max)	n (%)	md (min-max)	Months
<b>HS</b>	8	29 (21-40)	4 (F - 50)	NA	NA
<b>PB</b>	22	42 (18-65)	16 (F - 73)	0	6
<b>MB</b>	12	42 (24-60)	2 (F - 17)	2 (0-5)	12

PB – paucibacillary      MDT – polychemotherapy      MB – multibacillary  
 Av– average              n – number of sample      HS – healthy subjetscs  
 NA – not applicable

## Figure Legend

**Figure 1. Degree of Functional Disability.** Data on the degree of functional disability in patients with clinical forms paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) leprosy that were included in the study of functional analysis. The degree: it's not changes in the feet, hands and eyes. Grade 1: presence of alterations of sensation in the feet, hands and / or eyes. Grade 2: presence of changes in sensitivity and foot injuries, hands and / or eyes. PB n=21 and MB n=10 before treatment and PB n=14 and n=3 MB during treatment.

**Figure 2. Frequency of CD14 + monocytes in patients prior to treatment and healthy individuals.** Frequency of monocytes in patients with shapes PB (n = 22), MB (n = 12) before treatment (Day 0) and HS (n = 8). The results are represented with maximum values and the measure of central tendency is the median. ANOVA non-parametric test Kruskal-Wallis and Dunn post-test was used to analyze differences between groups,  $p < 0.05$ .

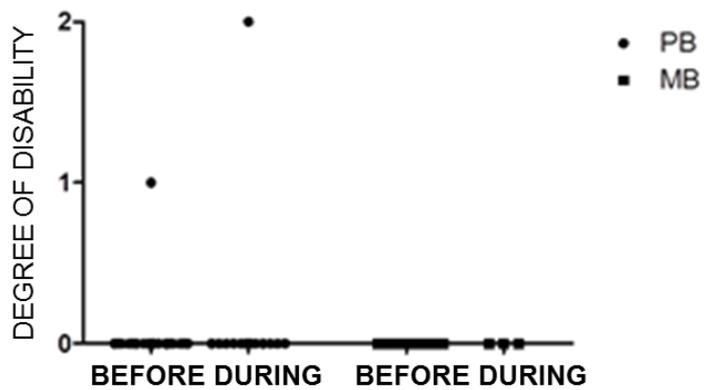
**Figure 3. Frequency of monocytes in uninfected controls and in leprosy patients with paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) forms of disease.** (A) Plot representing the monocyte population with the delimitation of the gate strategy according to the size (FSC) and granularity (SSC). (B) Subpopulations of monocytes according to the expression of CD14 and CD16. (C) Frequency of monocyte subpopulations in health subjects PB and MB patients before treatment \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.005$  are statistically significant.

**Figure 4. Monocytes from leprosy patients have decreased expression of CD86.** PBMC were obtained from PB (n = 22), MB (n = 12) patients and healthy subjects (n = 8) and *ex-vivo* labeling was performed with CD86, CD14 and CD16. (A) MFI (mean fluorescence intensity) of MHC II in subpopulation of monocytes. (B) MFI of CD86 in subpopulation of monocytes, \*  $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.005$  are statistically significant.

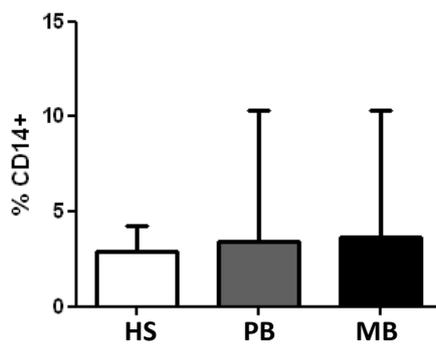
**Figure 5. Expression of CD86 in monocytes from PB patients is restored during treatment.** PBMC were obtained from PB (n = 14) patients before and during treatment and *ex-vivo* labeling with CD86, CD14 and CD16 was performed. (A) Frequency of subpopulations of monocytes before (day 0) and during (day 90) treatment. (B) MHC II expression in subpopulation of monocytes during treatment. (C) CD86 expression in subpopulation of monocytes during treatment \*  $p < 0.05$  is statistically significant.

# Figures

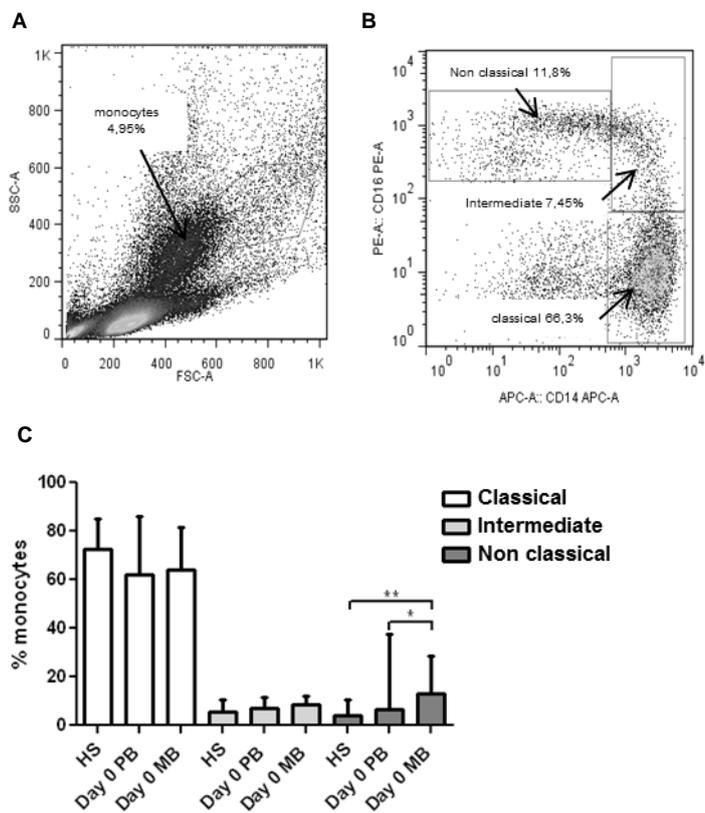
## Figure 1



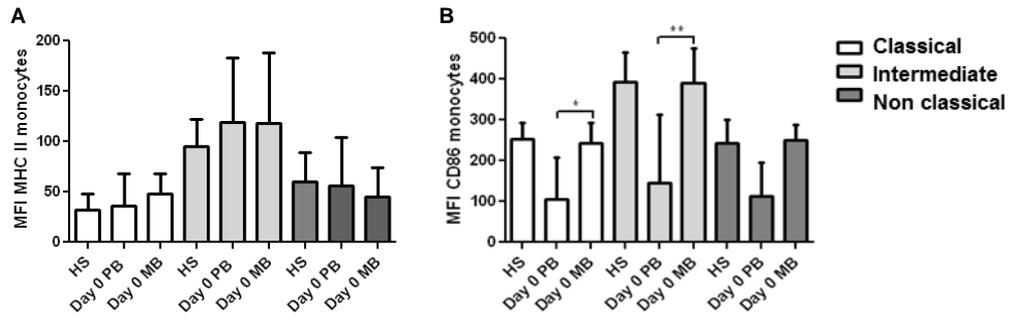
## Figure 2



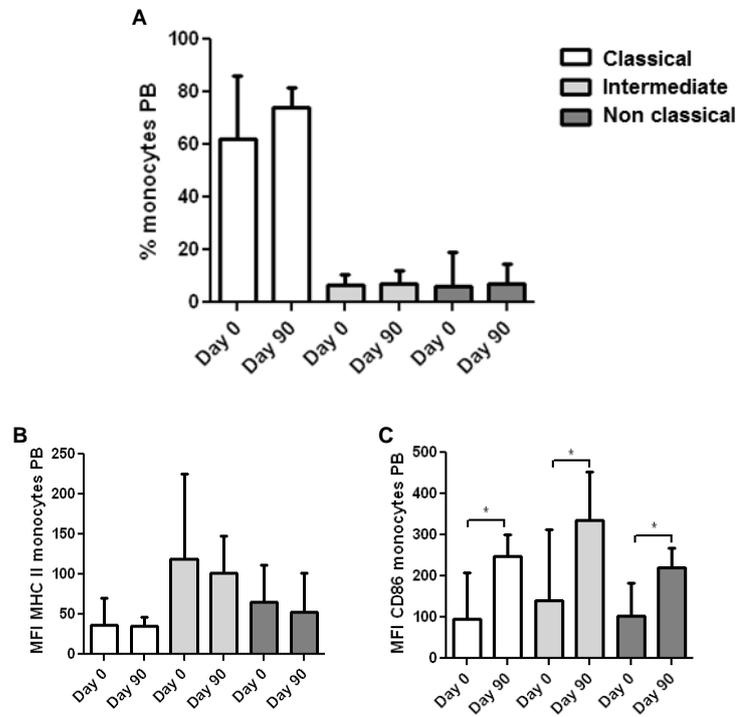
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



## VII. RESULTADOS GERAIS

### VII.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS

A amostra do presente estudo foi composta por 8 indivíduos sadios, 22 pacientes com a forma paucibacilar e 12 pacientes com a forma multibacilar. Os indivíduos sadios apresentaram média de idade de 29 anos, sendo 50% do sexo feminino. Os pacientes com a forma paucibacilar tiveram média de idade de 42 anos, sendo 27% do sexo masculino (tabela 2). A média do índice bacilar foi 0 (zero) e o tempo da PQT foi de 6 meses. As formas clínicas apresentadas nesse grupo de paciente foi indeterminada (I) com 11 pacientes, tuberculóide (TT) com 8 pacientes e borderline-tuberculóide (BT) com 3 pacientes. O grupo de pacientes com a forma multibacilar composto por 12 pacientes, apresentou média de idade de 42 anos, sendo 83% do sexo masculino. O índice bacilar médio foi 2, variando de 0 a 6. O tempo de PQT foi de 12 meses. As formas clínicas neste espectro clínico foram compostas por sete pacientes lepromatosos (LL), três pacientes borderline-lepromatoso (BL) e três pacientes borderline-borderline (BB) (Tabela 2).

