

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**DAYSE DANIELLE DE OLIVEIRA SILVA**

**DETECÇÃO *IN SITU* DE CITOCINAS DE PERFIL TH1 E TH2 POR  
IMUNOISTOQUÍMICA E RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS NAS FORMAS POLARES DA DOENÇA DE HANSEN**

**BELÉM**

**2009**

**DAYSE DANIELLE DE OLIVEIRA SILVA**

**DETECÇÃO *IN SITU* DE CITOCINAS DE PERFIL TH1 E TH2 POR  
IMUNOISTOQUÍMICA E RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS NAS FORMAS POLARES DA DOENÇA DE HANSEN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.  
Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

**BELÉM**

**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA**

---

Silva, Dayse Danielle de Oliveira.

Detecção *in situ* de citocinas de perfil TH1 e TH2 por imunistoquímica e relação com a atividade de macrófagos nas formas polares da doença de Hansen/ Dayse Danielle de Oliveira Silva; orientador, Juarez Antônio Simões Quaresma — 2009.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2009.

1. Hanseníase. I Quaresma, Juarez Antônio Simões, orient. II. Título.

CDD - 22. ed. 616.998

---

**DAYSE DANIELLE DE OLIVEIRA SILVA**

**DETECÇÃO *IN SITU* DE CITOCINAS DE PERFIL TH1 E TH2 POR  
IMUNOISTOQUÍMICA E RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DE  
MACRÓFAGOS NAS FORMAS POLARES DA DOENÇA DE HANSEN**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais. Examinado pela comissão formada pelos professores:

---

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma (Orientador)  
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Edna Aoba Yassui Ishikawa  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hellen Thais Fuzzi  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cléa Nazaré Carneiro Bichara  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana Maria Feio Libonati (Suplente)  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

*Aos meus pais Genival da Silva e Josefa Dória de Oliveira Silva, por todo amor, todo exemplo e toda paciência.*

*A Júlia e Elysson, pelo presente que vocês representam em minha vida.*

*Aos meus avós José Francisco da Silva e Maria das Neves Silva (in memoriam) e Vicente Fernandes de Oliveira (in memoriam) e Júlia Luiz de Oliveira por todos os ensinamentos transmitidos através de gerações,*

*dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as oportunidades que me foram dadas, pelas bênçãos de cada dia, pela vida.

Ao meu orientador, Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, pela dedicação, confiança e conhecimento transmitido.

Aos professores do curso de Pós-graduação em doenças Tropicais – UFPA, por serem verdadeiros exemplos de mestres, em especial Dr. Manuel Ayres, Dr. Sandro Percário, Dra. Edna Ishikawa, Dra Helen Fuzii e Dra. Luiza Carício.

À Dra. Rosana Feio Libonatti pela valiosa contribuição no tratamento estatístico dos dados.

Aos meus irmãos Bruno, Fábio, Diogo e Eliana que contribuíram na organização, formatação e correção ortográfica do trabalho e pelo amor fraternal sempre.

Às bibliotecárias do Núcleo de Medicina Tropical – UFPA, Marta Gonzaga e Valdenira Moreira, pela valiosa contribuição na revisão das citações e referências.

Às secretárias do Núcleo de Medicina Tropical – UFPA, Socorro Cardoso e Martinha Rocha, pela paciência e dedicação ao curso.

Aos amigos e colegas de curso, em especial Lucieny da Silva Pontes, pelo incentivo e exemplo de vida acadêmica.

Principalmente a todos os pacientes, que na tentativa de minimizar suas dores, contribuem com o trabalho daqueles que buscam por conhecimentos acerca da doença.

## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de evolução lenta e progressiva, com grande incidência e prevalência nos estados que compõem a Amazônia legal onde o Pará ocupa lugar de destaque no número de casos no contexto nacional. A fim de se avaliar o perfil de citocinas e a atividade de macrófagos nas formas polares da hanseníase e correlacionar com os seus aspectos histopatológicos, foi realizado um estudo transversal com uma amostra composta por 29 pacientes portadores de uma das formas polares da hanseníase, tuberculoide ou virchowiana, dos quais foram colhidas biópsias de pele de lesões hansênicas. Pode-se observar, através da análise imunoistoquímica deste material que os grupos estudados não apresentaram diferença significativa quanto aos níveis de IL-10, TGF- $\beta$ , CD68, iNOS e Lisozima. Os níveis de IL-4 não foram expressivos nos tecidos analisados e os níveis de IFN- $\gamma$  foram maiores nos pacientes do grupo MHV. No polo virchowiano todas as citocinas tiveram uma tendência a uma correlação negativa com a atividade de macrófagos, no polo tuberculoide a IL-10 apresentou uma tendência à correlação negativa com os níveis de iNOS, IFN- $\gamma$  e lisozima, evidenciando uma inibição da atividade macrofágica por esta citocina. Pode-se concluir que não há diferença na expressão de citocinas de perfil TH1 e TH2 nas formas polares da doença de Hansen e as citocinas apresentam uma tendência a correlação negativa com a atividade de macrófagos no pólo MHV e uma tendência a correlação positiva no pólo MHT. Novas pesquisas são necessárias para esclarecer como populações apresentam mais susceptibilidade à hanseníase que outras, um estudo semelhante com um maior número de indivíduos poderá ter resultados mais expressivos.

Palavras chaves: Hanseníase, imunoistoquímica, citocinas, atividade macrofágica.

## ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease that has a slow and progressive evolution, with high incidence and prevalence in the states that compose the Legal Amazon. Considering the number of cases, the Pará state plays a prominent role in the national context. In order to evaluate the cytokine profile and the macrophages activity in the polar forms of leprosy and correlate with their histopathological aspects, a transversal study was performed, with a sample of 29 patients who had one of the polar forms of leprosy, namely tuberculoid or virchowian, from who skin biopsies of leprosy lesions were taken. It could be observed, through the analysis of this immunohistochemical material, that the studied groups showed no significant variation in the levels of IL-10, TGF- $\beta$ , CD68, iNOS and Lysozyme. The levels of IL-4 were not expressive in the analyzed tissues and the levels of IFN- $\gamma$  were higher in patients in the MHV group. In the virchowian pole, all cytokines tended towards a negative correlation with the macrophages activity. In the tuberculoid pole, the level of IL-10 showed a negative correlation with the levels of iNOS, IFN- $\gamma$  and lysozyme, indicating a macrophage activity inhibition for this cytokine. It can be concluded that there is no difference in cytokine expression of TH1 and TH2 profile in polar forms of Hansen's disease and cytokines have a tendency to negative correlation with the activity of macrophages in MHV pole and a tendency to positive correlation in the pole MHT. Further research is needed to clarify why some populations have more susceptibility to leprosy than others. A similar study with a larger number of individuals may have a more significant outcome.

Key words: Leprosy, immunohistochemistry, cytokines, macrophage activity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de prevalência da hanseníase no início de 2007 .....	15
Figura 2 – Coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes, regiões e Brasil, 2001 – 2007 .....	16
Figura 3 – <i>Mycobacterium leprae</i> .....	22
Figura 4 – Disseminação da hanseníase no mundo .....	23
Figura 5 – Representação da variação da resposta imunológica ao longo do espectro da classificação de Ridley & Jopling .....	32
Figura 6 – Hanseníase indeterminada .....	33
Figura 7 – Criança com hanseníase .....	35
Figura 8 – Espessamento do nervo auricular .....	36
Figura 9 – Hanseníase lepromatosa .....	37
Figura 10 – Hanseníase Boderline ou Dimorfa .....	38
Figura 11 – Distribuição da amostra segundo a classificação em MHV e MHT .....	54
Figura 12 – Secção de pele de paciente do grupo MHV, coloração HE .....	54
Figura 13 – Secção de pele de paciente do grupo MHT, coloração HE .....	55
Figura 14 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para CD68 .....	57
Figura 15 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para IFN- $\gamma$ .....	58
Figura 16 – Comparação entre os níveis de IFN- $\gamma$ MHV x IFN- $\gamma$ MHT .....	58
Figura 17 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para IL-4 .....	59
Figura 18 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para IL-10 .....	60
Figura 19 – Comparação entre os níveis de IL-10 MHV x IL-10 MHT .....	60
Figura 20 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para iNOS .....	61
Figura 21 – Comparação dos níveis de iNOS MHV x iNOS MHT .....	62
Figura 22 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para TGF- $\beta$ .....	63
Figura 23 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para Lisozima .....	64