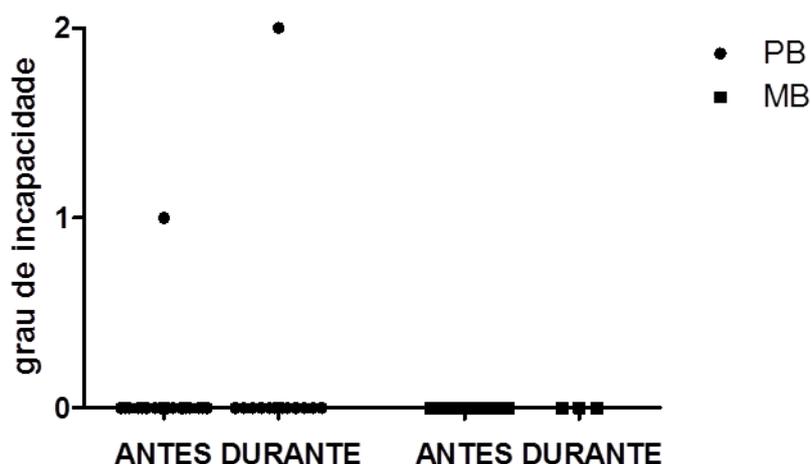
**Tabela 2:** Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes e indivíduos sadios incluídos no estudo.

Grupo	N	Idade md (min-max)	Sexo n (%)	Índice Bacilar md (min-max)	PQT Meses	FC					
						I	TT	BT	BB	BL	LL
IS	8	29 (21-40)	4 (F - 50) 4 (M - 50)	NA	NA						
PB	22	42 (18-65)	16 (F - 73) 6 (M - 27)	0	6	11	8	3			
MB	12	42 (24-60)	2 (F - 17) 10 (M - 83)	2 (0-5)	12				3	3	7

PB – paucibacilar; PQT – poliquimioterapia; MB – multibacilar; I – Indeterminada; md – Média; TT – Tuberculóide; BT – Borderline Tuberculóide; BB – Borderline-Borderline; BL – Borderline-Lepromatoso; LL – Lepromatoso-Lepromatoso; n – número da amostra; IS – Indivíduos Sadios; NA – não se aplica; M – masculino; F – feminino e FC – Forma Clínica

## VII.2 GRAU DE INCAPACIDADE FUNCIONAL

A incapacidade funcional é a seqüela classificada como uma das mais graves que acomete pacientes com hanseníase. Para avaliar e acompanhar a evoluções dos pacientes diagnosticados, é necessário realizar uma avaliação detalhada que contempla a análise da força muscular das mãos e pés, a sensibilidade das mão e pés e a presença ou ausência de alterações nos nervos mais acometidos nos membros inferiores (MMII) e nos membros superiores (MMSS). Os resultados encontrados nos grupos de pacientes com as formas PB e MB da hanseníase em uma análise pareada, antes do diagnóstico e durante o tratamento com a PQT para a incapacidade funcional estão demonstrados abaixo.



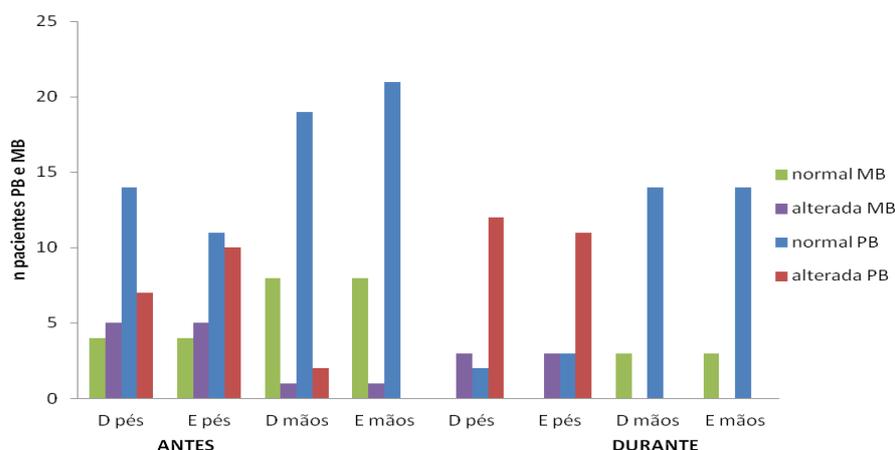
**FIGURA 2.** GRAU DE INCAPACIDADE FUNCIONAL. Dados do grau de incapacidade funcional de pacientes com as formas clínicas paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) da hanseníase que foram incluídos no estudo da análise funcional. Grau 0: não possui alterações nos pés, mãos e olhos. Grau 1: presença de alterações de sensibilidade nos pés, mãos e/ou olhos. Grau 2: presença de alterações de sensibilidade e lesões nos pés, mãos e/ou olhos. Pacientes PB<sub>1</sub> n=21 e MB<sub>1</sub> n=10, antes do tratamento e PB<sub>2</sub> n=14 e MB<sub>2</sub> n=3, durante o tratamento.

A análise do grau de incapacidade funcional causado pela hanseníase é importante para verificar o perfil dos pacientes e a evolução clínica desses. Os dados do presente estudo não mostraram diferença entre o grau de incapacidade funcional dos pacientes PB e MB antes e durante o tratamento.

O grau de incapacidade funcional é uma classificação ampla do quadro clínico dos pacientes e considera somente alterações mais graves como a presença de um grau 1, que é definido com a alteração de sensibilidade onde o pacientes não sente

o monofilamento vermelho que possui uma gramatura de 4,0g desencadeando a perda da sensação protetora para a mão e pés, tornando o paciente vulnerável a lesões e impossibilidade de discriminar sensações térmicas como o quente e o frio. Deste modo, foi realizada uma estratificação dos resultados para identificar as alterações iniciais relacionadas a força muscular, alterações nos nervos principais e presença ou ausência de sensibilidade em um grau mais leve. No grupo de pacientes PB apenas um paciente apresentou grau 1 de incapacidade funcional antes do tratamento e o mesmo paciente evoluiu para o grau 2 durante o tratamento.

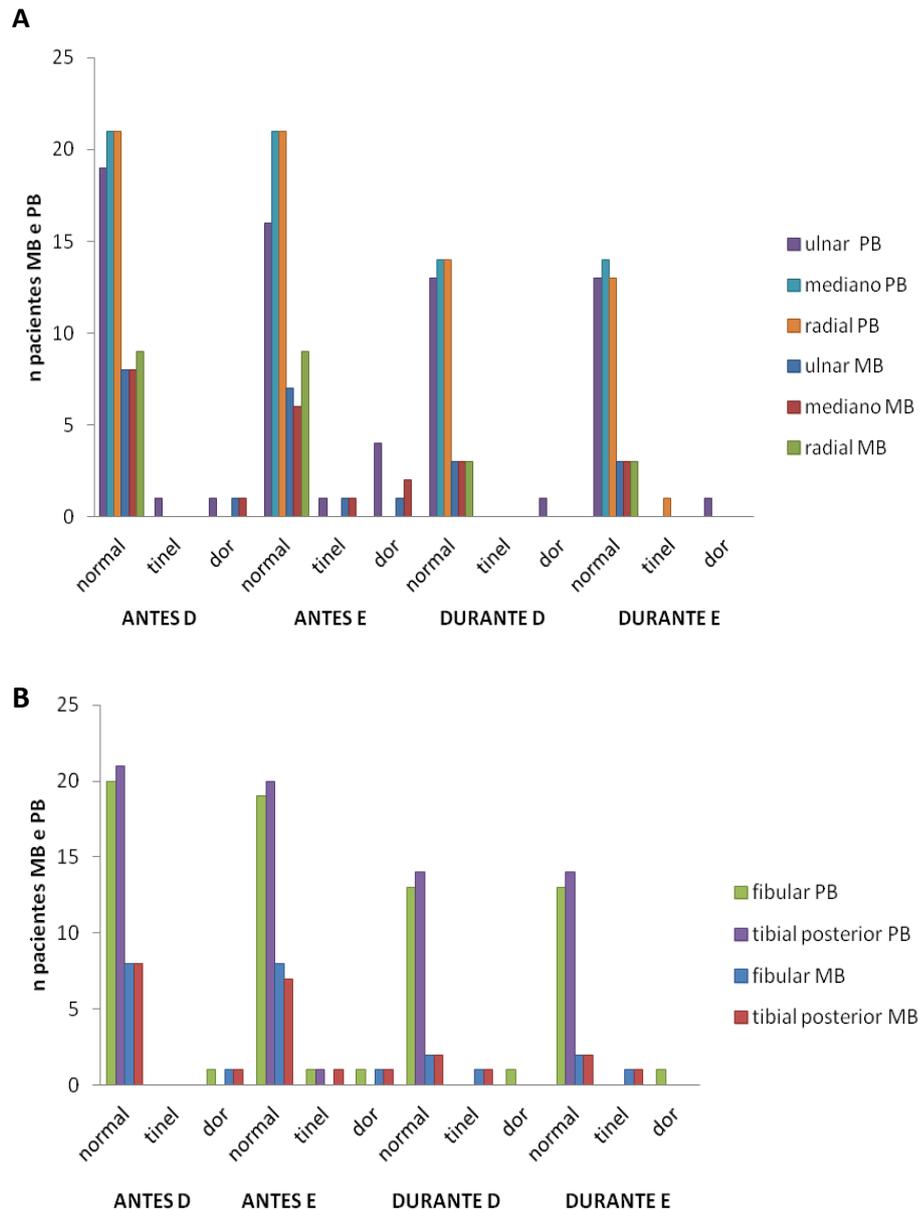
Os dados da figura 3 mostram que a maioria dos pacientes apresentam a sensibilidade normal (cor verde para pacientes MB e cor azul para pacientes PB), porém na avaliação durante o tratamento os pacientes com a forma PB, os pés apresentam na maioria dos pacientes alteração na sensibilidade representada na figura pela cor vermelha. Possibilitando uma melhor análise da alteração da sensibilidade dos pacientes incluídos no estudo.



**FIGURA 3. ALTERAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE PACIENTES COM HANSENÍASE ANTES E DURANTE O TRATAMENTO.** Dados de alteração na sensibilidade das mãos e pés de pacientes com as formas clínicas PB e MB da hanseníase que foram incluídos no estudo da análise funcional. Normal: pacientes apresentaram sensibilidade para o monofilamento verde (0,05g) para as mãos e monofilamento azul (0,2g) para os pés, alterada: paciente não sente o monofilamento verde (0,05g) para as mãos e azul (0,2g) para os pés, podendo sentir ou não os outros monofilamentos seguintes (violeta, vermelho escuro, laranja ou vermelho magenta). PB<sub>1</sub> n=21 e MB<sub>1</sub> n=10 antes e PB<sub>2</sub> n=14 e MB<sub>2</sub> n=4 durante.

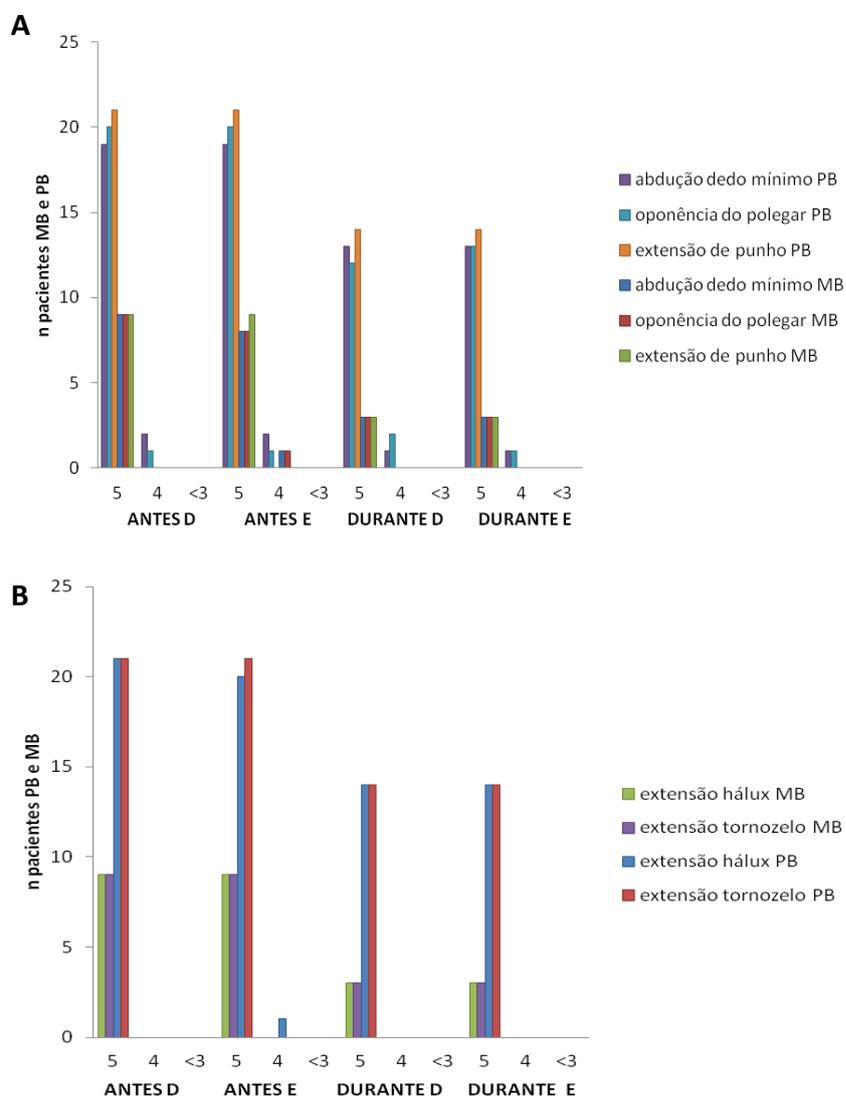
A figura 4 apresenta dados dos pacientes com hanseníase antes e durante o tratamento com ambas as formas clínicas. Nessa figura estão os dados de alteração nervosa nos principais nervos dos MMSS (A) e MMII (B) que são acometidos, sendo

classificadas as alterações à palpação do fisioterapeuta: dor relatada pelo paciente na região palpada correspondente com face álgica e túnel que é a sensação de choque ao precutir o nervo avaliado. A maioria dos pacientes não apresentam alterações como dor e túnel tanto em MMSS como em MMII, chama atenção o grupo de pacientes PB que no lado esquerdo da análise antes do tratamento para o nervo ulnar, menos de 5 pacientes relataram queixa de dor não permanecendo na avaliação durante o tratamento, relatando melhora do quadro observado.



**FIGURA 4. ANÁLISE DOS NERVOS PRINCIPAIS ACOMETIDOS NA HANSENÍASE DE PACIENTES COM AS FORMAS PB E MB ANTES E DURANTE O TRATAMENTO.** Dados da alteração dos nervos dos MMSS (A) e MMII (B) de pacientes com as formas clínicas PB e MB da Hanseníase que foram incluídos no estudo da análise funcional. Pacientes PB<sub>1</sub> n=21 e MB<sub>1</sub> n=12 antes e PB<sub>2</sub> n=14 e MB<sub>2</sub> n=3 durante. D=direito e E=esquerdo.

Após a análise do comprometimento dos nervos, a avaliação do grau de incapacidade funcional forneceu dados relacionados a força muscular de MMSS e MMII (figura 5 A e B). A figura 5 mostra dados da força muscular dos MMSS e MMII, avaliando movimentos que se estiverem comprometidos, incapacitam o pacientes de realizar algumas das atividades de vida diária. A função de oponência do polegar possibilita ao paciente o movimento de pinça envolvida em atividades como pegar um talher ou escovar os dentes. A maioria dos pacientes avaliados não apresentaram alteração na força muscular, permanecendo a maioria com um grau 5 que representa o movimento completo executado com resistência.

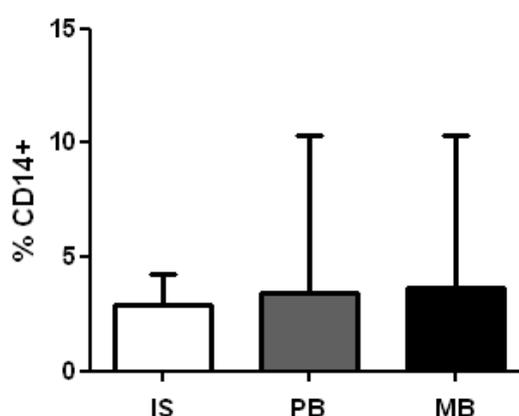


**FIGURA 5. ANÁLISE DA FORÇA MUSCULAR DE PACIENTES ACOMETIDOS NA HANSENÍASE COM AS FORMAS PB E MB ANTES E DURANTE O TRATAMENTO.** Dados da alteração da força muscular dos MMSS (A) e MMII (B) de pacientes com as formas clínicas PB e MB da hanseníase que foram incluídos no estudo da análise funcional. Escala de força 5 força preservada, 4 não vence uma grande resistência e <3 possui amplitude completa do movimento sem resistência. Pacientes PB<sub>1</sub> n=21 e MB<sub>1</sub> n=12 antes e PB<sub>2</sub> n=14 e MB<sub>2</sub> n=3 durante. D=direito e E=esquerdo.

### VII.3 ANÁLISE DOS MONÓCITOS EM PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS

#### VII.3.1 FREQUÊNCIA DOS MONÓCITOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE ANTES DO TRATAMENTO E EM INDIVÍDUOS SADIOS

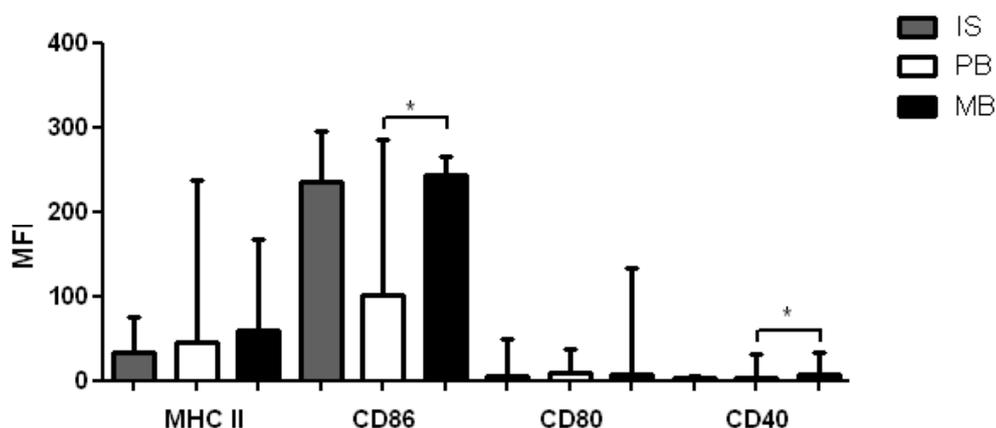
A figura 6 mostra a frequência monócitos de pacientes com as formas clínicas PB e MB, e indivíduos sadios segundo a expressão de CD14. Não houve diferença na frequência de monócitos circulantes entre pacientes e indivíduos sadios, ambos mantendo a mediana abaixo de 5%.



**Figura 6.** FREQUÊNCIA DE MONÓCITOS CD14+ EM PACIENTES ANTES DO TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS. Frequência de monócitos em pacientes com as formas PB (n=22), MB (n=12) antes do tratamento (DIA 0) e IS (n=8). Os resultados são representados com valores máximo e a medida de tendência central foi a mediana. ANOVA teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn foi usado para analisar diferença entre os grupos,  $p < 0,05$ .

#### VII.3.2 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS MHC II, CD86, CD80 E CD40 EM PACIENTES COM HANSENÍASE ANTES DO TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS

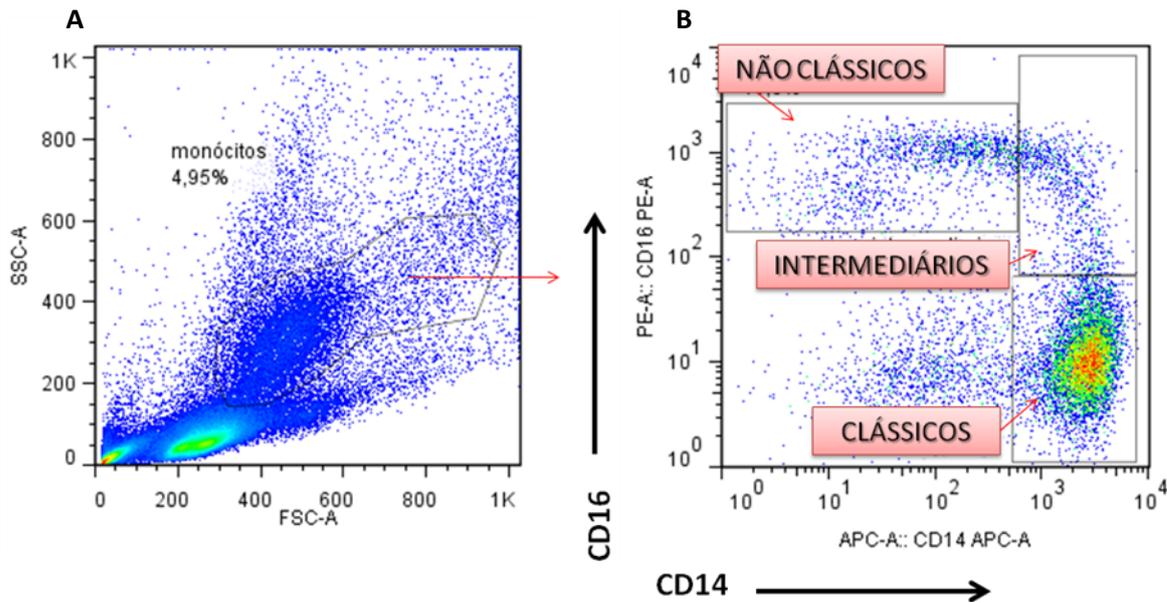
Variações na apresentação antigénica ou co-estimulação influenciam de forma direta na magnitude da resposta imune adaptativa. Aqui, foi observado que monócitos de pacientes com a forma paucibacilar apresentam diminuição da expressão de CD86 e CD40 quando comparados com a forma multibacilar da doença (figura 7). Não houve diferença na expressão das outras moléculas (figura 7).