Figura 24 – Correlação entre CD68 MHV x IFN-gama MHV .....	65
Figura 25 – Correlação entre CD68 MHV x IL-10 MHV .....	65
Figura 26 – Correlação entre CD68 MHV x TGF- $\beta$ MHV .....	66
Figura 27 – Correlação entre iNOS MHV x IFN-gama MHV .....	66
Figura 28 – Correlação entre iNOS MHV x IL-10 MHV .....	67
Figura 29 – Correlação entre iNOS MHV x TGF- $\beta$ MHV .....	67
Figura 30 – Correlação entre Lisozima MHV x IFN-gama MHV.....	68
Figura 31 – Correlação entre Lisozima MHV x IL-10 MHV.....	68
Figura 32 – Correlação entre Lisozima MHV x TGF- $\beta$ MHV .....	69
Figura 33 – Correlação entre CD68 MHT x IFN-gama MHT .....	69
Figura 34 – Correlação entre CD68 MHT x IL-10 MHT .....	70
Figura 35 – Correlação entre CD68 MHT x TGF- $\beta$ MHT .....	70
Figura 36 – Correlação entre iNOS MHT x IFN-gama MHT .....	71
Figura 37 – Correlação entre iNOS MHT x IL-10 MHT .....	71
Figura 38 – Correlação entre iNOS MHT x TGF- $\beta$ MHT .....	72
Figura 39 – Correlação entre Lisozima MHT x IFN-gama MHT.....	72
Figura 40 – Correlação entre Lisozima MHT x IL-10 MHT.....	73
Figura 41 – Correlação entre Lisozima MHT x TGF-B MHT.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para marcação imunoistoquímica.....	52
Tabela 2 – Distribuição da amostra segundo a classificação em MHV e MHT.....	54
Tabela 3 – Descrição da amostra quanto a imunomarcação de citocinas de perfil TH1 e TH2 e marcadores de atividade macrofágica.....	56
Tabela 4 – Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de CD68 MHVxCD68 MHT.....	56
Tabela 5 – Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de IFN- $\gamma$ MHV x IFN- $\gamma$ MHT.....	57
Tabela 6 – Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de IL-10 MHV x IL-10 MHT.....	59
Tabela 7 – Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de iNOS MHV x iNOS MHT.....	61
Tabela 8 – Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de TGF- $\beta$ MHV x TGF- $\beta$ MHT.....	62
Tabela 9 – Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de Lisozima MHV x Lisozima MHT.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos  
BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente  
BL – Boderline Lepromatoso  
BT – Boderline Tuberculoide  
CTLs – Linfócito T Citotóxicos  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ELISA – Técnica de Imunoabsorção Ligada a Enzima  
ENH – Eritema Nodoso Hansênico  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
HI – Hanseníase Indeterminada  
HL – Hanseníase Lepromatosa  
HT – Hanseníase Tuberculoide  
HV – Hanseníase Virchowiana  
IgM – Imunoglobulina M  
IgE – Imunoglobulina E  
iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida  
IL-1 – Interleucina 1  
IL-2 – Interleucina 2  
IL-4 – Interleucina 4  
IL-5 – Interleucina 5  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-12 – Interleucina 12  
IL-13 – Interleucina 13  
IL-18 – Interleucina 18  
LAM – Lipoarabinomanana  
LIR – *Immunoglobulin-like receptor*  
MB – Multibacilares  
MHC – Complexo de Histocompatibilidade  
MHD – Mal de Hansen Forma Dimorfa  
MHI – Mal de Hansen Forma Indeterminada  
MHT – Mal de Hansen Forma Tuberculoide  
MHV – Mal de Hansen Forma Virchowiana

*M. leprae* – *Mycobacterium leprae*

MPLA – Teste de Aglutinação de Partículas

NK – *Natural Killer*

NRAMP – *Natural resistance associated macrophage proteins*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PACRG – *Parkin co-regulated gene*

PB - Paucibacilares

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PGL -1 – Glicolipídio fenólico 1

PPD – Derivado de Proteína Purificado

PQT – poliquimioterapia

PRR – Receptores de reconhecimento de padrão

RNI – Reativos Intermediários do Nitrogênio

ROI – Reativos Intermediários do Oxigênio

RR – Reação Reversa

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TGF- $\beta$  – Fator Transformador de Crescimento Beta

TLRs – *Toll like receptors*

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	20
3.1 OBJETIVO GERAL .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
4.1 CONCEITO DA HANSENÍASE .....	21
4.2 AGENTE ETIOLÓGICO .....	21
4.3 HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO DA HANSENÍASE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO E NO ESTADO DO PARÁ .....	22
<b>4.3.1 A hanseníase no estado do Pará</b> .....	24
4.4 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE .....	27
<b>4.4.1 Esfregaços de pele</b> .....	27
<b>4.4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)</b> .....	27
<b>4.4.3 Reação de Mitsuda</b> .....	28
<b>4.4.4 Testes sorológicos</b> .....	28
4.4.4.1 Técnica de Imunoabsorção Ligada a Enzima (ELISA) .....	29
4.4.4.2 Teste Dipstick ou Teste de Fita Simples .....	30
4.4.4.3 Teste ML Flow: Teste do Fluxo Lateral .....	30
4.4.4.4 Teste de Aglutinação de Partículas (MPLA) .....	30
4.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE .....	30
<b>4.5.1 Classificação de Madri</b> .....	31
<b>4.5.2 Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)</b> .....	31
<b>4.5.3 Classificação de Ridley e Jopling</b> .....	32
<b>4.5.4 Formas clínicas</b> .....	33
4.5.4.1 Hanseníase Indeterminada (HI) .....	33
4.5.4.2 Hanseníase Tuberculoide (HT) .....	34
4.5.4.3 Hanseníase Lepromatosa (HL) .....	36
4.5.4.4 Hanseníase dimorfa (HD) .....	38
4.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E IMUNOPATOLÓGICOS .....	39
<b>4.6.1 Citocinas envolvidas no perfil de resposta imunológica TH1</b> .....	43
<b>4.6.2 Citocinas envolvidas no perfil de resposta imunológica TH2</b> .....	45

<b>4.6.3 Aspectos histopatológicos</b> .....	46
4.7 FATORES GENÉTICOS.....	48
<b>5 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	50
5.1 CASUÍSTICA .....	50
5.2 ASPECTOS ÉTICOS .....	50
5.3 TIPO DE ESTUDO .....	51
5.4 BIÓPSIAS DE PELE .....	51
5.5 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA .....	51
5.6 RELAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS PARA IMUNOISTOQUÍMICA..	52
5.7 ANÁLISE DAS LÂMINAS .....	52
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
<b>RESULTADOS</b> .....	54
<b>DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>APÊNDICE</b> .....	91
<b>ANEXO</b> .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da queda da prevalência mundial ocorrida nos últimos anos, após a instituição do tratamento através da poliquimioterapia (PQT) e do simples diagnóstico, a hanseníase ainda constitui um relevante problema de saúde pública, devido à sua magnitude e seu alto poder incapacitante, atingindo principalmente a faixa etária economicamente ativa (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GOULART et al., 2008; WHO, 2007).

Mesmo com a sua baixa contagiosidade, a doença continua a ser endêmica, atingindo uma população estimada entre 10 e 15 milhões de pessoas que vivem em países tropicais pobres (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005; SILVA, 2008; WHO, 2007).

No Brasil em 2006, segundo a Organização Mundial de Saúde, houve um aumento do número de novos casos. O país se encontra entre os quatro países, Brasil, República Democrática do Congo, Moçambique e Nepal, que ainda não conseguiram atingir a meta de eliminação da hanseníase. Estes países responderam por 23% dos 259.017 novos casos detectados no ano de 2006 (WHO, 2007).

No final 2006, a prevalência registrada da hanseníase nas Américas era de 64.715 doentes, sendo que nesse mesmo ano haviam sido detectados 47.612 novos casos. O Brasil se destaca por responder sozinho por mais de 90% desses valores, sendo o único país americano que ainda não atingiu a eliminação (AMARAL, 2008; WHO, 2007).

O Brasil ocupava, no início de 2007, o segundo lugar em números de novos casos da doença e da taxa de prevalência (Figura 1). A Índia detém o maior número absoluto de indivíduos infectados, apresentado 139.252 novos casos em 2006, país que possui população cerca de 5 vezes maior que a população brasileira, o que justifica sua baixa taxa de prevalência por 10.000 habitantes (WHO, 2007).



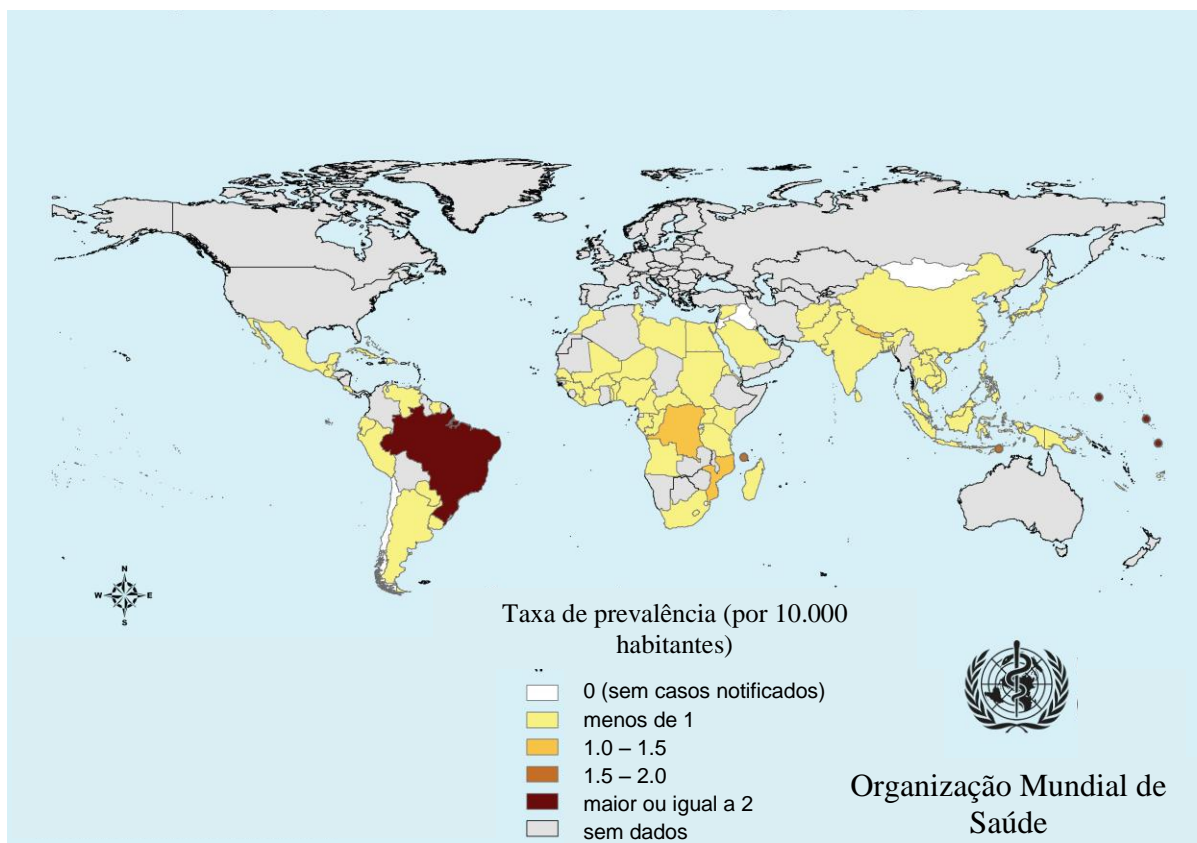


Figura 1- Taxa de prevalência da hanseníase no início de 2007, por 10.000 habitantes, segundo dados da Organização Mundial de Saúde.

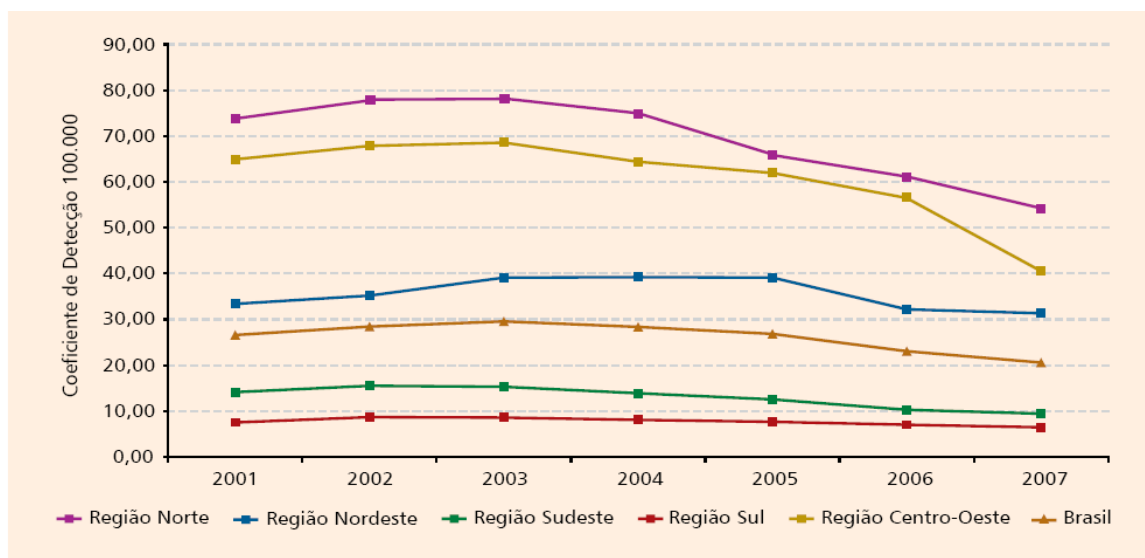
Fonte: WHO, 2007. adaptações do autor. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/PrevStart2007a.pdf>. Acesso em: 18 set. 2008.

A atual área de abrangência da Amazônia Legal corresponde à totalidade dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins e parte do estado do Maranhão (a oeste do meridiano de 44º de longitude oeste), com uma superfície de aproximadamente 5.217.423 km<sup>2</sup> correspondente a cerca de 61% do território brasileiro (BRASIL. SIVAM, 2008).

Esta região, formada por estados de grande extensão territorial, que possuem barreiras físicas e sociais dificultando a ação de serviços de saúde e que possibilitam uma situação endêmica da doença. Com uma população que corresponde a apenas 13% da população brasileira, é responsável, hoje, pela metade dos casos novos da doença entre os menores de 15 anos e 40% do total de casos novos em todo o Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A Região Norte, de acordo com a figura 2, apresentou em 2007 seu mais baixo coeficiente de detecção, com um valor de 54,5/100.000 habitantes, porém

ainda permanece com o maior coeficiente, destacando-se dentre as demais regiões brasileiras (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINAN/SVS, 2008).



Fonte: SINAN/SVS-MS

Figura 2 – Coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes, regiões e Brasil, 2001 – 2007. A Região Norte lidera o número de detecção de novos casos seguida da Região Centro-Oeste.

Fonte: BRASIL, Ministério da Saúde. SINAN/SVS-MS, 2008. Disponível em:

<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2009.

O Pará é o estado que apresenta maior incidência de hanseníase na América Latina, sendo os municípios de Sapucaia, Anapu e Jacundá os que apresentaram maior taxa de prevalência da doença em 2006 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS, 2006).