**Figura 7.** EXPRESSÃO DE MHC II, CD86, CD80 E CD40 EM MONÓCITOS CD14+ DE PACIENTES ANTES DO TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de monócitos em pacientes com as formas PB (n=22), MB (n=12) antes do início do tratamento (DIA 0) e IS (n=8). Os resultados são representados com valores máximo e a medida de tendência central foi a mediana. Análise estatística ANOVA teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns usado para analisar a diferença entre os grupos, \*p<0,05.

#### VII.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS CIRCULANTES EM HANSENÍASE

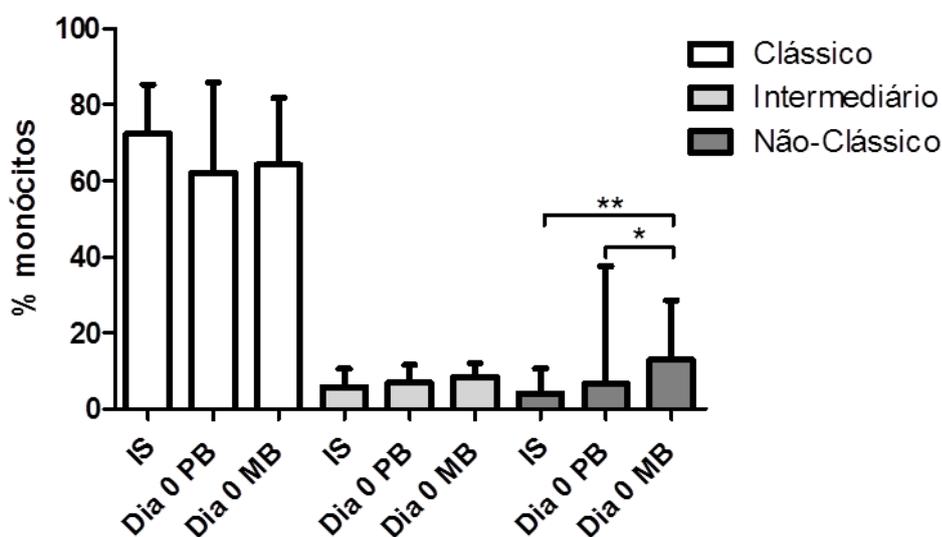
Recentemente foi observado que a população de monócitos circulantes era heterogênea baseado na expressão de CD16, sendo eles CD14++ CD16- (monócitos clássicos), CD14++ CD16+ (monócitos intermediários) e CD14+ CD16++ (monócitos não-clássicos). A figura 8 mostra os “*gates*” utilizados para análise de acordo com o tamanho e complexidade celular, e expressão de CD14 e CD16.



**Figura 8.** FREQUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE. (A) Identificação dos monócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de paciente com hanseníase. (B) Determinação das sub-populações de monócitos através da expressão de CD14 e CD16 em paciente com hanseníase. Plot representativo de 1 paciente.

#### VII.4.1 FREQUÊNCIA DE SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES HANSÊNICOS COM AS FORMAS PB E MB ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO

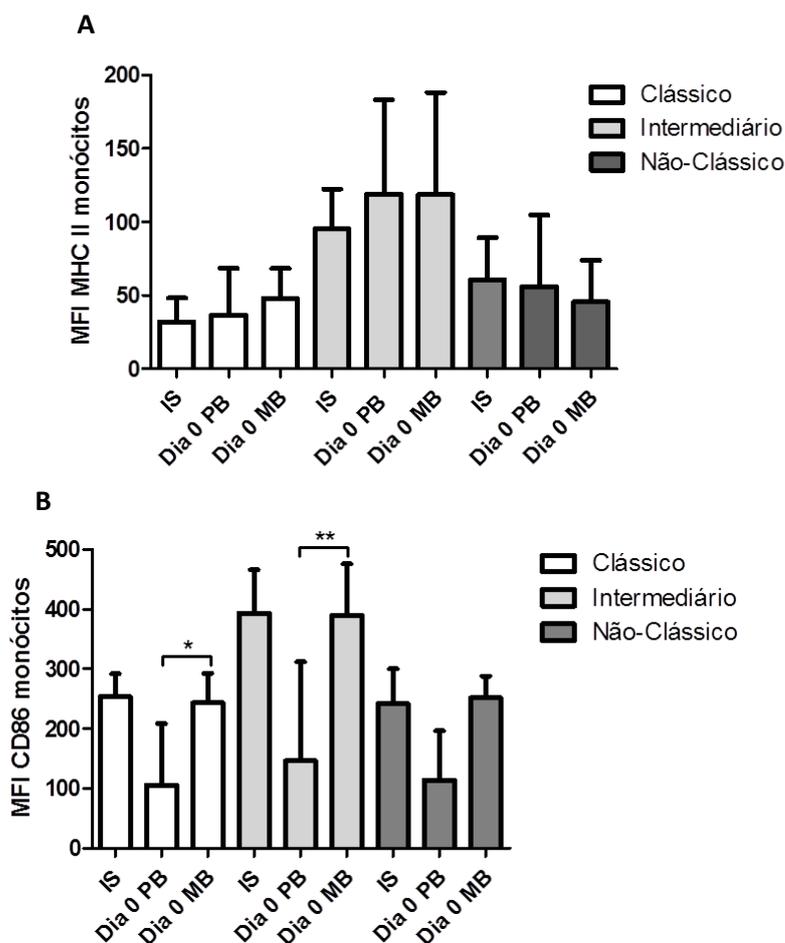
Dados na literatura mostram que a população de monócitos clássicos é a mais frequente no sangue periférico, seguidos dos não clássicos e intermediários. Aqui comparamos a frequência dessas sub-populações de monócitos de pacientes com as formas paucibacilar e multibacilar, com as de indivíduos sadios. Foi observado que a população de monócitos clássicos era mais frequente nos 3 grupos em estudo. Entretanto, a sub-população de monócitos não-clássicos de pacientes com a forma MB, estavam em maior frequência quando comparados com a frequência dessa sub-população nos outros grupos (figura 9).



**Figura 9.** FREQUÊNCIA DAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE ANTES DO TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS. Frequência das sub-populações de monócitos em pacientes com as formas PB (n=22), MB (n=12) antes do tratamento (DIA 0) e indivíduos saudáveis (IS) (n=8). Os resultados são representados com valores máximo e a medida de tendência central foi a mediana. ANOVA teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns foi usado para analisar a diferença entre os grupos, \*p<0,05 e \*\*p<0,005.

#### VII.4.2 GRAU DE ATIVAÇÃO DE SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM AS FORMAS PB E MB DE HANSENÍASE ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO, E INDIVÍDUOS SADIOS

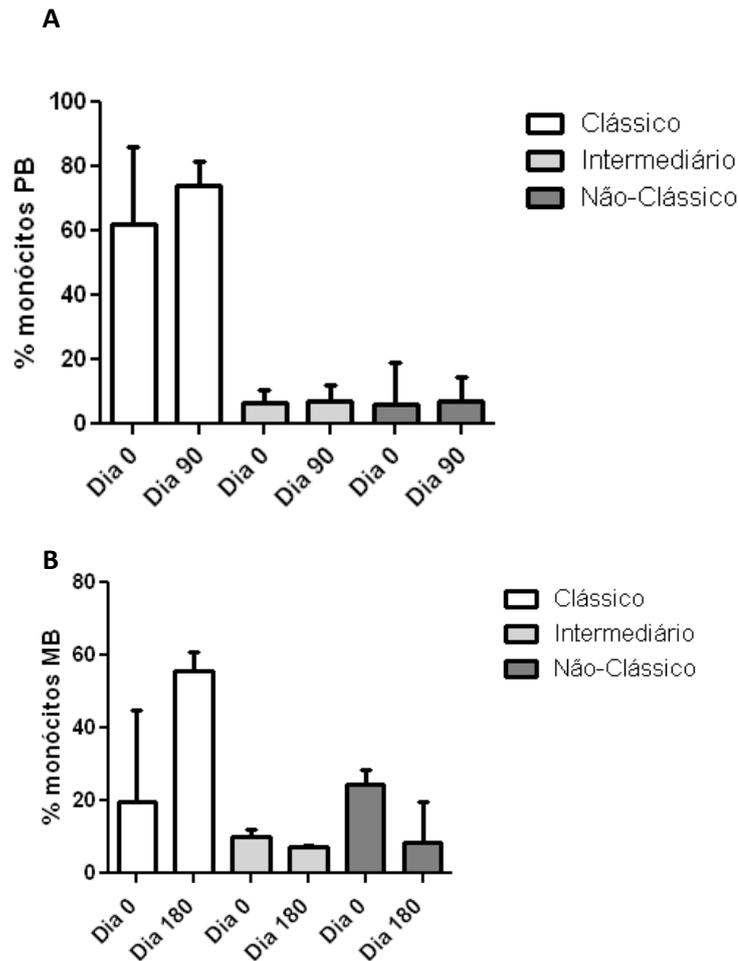
Para determinar o grau de ativação de monócitos nós analisamos a expressão de MHC classe II (Figura 10A) e CD86 (Figura 10B). Pôde-se observar que os monócitos clássicos e intermediários de pacientes com a forma PB expressavam menos CD86 do que os de pacientes com MB.



**Figura 10.** GRAU DE ATIVAÇÃO DAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS ATRAVÉS DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS MHC II E CD86. Média de intensidade de fluorescência das sub-populações de monócitos em pacientes com as formas PB (n=22), MB (n=12) e indivíduos sadios (IS) (n=8) antes do início do tratamento (DIA 0). (A) Resultados de MFI da molécula co-estimulatória MHC II nas diferentes sub-populações de monócitos. (B) Resultados de análise de citometria de fluxo da molécula co-estimulatória CD86. Os resultados são representados com valores máximo e a medida de tendência central foi a mediana. Análise estatística ANOVA teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns usado para analisar a diferença entre os grupos, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .

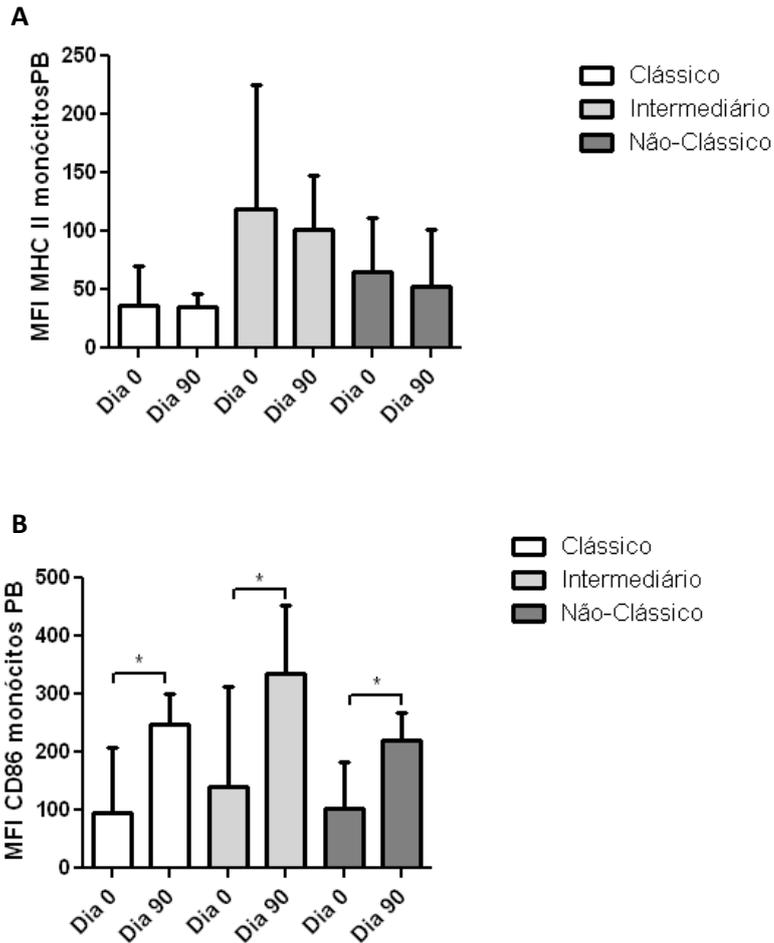
#### VII.4.3 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES HANSÊNICOS COM AS FORMAS CLÍNICAS PB E MB ANTES DO INÍCIO E DURANTE O TRATAMENTO

O próximo passo foi avaliar se havia mudanças no perfil de frequência das sub-populações de monócitos de pacientes com as formas clínicas PB e MB de hanseníase antes e durante o tratamento. Para isso, fizemos análises pareadas e constatamos que não houve diferenças em relação as frequências de monócitos de pacientes com as formas PB e MB antes e durante o tratamento (Figura 11 A e B).



**Figura 11.** FREQUÊNCIA DAS SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM A FORMA PB e MB. Pacientes com as formas PB (n=14) e MB (n=3), antes do tratamento (DIA 0) e durante o tratamento (DIA 90-PB e DIA 180-MB). Análise pareada. Os resultados são representados com valores máximo e medida de tendência central foi a mediana. Análise estatística, Teste não-paramétrico Wilcoxon usado para analisar a diferença entre os dias 0 e 90; 0 e 180 nas diferentes sub-populações de monócitos, \*p<0,05.

Como vimos uma diminuição da expressão de CD86 em monócitos intermediários e não-clássicos de pacientes PB, nós avaliamos a expressão dessa molécula nas amostras pareadas após o tratamento, a fim de identificar uma possível restauração da expressão dessa molécula influenciada pelo tratamento. Como esperado a expressão de CD86 foi recuperada após o tratamento. Diferentemente, não observamos diferenças na expressão de MHC classe II antes e durante o tratamento.



**Figura 12.** GRAU DE ATIVAÇÃO CELULAR UTILIZANDO AS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS. Média de intensidade de fluorescência das sub-populações de monócitos em pacientes com as formas PB (n=14), antes do tratamento (DIA 0) e durante o tratamento (DIA 90). Análise pareada. (A) Resultados da avaliação de citometria de fluxo do MFI da molécula co-estimulatória MHC II. (B) Resultados da molécula co-estimulatória CD86. Os resultados são representados com valores máximo e mínimo e a medida de tendência central foi a mediana. Análise estatística, Teste não-paramétrico Wilcoxon usado para analisar a diferença entre os dias 0 e 90 nas diferentes sub-populações de monócitos, \*p<0,05.

## VIII. DISCUSSÃO

Foi encontrado no presente estudo que 95% dos pacientes com ambas as formas clínicas apresentaram grau 0 de incapacidade funcional. A avaliação imunológica mostrou que pacientes PB tem diminuição da expressão de CD86 quando comparados a indivíduos saudáveis, a qual é restaurada após o tratamento.

As formas clínicas de indivíduos infectados por *M. leprae* se associam com a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Enquanto pacientes com a forma paucibacilar desenvolvem resposta Th1 com níveis elevados de IFN- $\gamma$ , pacientes com a forma multibacilar montam resposta Th2 o que favorece o crescimento do *Mycobacterium*. A ativação de monócitos está associada a aumento da resposta Th1 e destruição de microorganismos intracelulares. O presente estudo incluiu pacientes com ambas as formas clínicas da doença, na sua fase inicial, e teve como objetivo avaliar o grau de incapacidade funcional de pacientes com as formas multibacilar e paucibacilar e determinar o grau de ativação de sub-populações de monócitos circulantes.

A incapacidade funcional é o pior comprometimento que a hanseníase gera aos pacientes, por serem normalmente sequelas irreversíveis. A incapacidade é definida como um termo que abrange deficiências, limitações de atividades e restrição na participação, representa aspectos negativos entre o indivíduo e fatores contextuais (Augustine et al., 2006). O dano nervoso é causado por 4 mecanismos, o primeiro mecanismo é causado pela presença de *M. leprae* e antígenos em locais frios, devido a esse aspecto a hanseníase é uma doença de superfície. O trauma que ocorre nos nervos é causado pelo espessamento e compressão no canal onde nervo se aloja, o aumento da pressão intraneural e alterações vasculares são também fatores causais do dano nervoso que podem gerar sequelas permanentes (Vieth et al., 2010). Recentemente foi descrito que a desmielinização que ocorre na hanseníase pode ser a principal causa das incapacidades (Tapinos et al., 2006).

Em um consenso realizado por 30 países no ano de 2006 para a prevenção de incapacidades ficou definido o desafio de tornar a prevenção de incapacidade parte da rotina de acompanhamentos de casos de hanseníase. A avaliação do grau

de incapacidade funcional no momento do diagnóstico é imprescindível para que o acompanhamento do pacientes seja realizado e que sequelas da hanseníase sejam evitadas (Augustine et al., 2006). No presente estudo, todos os pacientes incluídos tiveram o exame de incapacidade funcional realizado antes do início do tratamento. Foi observado que mais de 95% dos pacientes PB e MB apresentaram grau 0, ou seja, não tiveram comprometimento funcional devido a hanseníase. Não foram incluídos na amostra pacientes com reações hansênicas que 10 a 30% dos pacientes desenvolvem quadros reacionais que normalmente geram danos nervosos mais severos. É provável que pacientes do presente estudo estejam sendo diagnosticados precocemente o que evita o desenvolvimento de incapacidade funcional.

Na análise estratificada da avaliação do grau de incapacidade funcional foram observados a presença ou não de alteração na sensibilidade dos pacientes nas mãos e nos pés, grau de força muscular de MMSS e MMII e alteração dos principais nervos acometidos pela hanseníase nos MMSS e MMII. É importante avaliar as alterações detalhadamente dos pacientes, para que propostas terapêuticas específicas sejam implantadas (Véras et al., 2012). O grau 0 de incapacidade funcional define que o paciente não apresenta sequelas devido à hanseníase, mas por classificar de modo geral não estratifica o local do problema apresentado pelo paciente que apresentam os graus 1 e 2. No presente estudo pode-se observar que mesmo após a análise estratificada a maioria dos pacientes não apresentaram alterações na sensibilidade das mãos e nos pés.

A sensibilidade é testada através dos monofilamentos de Semmes-Weinsten, onde fios de nylon com gramaturas que variam de 0,05g a 300g tem a função de avaliar se a sensibilidade está normal (cor verde 0,05g e azul 0,2g para o pé) ou se tem diminuição de sensibilidade protetora e térmica (cor violeta 2,0g), se tem perda da sensação protetora e de quente e frio (cor vermelho escuro 4,0g) ou alterações mais graves como não sentir dor, pela perda completa da sensibilidade protetora (cor laranja 10,0g e vermelho magenta 300g), podendo ainda o paciente não responder a nenhum dos estímulos realizados (Moreira & Alvarez, 1999).

Avaliando a força muscular de MMSS onde são testados os movimentos de oponência do polegar, abdução do dedo mínimo e extensão de punho, possibilita a

avaliação de grupos musculares de grande e pequenos tamanhos. Além de testar movimentos que fazem parte de exercícios da vida diária, como a oponência do polegar, que realiza o movimento de pinça, muito usado em diversas funções como alimentação e higiene. A amostra estudada não apresentou alterações na força muscular de MMSS entre os grupos avaliados, corroborando com o dado geral de incapacidade de que 95% dos pacientes avaliados apresentaram grau 0 de incapacidade funcional.

Os MMII são importantes para a locomoção dos indivíduos, realizar o movimento de extensão do tornozelo e extensão do hálux são essenciais para as fases da marcha. Por este motivo esses movimentos são avaliados e mensurados o grau de força muscular. Os pacientes apresentaram a maioria grau 5 de força muscular para os MMII, mantendo esse resultado durante o tratamento com a PQT.

O bacilo por apresentar predileção por nervos é capaz de causar danos persistentes, como perda de força e sensibilidade, além de quadros de dor, sensibilidade do nervo alterada como tinélio ou até espessamento do nervo, sendo esse último uma seqüela séria que muitas vezes o paciente é encaminhado para a cirurgia de neurólise. Mais uma vez, os dados estratificados mostram que a maioria dos pacientes não tiveram alterações nos nervos, mas alguns pacientes de ambas as formas, relataram dor a palpação sendo mais frequente que tinélio positivo.