Em 2008, os municípios paraenses que notificaram um maior número de novos casos foram Parauapebas, Belém, Marabá e Itaituba, que associados aos demais municípios totalizaram 4.323 novos casos notificados no Estado (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINAN, 2009)

O Ministério da Saúde define como caso de hanseníase para tratamento a presença de dois ou mais desses sinais: lesão de pele com alteração de sensibilidade, espessamento neural e baciloscopia positiva (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A hanseníase, ou doença de Hansen, é uma doença infecciosa, crônica, granulomatosa, causada por um microorganismo intracelular, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta principalmente a pele, os olhos e o tecido nervoso, causando lesões cutâneas e neuropatias, que podem levar a deformidades físicas e alterações funcionais (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Suas características clínicas e histológicas irão depender da resposta imunológica do indivíduo infectado ao *M. leprae* e que podem variar de uma hanseníase tuberculoide à forma lepromatosa no outro polo (WALKER; LOCKWOOD, 2006; LOCKWOOD; COLSTON; KHANOLKAR-YONG, 2002).

A doença, em sua forma inicial, é classificada como grupo indeterminado, mal de Hansen forma indeterminada (MHI), que pode regredir espontaneamente ou evoluir para uma das principais formas da doença: hanseníase tuberculoide, mal de Hansen forma tuberculoide (MHT), hanseníase virchowiana, mal de Hansen forma virchowiana (MHV) e hanseníase dimorfa, mal de Hansen forma dimorfa (MHD), segundo a classificação de Madri (AMADOR, 2004; ARAÚJO, 2003; MENDONÇA et al., 2008).

A hanseníase tuberculoide e a hanseníase virchowiana são as duas formas polares e estáveis da doença. A primeira está relacionada com forte resposta imunológica celular, e a segunda, com resposta imunológica celular deficiente. A hanseníase dimorfa é uma forma clínica instável, em que o paciente apresenta uma mistura de características das duas formas estáveis, podendo um mesmo indivíduo apresentar episódios reacionais que variam em características clínicas das duas formas polares (ALVES et al., 2006; AMADOR, 2004).

Na hanseníase tuberculoide (HT) ocorre uma forte reação imunológica mediada por células com baixos níveis de anticorpos. O padrão de resposta imunológica das células T, que ocorre em alguns indivíduos nesse polo, é dado pela diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> *naive*, em células TH1, as quais ativam fagócitos para eliminar microorganismos ingeridos através da liberação do interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 2 (IL-2) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As células CD4<sup>+</sup>, na HT, serão encontradas principalmente dentro de granulomas formados por macrófagos, que expressam CD68, e em seu processo de fagocitose, as lisozimas e linfócitos sob a influência das citocinas, particularmente o TNF- $\alpha$ . As células CD8<sup>+</sup> são encontradas na superfície desses granulomas (WALKER; LOCKWOOD, 2006; ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003).

A resposta imunológica ocorrida no polo lepromatoso se dá através de um grande número de anticorpos específicos, mas com fraca resposta mediada por células ao *M. leprae*. O bacilo irá se proliferar dentro dos macrófagos e será detectado em grande número, resultando em lesões de pele e tecidos subjacentes (WALKER; LOCKWOOD, 2006; MENDONÇA et al., 2008).

Há pouca formação de granulomas. A diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> *naïve* em células TH2, apresentada por alguns indivíduos, promove a produção de IL-10, IL-4 e IL-13 o que acarretará na inibição da ativação dos macrófagos, levando a uma falha no controle da propagação dos bacilos e uma alta contagem de bactérias (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

O bacilo, em alguns indivíduos infectados, se propaga para nervos periféricos onde será fagocitado por células de Schwann e macrófagos ocasionando o dano neural ou neuropatia, responsável pela instalação de incapacidades físicas nestes indivíduos (GOMES; FRADE; FOSS, 2007).

A neuropatia periférica ocorre, então, como uma doença inflamatória dos nervos, com uma patogênese não muito bem compreendida, mas é evidente a importância do processo inflamatório na destruição das fibras nervosas (ANTUNES et al., 2006; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

## 2. JUSTIFICATIVA

Na região Amazônica observa-se um alto índice de prevalência da hanseníase. A situação de hiperendemicidade, associada às baixas condições socioeconômicas e ambientais, e agravada pelo elevado percentual de pacientes que apresentam incapacidades físicas em consequência da doença, podem interferir na qualidade de vida dos mesmos. Estas incapacidades têm sido responsável pelo estigma e discriminação dos doentes (AQUINO et al., 2003).

O Estado do Pará responde, atualmente, por 9% dos casos novos em todo o Brasil, se tornando de extrema relevância trabalhos de pesquisa no campo que visem esclarecer e dar resposta mais adequada ao problema (BRASIL. SINAN, 2009).

O sistema imunológico e os fatores genéticos do hospedeiro têm sido apontados como os principais responsáveis pela susceptibilidade para a hanseníase. As formas polares da hanseníase, lepromatosa e tuberculoide, serão apresentadas por indivíduos com diferentes padrões de resposta imunológica das células T a microorganismos intracelulares, o que se torna um fator determinante à progressão e ao prognóstico clínico da doença (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O arsenal terapêutico disponível na rede pública constitui-se de corticóides, talidomida e analgésicos. Outros medicamentos como imunossupressores representados por Azatioprina e Ciclosporina, além de antidepressivos, têm sido utilizados em pesquisas com resultados variáveis (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002, 2008). A necessidade de implementar estudos para desvendar mecanismos imunológicos e possibilitar novas opções terapêuticas para uma epidemia de alta prevalência é evidente.

A importância desta pesquisa, onde se pretende esclarecer os mecanismos imunológicos em lesões de pele de pacientes hansenianos, se justifica pelo fato de que os estudos acerca desses mecanismos foram realizados com células polimorfonucleares do sangue periférico e, no entanto, apesar de correlatas, essas respostas são parcialmente independentes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de citocinas e de marcadores teciduais da atividade de macrófagos nas formas polares da hanseníase correlacionando com os seus aspectos histopatológicos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Descrever as alterações histopatológicas presentes nas formas tuberculoide e lepromatosa da doença;
  
- Analisar o perfil citocínico do infiltrado inflamatório, através da imunomarcação para IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ;
  
- Correlacionar o perfil citocínico com a atividade de macrófagos pela imunomarcação de iNOS, lisozima e CD68.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 CONCEITO DA HANSENÍASE

A hanseníase, também conhecida como mal de Hansen, é uma doença infecciosa e contagiosa, lentamente progressiva, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) (BRASILEIRO FILHO, 2006; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Encontrada apenas no homem, sua transmissão ocorre pelo contágio interpessoal, através de aerossóis de lesões no trato respiratório superior e, além de comprometer pele e nervos periféricos, pode também se manifestar como uma doença sistêmica comprometendo articulações, olhos, testículos, gânglios e outros órgãos, resultando em lesões incapacitantes, com evolução crônica e surtos reacionais (BRASILEIRO FILHO, 2006; KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

### 4.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase (Figura 3), sofreu ao longo do tempo um processo evolutivo que o tornou um parasita intracelular. O seu genoma contém 1.614 genes que codificam as proteínas e 1133 pseudogenes, o maior número descrito de dados para uma bactéria. Por ter sido descrito por Hansen em 1874, o *M. leprae* também é conhecido como bacilo de Hansen. (ARAOZ et al., 2006; ALMEIDA et al., 2004; BEIGUELMAN, 2002).

Com um período médio de incubação que vai de 2 a 5 anos, o *M. leprae* pode infectar além do homem outros animais como tatus, chimpanzés e macacos. O bacilo é captado por macrófagos alveolares e dissemina-se através do sangue, mas cresce apenas nos tecidos relativamente frios da pele e membros (BRASILEIRO FILHO, 2006; KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005).