A orientação quanto aos auto-cuidados é muito relevante para os pacientes com hanseníase, estes são orientados quanto à hidratação, higiene e tipo de calçados, sendo possível evitar o surgimento de lesões nervosas e o agravamento de lesões pré-existente sempre associado com a medição recomendada (Rodini et al., 2010). Foi possível verificar que os pacientes incluídos no presente estudo não tiveram agravamento do grau de incapacidade mantendo cerca de 95% dos pacientes no grau 0 de incapacidade funcional na avaliação que ocorreu durante o tratamento, tanto em pacientes PB como em pacientes MB.

Outro objetivo do estudo foi avaliar o grau de ativação de monócitos de pacientes com as formas PB e MB de hanseníase. Para isso avaliamos a expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias nessas células. A ativação dessas células é necessária para o desenvolvimento de resposta imune celular e eliminação do *M. leprae*.

Avaliamos primeiro a frequência de monócito no sangue periférico, não havendo diferença entre pacientes e indivíduos saudáveis, todos apresentando frequência abaixo de 5%. Recentemente foi descrito que a população de monócitos circulantes é heterogênea de acordo com a expressão de CD14 e CD16 (Zawada et al., 2011; Ziegler-Hertbrock et al., 2010). Como esperado, o presente estudo mostrou que a sub-população mais frequente é a de monócitos clássicos em todos os grupos estudados. Entretanto, pacientes com a forma MB apresentaram uma maior frequência da sub-população de monócitos não-clássicos quando comparado a indivíduos saudáveis e pacientes PB. A presença de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e GM-CSF, pode aumentar a expressão de CD16 em monócitos. Assim, futuros estudos devem ser realizados para determinar, não só os fatores que contribuem para a diferenciação dessas células, como também o papel dessas células na resposta imune contra o *M. leprae*.

Embora a expressão de MHC II que no presente estudo não tenha sido diferente entre indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase, a expressão de CD86 foi menor nos pacientes PB. Esse dado foi diferente do esperado, desde que pacientes com a forma PB apresentam resposta Th1 aumentada. Uma possível explicação para esse fenômeno é que a presença de fatores solúveis circulantes possam estar modulando a expressão de CD86 nesses pacientes. A população de monócitos avaliados no presente estudo não estava infectada, e dados publicados pelo nosso grupo reforçam essa hipótese, onde células infectadas são capazes de ativar células não-infectadas através de secreção de citocinas (Carvalho et al., 2008). Dados na literatura são conflitantes em relação à associação da molécula CD86 com resposta Th1 ou Th2. Enquanto alguns autores associam CD86 a uma diferenciação para o pólo Th2 (Santos et al., 2006; Santos et al., 2001; Migliori, 2012; van Rijt et al., 2004; Tsuyuki et al., 2003; Schlienger et al., 1998), outros estudos em patologias como a asma, relatam que de forma contrária a molécula CD86 está associada ao pólo Th1 da resposta imune (Balkhi et al., 2004).

O presente estudo mostrou que as três sub-populações de monócitos, clássicos, intermediários e não-clássicos, apresentaram diminuição de CD86, a qual foi restaurada após 90 dias de tratamento com a PQT no grupo de pacientes com a forma PB. Futuros estudos devem ser realizados a fim de determinar as moléculas do *M. leprae* e os fatores solúveis do hospedeiro envolvidos nesse mecanismo.

## VIII.1 RESUMO DOS RESULTADOS

1. O grau de incapacidade funcional 0 prevaleceu entre os grupos de pacientes avaliados neste estudo.
2. A maioria dos pacientes não apresentou alteração de sensibilidade.
3. A maioria dos pacientes não apresentou dano nos nervos principais.
4. A maioria dos pacientes possui força muscular preservada.
5. Monócitos CD14+ nos grupos de pacientes e indivíduos saudáveis tem mediana abaixo de 5%.
6. As moléculas CD86 e CD40 tem uma diferença significativa entre os grupos nos monócitos CD14+.
7. Monócitos clássicos foram mais frequentes na Hanseníase do que os monócitos intermediários e os não-clássicos nos grupos de pacientes e indivíduos saudáveis deste estudo.
8. Pacientes MB apresentou maior frequência de monócitos não-clássicos do que pacientes PB e indivíduos saudáveis antes do tratamento.
9. A expressão de CD86 em monócitos clássicos e intermediários em pacientes PB foi menor do que pacientes MB e indivíduos saudáveis antes do tratamento.
10. A expressão de MHC II não teve diferença entre os grupos avaliados neste estudo.

## IX. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

O presente estudo está inserido em um projeto com duração e aprovação para 5 anos, onde colaboradores desenvolvem estudos relacionados com a análise genética de pacientes com e sem reações e a resposta imunológica contra antígenos de *M. leprae*. A continuidade do estudo será realizada com o aumento do número de pacientes, para que respostas a novos questionamentos que seguem de acordo com as análises que são feitas sejam dadas. A exemplo, qual o mecanismo que está relacionado com baixa expressão de CD86 no grupo de pacientes PB.

## **X. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Pacientes com a forma PB da hanseníase apresentam uma diminuição do grau de expressão da molécula co-estimulatória CD86 a qual é restaurada durante o tratamento com a PQT.

A maioria dos pacientes de ambas as formas clínicas apresentaram grau 0 de incapacidade funcional correspondente com a avaliação estratificada, mostrando que os pacientes estão sendo diagnosticados precocemente e evoluindo sem sequelas durante o tratamento.

## XI. SUMMARY

**BACKGROUND:** Leprosy is a disease with a character of chronic and granulomatous caused by *Mycobacterium leprae*, which has tropism for skin and peripheral nerves. While patients with multibacillary (MB) disease not mount a Th1 response, thus facilitating the multiplication of *Mycobacterium*, individuals with paucibacillary (PB) produce IFN-gamma in response to antigens of *M. leprae*. Monocytes are circulating cell types derived from bone marrow that differentiate into macrophages and dendritic cells in the periphery. Recently, circulating monocytes were classified as classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). The degree of activation of these cells is associated with the intensity of response of lymphocytes T. **Objective:** To determine the degree activation of monocytes subpopulations in leprosy patients before and during treatment and identify the profile the degree of disability presented by the patients included in the study. **Methodology:** We collected 20 ml of heparinized blood of patients PB (n = 22) and MB (n = 12) and performed the separation of mononuclear cells and the degree of activation was determined by flow cytometry by staining of CD14, CD16, MHC II, CD80, CD86 and CD40. **Results:** Patients with MB show how the frequency of non-classical monocytes is increased. There was no difference in the expression of CD80 and MHC II between monocytes from patients with the PB and MB leprosy. However, monocytes of patients with the PB showed a low expression of CD86 before starting the treatment, which was restored during treatment. Most patients had zero degree of functional disability. **Conclusion:** Patients with leprosy with a paucibacillary form a decreased level of expression of costimulatory molecule CD86 which is restored during treatment with MDT. All patients showed no change in the degree of functional disability due to leprosy.

**Keywords:** Leprosy, sub-populations of monocytes and costimulatory molecules.

## XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismo de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 79(6):647-64, 2004.

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.

Ramos-e-Silva M & Rebello PF. Leprosy. Recognition and treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2(4):203-11, 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. *Guia para Hanseníase*. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Gestão de Políticas Estratégicas. ATDS; 2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>> Acesso em 10 de agosto de 2012.

Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Current Opinion in Immunology*. 22(1):48–54, 2010.

Auffray C, Seiweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review Immunology*. 27:669-92, 2009.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D´Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 33(3):375-86, 2010.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells blood. *Blood*. 116(16):74-80, 2010.

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

Khambati FA, Shetty VP, Ghate SD, Capadia GD. Sensitivity and specificity of nerve palpation, monofilament testing and voluntary muscle testing in detecting peripheral nerve abnormality, using nerve conduction studies as gold standard; a study in 357 patients. *Leprosy Review*. 80(1):34-50, 2009.

Stingel P. Lepra: Pathogenesis - Klassifizierung - Diagnostik - Behandlung. *Hautarzt* 41: 126-30, 1990.

Bhat RM & Prakash C. Leprosy: an overview of pathophysiology. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 1-6:2012.

WHO – World Health Organization. *Leprosy: Global situation*. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/situation/en/>>. Acesso em 28 de outubro de 2012.

Teo SK, Resztak KE, Scheffler MA, Kook KA, Zeldis JB, Stirling DI, Thomas SD. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes and Infection*. 4:1193-202, 2002.

Foss NT. Imunopatologia. *In*: Talhari S, Neves RG (eds) Hansenologia. 3ª edição. Gráfica Tropical, Manaus 9:97-102, 1997.

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.

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

Gabino JA, Nery JA, Virmond M, Stump PRN, Baccarelli R, Marques JRW. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento da Neuropatia. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2003.

Raposo MT, Caminha AVQ, Heukelbach J, Sánchez-González MA, Medeiros JLA, Nemes MIB. Assessement of physical impairments in leprosy patients: a comparison between the world health organization (WHO) disability grade and the eye-hand-foot score. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 53(2): 77-81, 2011.

Moreno EG, Arriaza MM, Martinez MDN, Lirola MJM. Confirmación molecular de um caso de lepra de especial dificultad diagnóstica. *Enfermedades Infecciosas Microbiology Clinical*. 30(5):271-7, 2012.

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

Opromolla ADV & Ura S. *Atlas de hanseníase*: Instituto Lauro de Souza Lima: São Paulo, 80p., 2002.

Barreto JA. Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparative, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria-São Paulo. 2005.

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.

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

Moniuszko M, Bodzenta-Luaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, but not CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clinical Immunology*. 130(3):338-46, 2009.

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

Aguilar-Ruiz SR, Torres-Aguilar H, Gonzalez-Dominguez G, Narvaez J, Gonzalez-Perez G, Vargas-Ayala G, Meraz-Rios MA, Garcia-Zepeda EA, Sanchez-Torres C. Human CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*. 90:1119-31, 2011.

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.

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 antigen-presenting function. *Infection and Immunity*. 9(70):5167-76, 2002.

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.

Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the cytokine response in human monocytes by *M. leprae* phenolic glycolipid-1. *Journal of interferon & cytokine research*. 32(1):27-33, 2012.

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.

Migliori IK. Uso de RNA de interferência para modulação das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em células dendríticas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2010.

Souza HP. Mecanismos de modulação da via de sinalização CD40/CD40L. Tese de Livre-Docente. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2007.

Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, Kim J, Sieling A, Miller A, Brightbill H, Schlinger K, Rea TH, Modlin RL. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *The journal of immunology*. 165:1506-12, 2000.

Sridevi K, Neena K, Chitralekha 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.