A forma do *M. leprae* (Figura 3) é de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1 a 8 microns de comprimento por 0,2 a 0,5 microns de largura. Cora-

se em vermelho pela fuscina e não se descora pela lavagem no álcool e ácido – é, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (BRASILEIRO FILHO, 2006; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos são vistos isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais denominados globias, peculiar do *M. leprae*, e resultam da sólida união de bacilos através de uma substância chamada gléia (BRASILEIRO FILHO, 2006; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

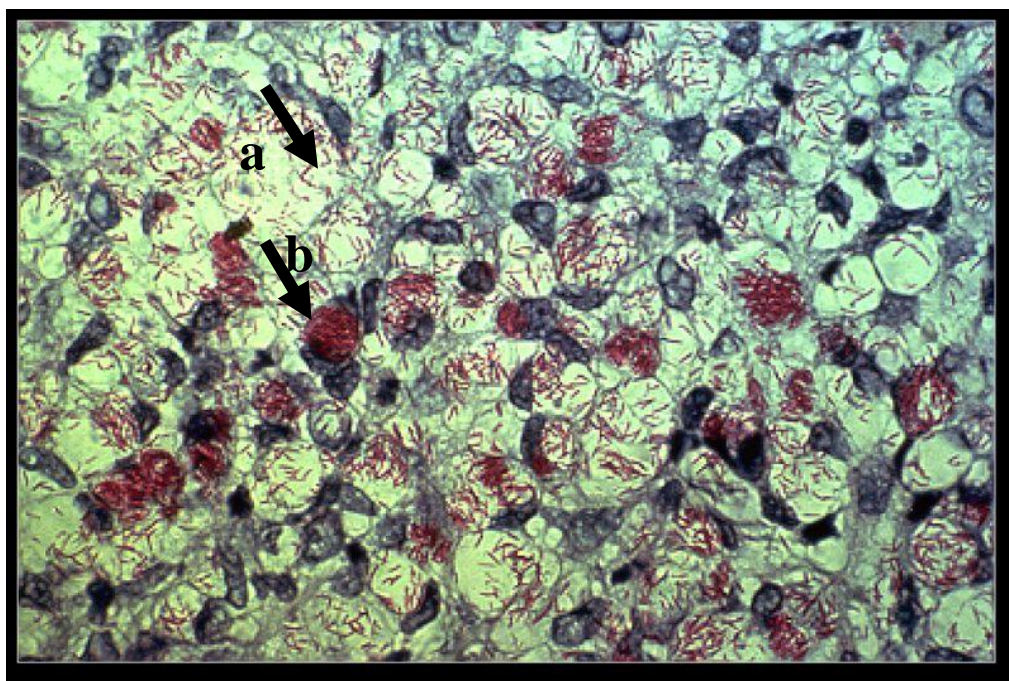


Figura 3 – *Mycobacterium leprae* (corados pela fuscina, vermelhos), a) vistos de forma isolada e b) em globias.

Fonte: Wikipedia. A enciclopédia livre. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:M\\_leprae\\_ziehl\\_nielsen2.jpg#file](http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:M_leprae_ziehl_nielsen2.jpg#file). Acesso em: 18 set. 2008.

#### 4.3 HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO DA HANSENÍASE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO E NO ESTADO DO PARÁ

Assim como em outras regiões da América, não havia hanseníase entre os indígenas brasileiros. Como citado por documentos de Araújo (1929), que através de experiências nas tribos Guarany e Kaingangs no Paraná, Tembés e Tymbiras no Pará (1917 e 1921) e Navachos em Arizona (1925) não identificou indígenas contaminados pela hanseníase (ARAÚJO, 1946).



Provavelmente, junto com os colonizadores europeus, entre os séculos XVI e XVII, chegaram às Américas os primeiros casos de hanseníase (Figura 4). Nos Estados Unidos, colonizados pelos franceses que deram origem ao estado de Louisiana e, na América do Sul, pelos colonos espanhóis e portugueses (ARAÚJO, 1946; AMADOR, 2004; EIDT, 2004).

A doença entrou no Brasil, por vários pontos do litoral, com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos. Os escravos africanos tiveram um papel ainda hoje questionável para a sua disseminação, já que era difícil a negociação de africanos que apresentassem lesões cutâneas; esta participação também é questionada por Moreira (1908) no início do século, ele afirmava que não existiam casos de lepra na costa da África no período, se manifestando apenas em 1817 (MOREIRA, 1908; ARAÚJO, 1956).

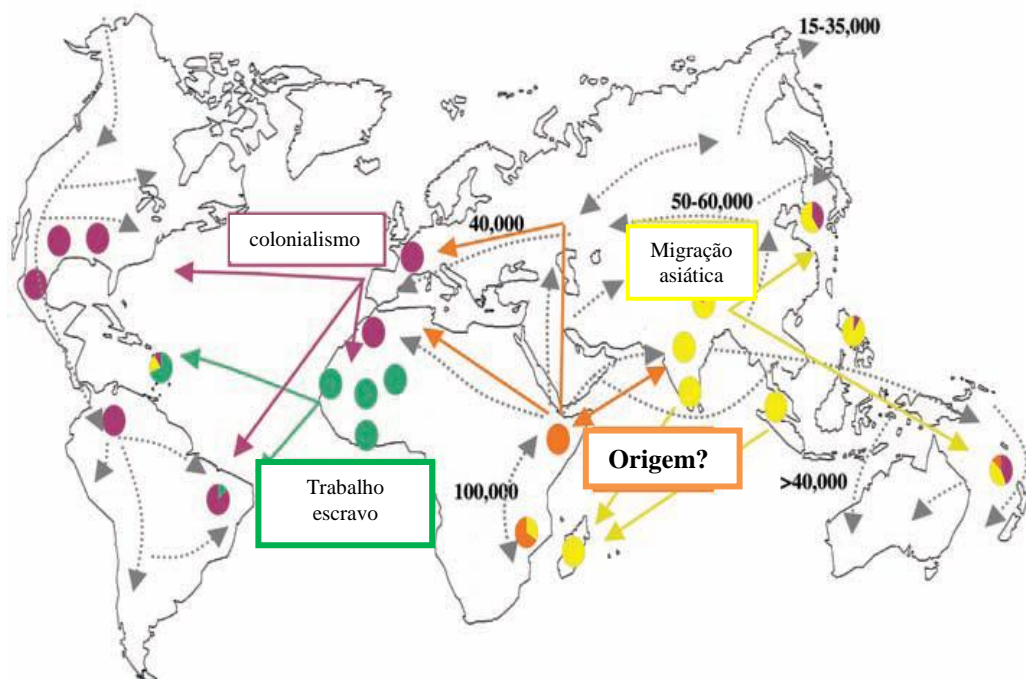


Figura 4 - Disseminação da hanseníase no mundo. Os círculos indicam o país de origem das amostras examinadas e sua distribuição e sua distribuição dentro dos quatro tipos SNP (single-nucleotide polymorphisms), os números indicam aproximadamente a idade em anos das amostras.

Fonte: adaptado de MONOT et al, 2005. Disponível em:

[www.sciencemag.org/cgi/content/full/308/5724/1040/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/308/5724/1040/DC1) Acesso em: 01 set. 2008.

No Brasil, os primeiros casos da doença foram notificados no ano de 1600 na cidade do Rio de Janeiro onde, anos mais tarde, em 1741, seria criado o primeiro leprosário ou lazareto, o Hospital dos Lázaros, local destinado a abrigar os doentes

de Lázaro, lazarentos ou leprosos, como eram conhecidos nesse período (EIDT, 2004; ARAÚJO, 1946).

Souza Campos, em 1942, descreve o primeiro documento que comprova a presença da doença no Brasil e que data de 4 de dezembro de 1697, no qual a Câmara do Rio de Janeiro pede aos reis de Portugal a instalação de um lazareto na igreja da Conceição, usando como justificativa o grande número de hansenianos que existia na cidade (SOUZA CAMPOS, 1942; OPROMOLLA, 2007).

#### **4.3.1 A hanseníase no estado do Pará**

No início do século XIX, D. Marco de Noronha e Brito (1803), na época governador geral do Grão-Pará, observou sério foco endêmico que ocorria em Santarém e solicitou junto a Mesa da Santa Casa de Misericórdia Paraense a assistência material e medicamentosa aos doentes (ARAÚJO, 1946; MAGALHÃES; ROJAS, 2005).

Visto o grande número de indivíduos acometidos pelo mal de Hansen no Estado, em 1816 aconteceu, em uma fazenda na foz do Igarapé-Tucunduba, onde funcionava uma olaria, a adaptação do lugar com recursos provenientes da Santa Casa e de loterias anuais do Estado, para a fundação do “Hospício dos Lázaros de Belém do Pará” (ARAÚJO, 1946).

Este local não isolava adequadamente os doentes já que através de documento expedido em 1833 pelo provedor da Santa Casa ao Marechal Soares de Andréa solicitando a mudança do hospício de Tucunduba para a Ilha de Tatuóca ou para Caratatuba, se teve o conhecimento que os leprosos mantinham contato com moradores de sítios vizinhos e que existiam escravos ainda trabalhando na olaria, isso se tornava um fator importante para a disseminação da doença naquele período (ARAÚJO, 1946).

Santos (2003), relata que a população nativa teria usado uma substância obtida da açacu (substância conhecida como *Hura Brasiliensis de Martius* e original do Pará) no tratamento de um paciente com lepra em estágio avançado. Esta

substância, passou a ser utilizada, devido ao alto índice de mortalidade no Hospital de Tucunduba, em Belém, na província do Pará, como tentativa de cura. Eram utilizados além do preparado de açacu outros ingredientes da vegetação nativa.

Várias foram as tentativas de desativar o abrigo. No ano de 1839 houve a autorização da transferência do hospício de para a Fazenda do Pinheiro, mas não foi realizada e, em 1855, ainda sob a manutenção da Santa Casa de Misericórdia, já abrigava 77 internos (ARAÚJO, 1946).

No final do século XIX, a realidade do hospício de Tucunduba, ainda administrado pelo Estado através da Santa Casa, era um local sem higiene e sem ventilação (ARAÚJO, 1956).

Em 1918 foi feito um relatório da frequência da lepra no Estado do Pará pelo Dr. Jayme Aben-Athar, primeiro estudo epidemiológico que se tem conhecimento sobre esta doença no referido Estado, onde ele descrevia o aumento considerável do número de casos e investigava os fatores como sexo, raça, faixa etária e quadro clínico predominante. Havia uma predominância no sexo masculino, em brancos e mestiços e na faixa etária de 11 a 20 anos, além de prevalecer o tipo lepromatoso. Devido à falta de notificação compulsória na época, os dados foram obtidos através do próprio Hospício dos Lázaros em Tucunduba. (ARAÚJO, 1956).

Em seu estudo, o Dr. Aben-Athar (1918) concluiu que a lepra entre os paraenses se contraía nos primeiros anos de vida e que o contágio também poderia conferir uma imunidade, uma espécie de auto-vacinação, que se traduzia pelo pequeno número de adultos nativos com a moléstia.

No acordo firmado entre os estados para a execução da profilaxia da lepra, em 30 de dezembro de 1920, entre as suas cláusulas, encontrava-se uma que autorizava o financiamento para a construção do primeiro leprosário federal, Lazarópolis do Prata, no estado do Pará, este já se destacava como um foco importante da doença no contexto nacional (ARAÚJO, 1956).

Na III Conferência Internacional de Leprologia ocorrida em Estrasburgo, França em 1923 foi citado pelo então delegado do Brasil, Professor Eduardo Rabello, inspetor de Profilaxia da Lepra e das doenças venéreas, que existiam no Brasil dois focos principais da hanseníase, um no norte, nos estados do Pará e Maranhão, e outro no centro, nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ARAÚJO, 1956).

O Lazarópolis do Prata foi fundado em 1924 após uma visita de Souza-Araújo no Hospício dos Lázaros de Tucunduba, localizado no bairro do Guamá no município de Belém, onde observou alagamentos constantes no período de inverno. Decidiu então que o Instituto do Prata, localizado no município de Igarapé-Açu seria o local ideal para a instalação da primeira colônia agrícola fundada no Brasil e recebeu o apoio do governo Souza Castro (AMADOR, 2004; ARAÚJO, 1924; 1956)

Embora existisse um grande número de internos no Lazarópolis do Prata, as taxas da doença, incidência e prevalência, continuavam altas o que levava a uma situação preocupante. Um novo abrigo, mais próximo da capital, onde se concentrava um grande número de doentes, foi inaugurado, tratava-se da “Colônia de Marituba” em 1942, localizada na época no município de Ananindeua, onde até os dias de hoje funciona a Unidade Especial Abrigo João Paulo II, ainda referência estadual no tratamento da hanseníase. Os doentes do interior ainda eram encaminhados para a Colônia do Prata (GAMA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2004).

A política de controle da hanseníase propôs a extinção das colônias de leprosos no país em 1976, uma vez que não havia mais necessidade de segregar ou isolar os doentes e sim tratá-los ambulatorialmente (GAMA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2004).

Atualmente todos os países sul-americanos têm hanseníase com exceção do Chile. O Brasil é o que apresenta a prevalência mais alta. (WHO, 2007).

A taxa de prevalência da hanseníase no Brasil caiu de 19 casos/10.000 habitantes, em 1985, para 1,48 casos em 2005. No início de 2007, o Brasil encontrava-se entre os principais países que não conseguiram atingir a meta de

menos de uma caso para 10.000 habitantes, ficando em primeiro lugar em taxa de prevalência e incidência. Embora tenha ocorrido um significativo decréscimo, a doença mantém-se como um problema de saúde pública no país (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Devido ao aumento significativo na prevalência registrada no início de 2007 atividades têm sido feitas para melhorias na qualidade dos cuidados, e expansão da cobertura de serviços de atenção especializada, principalmente em nível de periferia (WHO, 2007).

#### 4.4 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

O diagnóstico de caso de hanseníase na atenção básica de saúde é essencialmente clínico por meio do exame dermatoneurológico para identificar lesões ou áreas de pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos (sensitivo, motor e/ou autonômico) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; 2007).

Os casos com suspeita de comprometimento neural sem lesão cutânea (suspeita de hanseníase neural pura) e aqueles que apresentam área(s) com alteração sensitiva e/ou autonômica sem lesão cutânea evidente deverão ser encaminhados para unidades de saúde de maior complexidade para confirmação diagnóstica (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; 2007).

##### 4.4.1 Esfregaços de pele

A confirmação diagnóstica consiste na detecção microscópica do bacilo em esfregaços teciduais, corados pelo método Ziehl-Neelsen, associado com a evolução clínica e histopatológica (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

##### 4.4.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido utilizada para amplificar várias sequências genômicas do *M. leprae*

para melhorar a detecção do gene quando baixos números da bactéria estão presentes (ALMEIDA et al., 2004).

A PCR é um método rápido, fácil e confiável para a investigação de rotina da infecção por micobactéria, mesmo quando a doença ainda é assintomática. O diagnóstico pode ser obtido a partir de simples biópsia ambulatorial e secreção nasal (PONTES et al., 2008; SANTOS et al., 2007).

#### **4.4.3 Reação de Mitsuda**

A mitsudina, nome adotado no Brasil para a lepromina, é uma suspensão esterilizada de bacilos de Hansen mortos pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas de pacientes virgens de tratamento ou de tecidos de tatus infectados por *M. leprae* (BEIGUELMAN, 2002).

A denominação mitsudina foi adotada no Brasil para homenagear Kensuke Mitsuda, o primeiro a relatar, na III Conferência Internacional de Hanseníase, realizada em 1923, em Estrasburgo, os resultados das experiências em larga escala com a suspensão de *M. leprae*, que ele vinha fazendo (MITSUDA, 1923). Atualmente, a preparação da mitsudina obedece a normas de padronização e segurança recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (TALHARI et al., 2006).

A reação de Mitsuda é, regra geral, permanentemente negativa em indivíduos com hanseníase virchowiana, predominantemente positiva em indivíduos com hanseníase tuberculoide e frequentemente negativa em pacientes dimorfos. Nos pacientes com hanseníase indeterminada, a distribuição das respostas positiva e negativa variam de acordo com a amostra estudada (BEIGUELMAN, 2002).