Augustine V, Brantus P, Cross H, Ebenso J, Goucheng Z, Hisch E, Rao R, Saunderson P, Smith C, Soutar D, Brakel W. Declaração de Consenso sobre Prevenção de Incapacidade. 2006.

Vieth H, Lehman L, Marciano LHCM, Pioto MP, Orsini P, Fuzikawa PL, Lima RC, Baccarelli R, Salotti RSA, Gonçalves SD. *Capacitação em prevenção de incapacidades em hanseníase: Guia do participante*. 1. ed., MS: Brasília, 155p.,2010.

Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nature Medicine*. 12(8):961-6, 2006.

Véras LS, Vale RG, Mello DB, Castro JA, Lima V, Silva KN, Trott A, Dantas EH. Degree of disability, pain levels, muscle strength, and eletromyographic function in patients with Hansen´s disease with common peroneal nerve damage. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Toropical*. 45(3):375-9, 2012.

Moreira D & Alvarez RRA. Utilização dos monofilamentos de Semmes-Weisntein na avaliação de sensibilidade dos membros superiores de pacientes hansenianos atendidos no Distrito Federal. *Hansenologia Internationalis*. 24(2):121-8, 1999.

Rodini FCB, Gonçalves M, Barros ARSB, Mazzer N, Elui VMC, Fonseca MCR. Prevenção de incapacidades na hanseníase com apoio em um manual de autocuidados para pacientes. *Fisioterapia e Pesquisa*. 17(2):157-66, 2010.

Carvalho LP, Pearce EJ, Scott P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania brasiliensis*: infected cells produce high leves of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell response. *Journal of Immunology*. 181(9):6473-80, 2008.

van Rijt LS, Vos N, Willart M, KleinJan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Essential role of drndritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of Th2 effector responses in a mouse model of asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 114(1):166-73, 2004.

Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*. 185(9):1671-9, 1997.

Schneider K, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 313:1972-75, 1998.

Balkhi MY, Latchumanan VK, Singh B, Sharma P, Natarajan K. Cross-regulation of CD86 by CD80 differentially regulates T helper responses from Mycobacterium tuberculosis secretory antigen-activated dendritic cell subsets. *Journal of Leukocyte Biology*. 75(5):874-83, 2004.

### XIII. ANEXOS

#### XIII.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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### XIII.2 FICHA DE AVALIAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE FUNCIONAL



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



### AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS EM HANSENÍASE

### GRAU DE INCAPACIDADE FUNCIONAL

Nome \_\_\_\_\_ Data Nasc. \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_ Sexo: M  F

Município \_\_\_\_\_ Unidade Federada \_\_\_\_\_

Classificação Operacional PB  I  B  L  Data início PQT: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data Alta PQT: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

FACE	1ª	/	/	2ª	/	/	3ª	/	/
<b>Nariz</b>	D		E	D		E	D		E
Queixa principal									
Ressecamento (S/N)									
Ferida (S/N)									
Perfuração de septo (S/N)									
<b>Olhos</b>	D		E	D		E	D		E
Queixa principal									
Fecha olhos s/ força (mm)									
Fecha olhos c/ força (mm)									
Triquiase (S/N) / Ectrópio (S/N)									
Diminuição da sensibilidade da córnea (S/N)									
Opacidade córnea (S/N)									
Catarata (S/N)									
Acuidade Visual									

Membros Superiores	1ª	/	/	2ª	/	/	3ª	/	/
Queixa principal									
<b>Palpação de nervos</b>	D		E	D		E	D		E
Ulnar									
Mediano									
Radial									

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da Força	1ª	/	/	2ª	/	/	3ª	/	/
	D		E	D		E	D		E
Abrir dedo mínimo Abdução do 5º dedo (nervo ulnar)									
Elevar o polegar Abdução do polegar (nervo mediano)									
Elevar o punho Extensão de punho (nervo radial)									

Legenda: F=Forte D=Diminuída P=Paralisado ou 5=Forte, 4=Resistência Parcial, 3=Movimento completo, 2=Movimento Parcial, 1=Contração, 0=Paralisado

#### Inspeção e Avaliação Sensitiva

1ª	/	/	2ª	/	/	3ª	/	/
D		E	D		E	D		E

Legenda: Caneta-filamento lítil (2g): Sente ✓ Não sente X ou Monofilamentos: seguir cores

Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção: // Ferida: ○

MEMBROS INFERIORES		1º		2º		3º	
Queixa principal							
Palpação de nervos		D	E	D	E	D	E
Fibular							
Tibial							

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da Força		1º		2º		3º	
		D	E	D	E	D	E
Elevar o hálux Extensão de hálux (nervo fibular)							
Elevar o pé Dorsiflexão de pé (nervo fibular)							

Legenda: F= Forte D=Diminuída P=Paralisado ou 5= Forte, 4=Resistência Parcial, 3=Movimento completo, 2=Movimento Parcial, 1=Contração, 0=Paralisado

### Inspeção e Avaliação Sensitiva

1º		2º		3º	
D	E	D	E	D	E

Legenda: Caneta/filamento lilás (2g): Sente ✓ Não sente X ou Monofilamentos: seguir cores

Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção: // Ferida: ◯

### CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE

#### Classificação do Grau de Incapacidade e Soma de Olhos Mão e Pés OMP (score)

DATA DA AVALIAÇÃO	Grau de Incapacidade	OLHOS		MÃOS		PÉS		Maior Grau	Total OMP	ASSINATURA
		D	E	D	E	D	E			
1ª / /	Grau									
	Soma OMP									
2ª / /	Grau									
	Soma OMP									
3ª / /	Grau									
	Soma OMP									

0 = para grau 0 1= para grau 1 2= para grau 2

#### LEGENDA PARA PREENCHIMENTO DO GRAU DE INCAPACIDADES

GRAU	CARACTERÍSTICAS
0	Nenhum problema com os olhos, mãos e pés devido à hanseníase.
1	Diminuição ou perda da sensibilidade nos olhos. Diminuição ou perda da sensibilidade nas mãos e /ou pés. (não sente 2g ou toque da caneta)
2	Olhos: lagoftalmia e/ou ectrópio; tríquise; opacidade corneana central; acuidade visual menor que 0,1 ou não conta dedos a 6m. Mãos: lesões tróficas e/ou lesões traumáticas; garras; reabsorção; mão caída. Pés: lesões tróficas e/ou traumáticas; garras; reabsorção; pé caído; contractura do tornozelo.

#### MONOFILAMENTOS

COR	Gramas
Verde	0,05
Azul	0,2
Lilás	2,0
Vermelho Fechado	4,0
Vermelho Cruzado	10,0
Vermelho Aberto	300,0
Preto	Sem Resposta

### XIII.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Anexo I

AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS – UFBA  
HOSPITAL ESPECIALIZADO DOM RODRIGO DE MENEZES

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 tem 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.



22.03.2012

**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/nº – Canela, telefone (71) 3237-7353, ou com Dra Lídia Maria Medeiros Machado, coordenadora do estudo no Hospital Dom Rodrigo de Menezes, telefone (71) 82024284 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, na pessoa do Dr. Roberto Badaró, no endereço Rua João das Botas, S/Nº 1º andar – 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

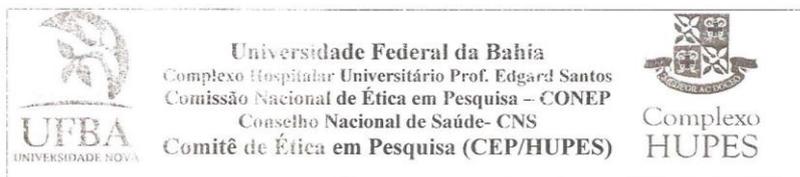
Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

2



22.03.2012

### XIII.4 OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



#### 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.

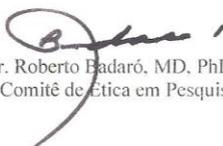
O referido adendo solicita:

- 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 hanseníicas.

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 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 hanseníica), 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 hanseníica), 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 eqüitativa 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.

20/10

• 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 : 18 04 2011  
16 10 2011  
16 04 2012

Relatório FINAL : setembro 2012

### XIII.5 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NA SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

#### **Organization of manuscript**

Organize the content of your manuscripts as follows: Title Page, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Tables, Figure Legends, and Figures. Other editorial requirements follow:

*Author statement.* *Scandinavian Journal of Immunology* no longer requires a signed Author Statement, but all authors are strongly encouraged to indicate their specific contributions to the submitted work. (See above under '*Scandinavian Journal of Immunology* - definition of authorship.')

*Declaration of commercial interest.* For submitted papers that contain information affecting commercial products or potential products, we require that the authors declare any financial interest in the product or in potentially competing products. This policy applies to investors in and consultants to the involved commercial venture, as well as to persons holding patents relating to the product or potentially competing products. We also require that authors who are employees of companies whose commercial products are discussed in a submitted paper disclose the fact of their employment.

*Please note:* It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list the appropriate commercial relationships. In such cases, a footnote will accompany the published paper, describing the applicable relationship.

For work involving a biomedical product or potential product partially or wholly supported by corporate funding, an acknowledgement must accompany the paper stating: This study was supported (in part) by research funding from (company name) to (authors' initials).

*Title page.* This page should contain the following: Article title • Short title for running head (not to exceed 50 characters, including spaces between words) • Full and accurate names of all authors • Names of institutions in which work was done connected to the appropriate authors • Corresponding author's full name, address, phone and fax number, and e-mail address • Word counts. You should also choose an appropriate scientific heading from among the following: Basic Immunology, Clinical Immunology, or Immunological Methods.

*Abstract.* The abstract should contain 250 words or fewer and state the rationale, objectives, findings, and conclusions of the study.

*Acknowledgements.* Acknowledge support received from individuals. Note about research grants and any other financial support.

*References.* We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp> the references should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by arabic numerals [in brackets]. References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustration.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in *Index Medicus*.

Published abstracts can be used as references. Manuscripts accepted but not yet published can also be included in the references; designate the journal followed by 'in press' (in parentheses). Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as 'unpublished observations' (in parentheses). 'Unpublished observations' and 'personal communications' may not be used as references, although references to written, not verbal, communications may be inserted (in parentheses) in the text.

Examples of correct forms of references are given below.

### **Journals**

- (1) *Standard journal article*. (List authors when six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al.) Soter NA, Wasserman SI, Austen KF. Cold urticaria: release into the circulation of histamine and eosinophil chemotactic factor on anaphylaxis during cold challenge. *N Engl J Med* 1976;294:687-90.
- (2) *Corporate author*. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended method for the determination of gamma-glutamyltransferase in blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1976;36:119-25.

### *Books and other monographs*

- (3) *Personal author(s)*. Osler AG. Complement: Mechanisms and Functions. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1976.
- (4) *Corporate author*. American Medical Association Department of Drugs. AMA drug evaluations. 3rd edn. Littleton: Publishing Sciences Group, 1977.
- (5) *Chapter in book*. Weistein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Soderman WA, eds. *Pathologic Physiology: Mechanisms of Disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1974:457-72.

*Published proceedings paper* DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an untreated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of the Third Annual Meeting of the International Society for Experimental Haematology*. Houston: International Society for Experimental Haematology, 1974:44-6.

*Footnotes and abbreviations.* Do not use footnotes; instead, use parenthetical statements within text, but sparingly. Abbreviations should be defined at first mention and thereafter applied consistently throughout the article. Do not use nonstandard abbreviations or abbreviate terms appearing fewer than 3 times. Give the chemical name of a compound after the first use of the trivial name. The trivial name may follow throughout the article. Abbreviate units of measure only when used with numbers.

*Tables.* Each table should have a brief, specific, descriptive title, giving sufficient explanation to make the data intelligible without reference to the text. Number all tables and cite in numerical order in the text, using Arabic numerals.

*Image acquisition and manipulation.* The following information must be provided about the acquisition and processing of images: (1) make and model of microscope, (2) type, magnification, and numerical aperture of the objective lenses, (3) temperature, (4) imaging medium, (5) fluorochromes, (6) camera make and model, (7) acquisition software, and (8) any subsequent software used for image processing, with details about types of operations involved (eg, type of deconvolution, 3D reconstructions, surface or volume rendering, gamma adjustments, etc).

No specific feature within an image may be enhanced or moved. The grouping of images from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image. Nonlinear adjustments (eg, gamma settings) must be disclosed in the figure legend. Digital images in manuscripts accepted for publication will be scrutinized for any indication of improper manipulation. As a result, the Editors may request the original data from the authors for comparison to the prepared figures. Cases of deliberate misrepresentation of data will be reported to the corresponding author's home institution or funding agency.

*Preparation of figures.* Cite figures in the text in numerical order using Arabic numerals. For peer-review submission, follow the online uploading instructions. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file.

Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>. Always send a hard copy of digitally supplied figures to the Central Editorial Office (details above).

*Figure sizing for accepted manuscripts.* For the print publication, lay out figures as compactly as is consistent with conveying the relevant data. Figures will be sized to fit the smallest possible space, but in order to prevent radical changes in figure content, prepare the figures in one of two sizes: 8.0 cm (1-column width) or, if necessary, 11.5 cm (1 1/2 column width). These instructions do not apply to figures submitted for online review and prepublication.

*Figure legends.* All legends must begin with a short descriptive sentence that sums up the intent and content of the data contained in the figure. This sentence should be in boldfont. A more detailed explanation of the data contained in the figure and/or its parts should follow. The detailed description should be in Roman type (ie, not in boldfont).

*Color charges.* Except for review articles, authors are expected to contribute towards the cost of colour reproduction. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be down loaded as PDF from the internet. The Web address for the form is: [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_F\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf).

Once completed, please return the original signed form to the Production Editor by courier. Colour reproduction may be available free of charge at the Editors' discretion. Please correspond with the Editor-in-chief on acceptance of the manuscript. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Scandinavian Journal of Immunology* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

*Display of sequences.* Prepare sequences as figures, not tables. This will ensure that proper alignment is preserved. Submission of sequences to GenBank. Original DNA sequences reported in *Scandinavian Journal of Immunology* must also be submitted to GenBank. Instructions for submission can be found at the following address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. An accession number should be supplied parenthetically at a relevant location in text.

*Human and murine genes.* For human genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Nomenclature Committee. Approved gene symbols should be obtained prior to submission from the HUGO Nomenclature Committee, [nome@galton.ucl.ac.uk](mailto:nome@galton.ucl.ac.uk). For nomenclature guidelines, see White et al., 'Guidelines for Human Gene Nomenclature' [Genomics, 45, 468-471 (1997)]. The Gene Name Proposal form may be completed on the Nomenclature Web page: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>. Use ISCN nomenclature for cytogenetics notation [Mitelman, F. (ed.) ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S. Karger, Basel]. Human gene names and loci should be written in uppercase italics and Arabic numerals. Protein products are not italicized.

For mouse strain and genetic nomenclature, refer to the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: <http://www.informatics.jax.org/nomen/>. New symbols and names for genes should be obtained prior to submission through the online symbol registry form at: [http://www.informatics.jax.org/nomen/nomen\\_submit\\_form.shtml](http://www.informatics.jax.org/nomen/nomen_submit_form.shtml).

*Microarray databases.* *Scandinavian Journal of Immunology* supports the efforts of the Microarray Gene Expression Data Society to standardize the presentation of microarray data, and we recommend that authors follow their guidelines and checklist ([http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame\\_checklist.html](http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html)). In addition, the Journal strongly recommends the supplemental microarray data be deposited in a public database such as Gene Expression Omnibus (or GEO, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or submitted for peer-review with the initial submission of the manuscript.

*Data sharing.* *Scandinavian Journal of Immunology* supports the efforts to encourage open sharing of publication-related data. *Scandinavian Journal of Immunology* adheres to the beliefs that authors should include in their publications the data, algorithms, or other information that is central or integral to the publication or make it freely and readily accessible; use public repositories for data whenever possible; and make patented material available under a license for research use. For more information, see the NAS website: <http://books.nap.edu/books/0309088593/html/1.html>

*Distribution of reagents.* The Editors of *Scandinavian Journal of Immunology* has adopted the policy that any readily renewable resources mentioned in a Journal article not already obtainable from commercial sources shall be made available to all qualified investigators in the field. The policy stems from the long-standing scientific principle that authenticity requires reproducibility. Publication in *Scandinavian Journal of Immunology* constitutes a de facto acceptance of this policy. Included are reagents that can be easily provided; specifically, nucleic acid sequences, cDNA and genomic clones, cell lines, and monoclonal antibody clones. Small amounts (sufficient for the replication of any in vitro work reported) of novel protein reagents are also considered easily transferable.

Although the Editors appreciate that many of the reagents mentioned in *Scandinavian Journal of Immunology* are proprietary or unique, neither condition is considered adequate grounds for deviation from this policy. Suitable material transfer agreements can be drawn up between the provider and requester, but if a reasonable request is turned down and submitted to the Editor-in-Chief, the corresponding author will be held accountable. The consequence for noncompliance is simple: the corresponding author will not publish in *Scandinavian Journal of Immunology* for the following 3 years.

*Guidelines for stem cell research.* Research with embryonic stem cells should adhere to the guidelines established by the National Academy of Sciences, as published in the National Academy Press, at <http://nap.edu/books/0309096537/html>.

*Proofreading.* Authors of accepted manuscripts will receive electronic page proofs directly from the printer and are responsible for proofreading and checking the entire article, including tables, figures, and references. Authors should correct only typesetting errors at this stage and may be charged for extensive alterations. Page proofs must be returned within 48 hours to avoid delays in publication. Send to:

## **Scandinavian Journal of Immunology Production Office**

Attn. Jeremy Chua, Production Editor  
Wiley-Blackwell  
Wiley Services Singapore Pte Ltd  
1 Fusionopolis Walk  
#07-01 Solaris South Tower  
Singapore 138628  
Tel: +65 6643 8476 | Fax: +65 6643 8008  
Email: [sji@wiley.com](mailto:sji@wiley.com)

*Word counts.* All manuscripts must include a total text word count and an abstract word count on the title page of the manuscript. The total text word count does not include title page, figure legends, references, or tables. Only under exceptional circumstances will papers containing more than 6000 words be considered, but under no circumstances will abstracts longer than 250 words be published.

*Revised manuscripts.* In many cases, authors will be invited to make revisions to their manuscript. A revised manuscript should preferably be received by the responsible Associate Editor within 3 months of the date on the decision letter or it will be considered a new submission. An extension can sometimes be negotiated with the Associate Editor. A signed Exclusive Licence Form must also be submitted with the revision. Both forms (ELF and CoW) can be found in these links: [ELF](#) and [CoW](#). These forms are also available through Scandinavian Journal of Immunology Manuscript Central. Fax the form to +47-55 97 58 17 and send original by regular mail to:

Ms. Kate Frøland, Editorial assistant *Scandinavian Journal of Immunology*  
Broegelmann Research Laboratory The Laboratory Building, 5th Floor, Room 5385  
N-5021 Bergen, Norway

**Fees and reprints** *Processing fee.* There are no processing fees for papers submitted to *Scandinavian Journal of Immunology*.

### **Page charges, color charges, and reprint fees.**

*Page charges.* There are no page charges for any type of articles published in *Scandinavian Journal of Immunology*. Exception might be supplements.

*Reprint prices.* A schedule of prices will be provided on the Reprint Order Form. Reprints must be ordered at the time the page proofs are reviewed. Later orders, especially of Reprints with color images, will be much more costly.  
*Color charges.* To contribute to the high cost of printing in color, authors may be requested to contribute towards covering such costs.

### **Additional information**

**Cover illustrations.** Cover illustrations are chosen by the Editor-in-Chief. Authors who submit a manuscript are encouraged to include a color image they consider suitable for the cover of *Scandinavian Journal of Immunology* (author must own

copyright to the image.) Add a brief caption explaining the content of the figure. Cover illustrations are published without charge to the author, but authors may be charged for color figures used within their article.

**Announcements** Announcements of meetings that are of interest to the readers of *Scandinavian Journal of Immunology* should be sent to the Editor-in-Chief at least 3 months before the first day of the month of issue. Fees for announcements vary depending on their size and the number of insertions. Prices may be obtained by contacting the *Scandinavian Journal of Immunology* Publishing Office (telephone: +44 1865 776868; fax: +44 1865 714591).

*Advertisements/classified ads.* Advertisements and classified ads should be sent to *Scandinavian Journal of Immunology's* advertising representative, Kevin Phillips ([Kephillips@wiley.com](mailto:Kephillips@wiley.com)).

**Copyright assignment.** All material in *Scandinavian Journal of Immunology* represents the opinions of the authors and does not reflect the opinions of The Scandinavian Society for Immunology, the Editors, or the institutions with which the authors are affiliated. Authors submitting manuscripts do so with the understanding that if a manuscript is accepted, the copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to Blackwell Publishing, and that the corresponding author will be required to sign and submit a copyright transfer form on behalf of all authors at the Revision stage. See the new copyright form [using this link](#) for more details.

**OnlineOpen.** OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms)

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.