#### **4.4.4 Testes sorológicos**

Os PGL I, II e III são antígenos agrupados em polipeptídeos, lipossacarídeos, glicolipopeptídeos e glicolipídios fenólicos. Esses antígenos conferem especificidade às micobactérias. Os PGL-I são antígenos mais específicos

do *M. leprae* e interferem na resposta imunológica do hospedeiro (HUNTER; BRENNAN, 1981).

O PGL-I pode ser detectado em tecidos infectados de seres humanos e de tatus, indicando que esses componentes podem persistir por longo período, mesmo após o bacilo ter sido degradado e eliminado. A porção terminal 3,6 – di-O-metil glucose do PGL-I ainda não foi detectada em nenhuma outra molécula natural constituindo-se na chave para a alta especificidade da resposta humoral durante o processo de infecção (MADEIRA, 2000).

Na hanseníase virchowiana, a produção dos antígenos PGL-I e LAM (Lipoarabinomanana) pelo bacilo, no interior do macrófago, favorecem o escape do mesmo à oxidação intramacrofágica, pois estes possuem função supressora da atividade do macrófago e permitem a sua disseminação, caracterizado por um alto índice bacilar (ARAÚJO, 2003; DOUGLAS et al., 2004 ).

Diversos autores têm utilizado o PGL-I, assim como antígenos semi-sintéticos, para detecção precoce da hanseníase, em pacientes com infecções subclínicas e em contatos domiciliares, utilizando-se de métodos diagnósticos sorológicos. Ambos, PGL-I nativo e o açúcar sintético, são capazes de reagir com IgM de modo específico em pacientes com hanseníase (AMADOR, 2004; ARAOZ et al. 2006; BUHRER-SEKULA et al., 2003; DUTHIE, et al., 2007; ESCOBAR-GUTIÉRREZ et al., 1993).

#### 4.4.4.1 Técnica de Imunoabsorção Ligada a Enzima (ELISA)

O ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA, enzyme linked immunoabsorbent assays) é realizado fixando-se o anticorpo (ou antígeno) a uma superfície, geralmente a uma placa com orifícios, e a amostra do teste é aplicada, o material ligado é detectado por um segundo anticorpo marcado enzimaticamente. Baseia-se na resposta dos anticorpos IgM ao glicolípido fenólico específico ao *M.leprae* (PGL-I) (BOBROW et al., 1989; DOUGLAS et al., 2004; DUTHIE et al., 2007; GROATHOUSE et al., 2006).

#### 4.4.4.2 Teste Dipstick ou Teste de Fita Simples

Este teste sorológico, que pode ser utilizado para diagnóstico auxiliar, classificação, identificação de contatos com alto risco de desenvolver a hanseníase e inquéritos epidemiológicos, baseia-se na identificação de anticorpos IgM específicos para o epítipo imunodominante 3,6-di-O-dimetil-glicopirasonil do componente trissacarídeo do antígeno glicolípido fenólico PGL-I do *M. leprae* (BUHRER-SEKULA et al., 2000; BUHRER-SEKULA et al., 2001).

#### 4.4.4.3 Teste ML Flow: Teste do Fluxo Lateral

O ML Flow foi desenvolvido com a finalidade de se detectar rapidamente os anticorpos IgM específicos ao *M. leprae* no soro humano, ou em amostras de sangue total. É um instrumento prático para a vigilância epidemiológica da hanseníase e a classificação dos pacientes hansênicos objetivando adequar o tempo de tratamento (BUHRER-SEKULA et al., 2003; GOULART et al., 2008).

#### 4.4.4.4 Teste de Aglutinação de Partículas (MPLA)

O Teste de Aglutinação de Partículas (MPLA) baseia-se na aglutinação de glóbulos de gelatina recobertos por uma camada de trissacarídeo sintético pelos anticorpos anti-PGL-I e tem como princípio básico a reação antígeno anticorpo. Pode ser utilizado para grandes inquéritos epidemiológicos e em laboratórios pouco equipados. Trata-se de teste prático e rápido e que não necessita de equipamentos de alta tecnologia (ESCOBAR-GUTIÉRREZ et al., 1993; IZUMI et al., 1990).

### 4.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

A hanseníase mostra um complexo espectro de formas clínicas. Considerada uma doença bipolar ela passa a ser determinada pela resposta imunológica celular do hospedeiro, se apresentando no homem com multiplicidade de sinais e sintomas, relacionados ao tempo de tratamento adequado, o que resultou em várias classificações propostas ao longo dos anos. Numerosos critérios



foram propostos na tentativa de abordar seus aspectos clínicos, evolutivos, terapêuticos e prognósticos (BRASILEIRO FILHO, 2006; PARDILLO et al., 2007).

#### **4.5.1 Classificação de Madri**

Em 1953, o VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madrid, estabeleceu a classificação de hanseníase segundo sua tendência de evoluir em direção a um dos seus polos, encontrando-se duas formas polares e dois grupos: formas tuberculoide e virchowiana e grupos indeterminados e dimorfo (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953).

Segundo este evento, a classificação dos casos de lepra deveria se basear em critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1960).

A classificação tem início com uma forma precoce ou indeterminante da doença chamada de hanseníase indeterminada (HI). A hanseníase tuberculoide (HT) e a hanseníase lepromatosa (HL), esta última também conhecida como virchowiana, são as duas formas polares e estáveis da doença. Entre os polos HT e HL, existem as formas instáveis da lepra, são elas borderline tuberculoide, borderline borderline e borderline lepromatosa (BT, BB, e BL, respectivamente) (BRASILEIRO FILHO, 2006; GOMES; FRADE; FOSS, 2007; OPROMOLLA, 2005).

#### **4.5.2 Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)**

Com objetivo de simplificar e facilitar a aplicação dos protocolos terapêuticos, através do uso da poliquimioterapia, a OMS já propôs diferentes classificações. Atualmente, os pacientes são divididos em dois grupos, por meio da contagem de lesões cutâneas. Os casos de hanseníase com até cinco lesões de pele são classificados como paucibacilares (PB), e aqueles com seis ou mais lesões cutâneas como multibacilares (MB). A baciloscopia, quando for realizada e positiva, classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões cutâneas (AMADOR, 2004).

O Ministério da Saúde do Brasil propôs o modelo operacional de classificação, designando como paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), para os pacientes com baciloscopia negativa e positiva respectivamente (GOMES; FRADE; FOSS, 2007).

#### 4.5.3 Classificação de Ridley e Jopling

Na década de 1960 Ridley e Jopling propuseram um esquema de classificação com base histológica para a hanseníase que variavam em severidade, o que representou um avanço no entendimento da patologia da hanseníase (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Os grupos foram divididos segundo os critérios clínicos, histológicos, bacteriológicos e imunológicos. É considerada atualmente a mais precisa, sendo a mais utilizada em pesquisa (SILVA, 2008).

O esquema proposto na figura 5 correlaciona as características clínicas, imunológicas e patológicas e suas subdivisões com o número de bacilos ácidos-resistentes presentes na derme, geralmente expressados em uma escala logarítmica pelo índice baciloscópico (PARDILLO et al., 2007).

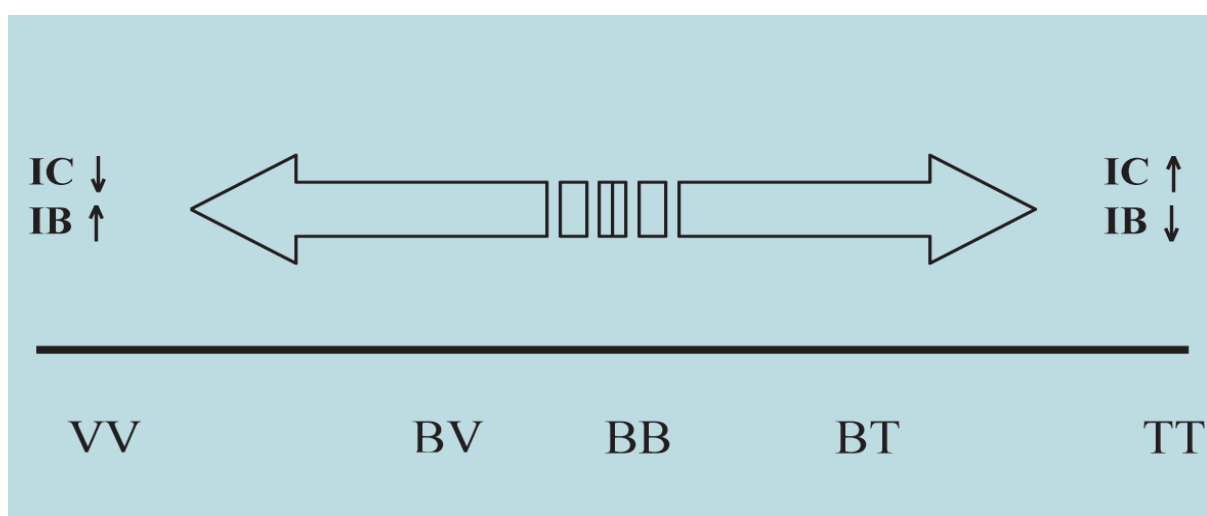


Figura 5 - Representação da variação da resposta imunológica ao longo do espectro da classificação de Ridley & Jopling; a imunidade celular (IC) é inversamente proporcional ao índice baciloscópico (IB) VV – forma clínica virchowiana; BV, BB, BT – formas clínicas borderline; TT – forma clínica tuberculoide.

Fonte: Mendonça et al., 2008.

## 4.5.4 Formas clínicas

### 4.5.4.1 Hanseníase Indeterminada (HI)

As lesões da hanseníase indeterminada (HI), que é considerada uma forma precoce ou indeterminante da doença, surgem após um período de incubação que varia, em média, de dois a cinco anos. Estas lesões podem evoluir para a cura ou para outras formas clínicas, em qualquer ponto do espectro (ARAÚJO, 2003; GUNATILAKE; SETTINAYAKE, 2004).

Esta forma da doença caracteriza-se pelo aparecimento de uma única ou um número muito pequeno de manchas hipocrômicas (Figura 6), que podem se localizar em qualquer área e com discreta alteração de sensibilidade, como áreas de hipoestesia discreta na pele, e a transpiração ou crescimento de pelos nessas áreas geralmente não são alteradas (ARAÚJO, 2003; BRASILEIRO FILHO, 2006; PARDILLO et al., 2007).



Figura 6 - Hanseníase indeterminada. Mancha hipocrômica na face posterior do antebraço, próximo à articulação do cotovelo (realçada pela elipse).  
Fonte: Dermatology Atlas. Disponível em: <<http://www.atlasdermatologico.com.br/>> Acesso em: 20 fev. 2009.

Na maioria dos indivíduos infectados, apenas a sensibilidade térmica encontra-se ausente. Não há comprometimento de troncos nervosos nesta forma

clínica, apenas de ramúsculos nervosos cutâneos. A pesquisa de BAAR revela-se negativa, podendo ser também classificada como paucibacilar (BRASILEIRO FILHO, 2006; PARDILLO et al., 2007).

#### 4.5.4.2 Hanseníase Tuberculoide (HT)

Os pacientes que se encontram no polo tuberculoide da doença são caracterizados por uma forte resposta imunológica local mediada por células e um índice baciloscópico próximo de zero nas lesões (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Nesta forma clínica, pode-se encontrar uma única lesão ou ainda lesões cutâneas localizadas aleatoriamente, bem delimitadas, em número reduzido, e anestésicas. O tamanho das lesões pode variar de menos de 1 centímetro de diâmetro até aquelas que recobrem toda a superfície de uma estrutura do corpo como bochechas, coxas ou nádegas (GUNATILAKE; SETTINAYAKE, 2004).

A princípio as lesões apresentam-se planas e eritematosas, mas aumentando e desenvolvendo formas irregulares com margens endurecidas, delimitadas, elevadas e hiperpigmentadas e no centro hipocrômicas, com perda sensorial. Seu crescimento centrífugo lento leva à atrofia no interior da lesão, que pode, ainda, assumir aspecto tricofitóide, com descamação das bordas, o que é característico da hanseníase tuberculoide (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005; PARDILLO et al., 2007).

Observam-se, ainda, a variedade infantil (Figura 7) e a forma neural pura (Figura 8). A primeira manifesta-se em crianças conviventes com portadores de formas bacilíferas e localiza-se principalmente na face. Pode se manifestar como nódulos, placas, lesões tricofitoides ou sarcoídicas (ARAOZ et al., 2006; KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005).



Figura 7 – Criança com hanseníase. Mancha característica, hipocrômica, geralmente única, localizada na face (seta).

Fonte: WHO, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>>. Acesso: 18 set. 2008.

As manifestações neurais da doença antecedem as cutâneas, como alterações sensitivas, com a perda da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. Com a progressão observam-se também alterações motoras e a presença de amiotrofias, retrações de tendões e diminuição da amplitude de movimento articular (BRASILEIRO FILHO, 2006; GOMES; FRADE; FOSS, 2007).

As manifestações neurológicas são variáveis dependendo da forma clínica de cada paciente e podem ser agravadas durante o tratamento poliquimioterápico. Isto se deve à maior exposição antigênica, ocasionada pela destruição bacilar provocada pela terapêutica. Podem existir danos aos troncos nervosos nas proximidades das lesões da pele, e por vezes um quadro doloroso associado a edema ou aumento de nervos periféricos caracterizando as neuropatias (GOMES; FRADE; FOSS, 2007; JARDIM et al., 2007).

Na forma neural pura, não se encontram lesões cutâneas, exceto áreas de hipoestésias. Há espessamento do tronco nervoso (Figura 8) e dano neural (GUANATILAKE; SETTINAYAKE, 2004; ANTUNES et al., 2006).



Figura 8 - Espessamento do nervo auricular. Forma neural pura. Seta indicando nervo com diâmetro visivelmente aumentado.

Fonte: GUNATILAKE; SETTINAYAKE, 2004. Disponível em: <<http://pn.bmj.com/cgi/reprint/4/4/194>>. Acesso em: 27 mar. 2008.

A HT, juntamente com a HI, constituem as formas paucibacilares da hanseníase. Apesar da possibilidade de cura espontânea na HT, a orientação é de que os casos sejam tratados para reduzir o tempo de evolução da doença e o risco de dano neural (ARAOZ et al., 2006; KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005).

#### 4.5.4.3 Hanseníase Lepromatosa (HL)

No polo lepromatoso ou Virchowiano, admite-se que a hanseníase possa evoluir a partir da forma indeterminada ou se apresentar como tal desde o início. Trata-se de forma multibacilar, reconhecida por corresponder ao polo de baixa resistência, dentro do espectro imunológico da doença e representa nos casos virgens de tratamento, importante foco infeccioso ou reservatório da doença (ARAÚJO, 2003; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Os pacientes apresentam um alto índice baciloscópico devido a uma fraca resposta imunológica sistêmica de células T e uma forte resposta humoral. Portanto, manifesta-se naqueles indivíduos que apresentam imunidade celular deprimida para o *M. leprae*. Sua evolução crônica caracteriza-se pela infiltração progressiva e difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo

afetar, ainda, os linfonodos, o fígado e o baço (ARAOZ et al., 2006; ANTAS et al., 2004b; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Na pele, descrevem-se pápulas, nódulos e máculas. A infiltração é difusa e mais acentuada na face e nos membros (Figura 9). A pele torna-se luzidia, xerótica, com aspecto apergaminhado e tonalidade semelhante ao cobre. Há rarefação dos pelos nos membros, cílios e supercílios. A queda de pelos nesse local chama-se madarose. A infiltração da face, incluindo os pavilhões auriculares, com madarose e manutenção da cabeleira, forma o quadro conhecido como fácies leonina (ARAOZ et al., 2006; ANTAS et al, 2004b; BRASILEIRO FILHO, 2006).



Figura 9 - Hanseníase lepromatosa. Infiltração difusa em membro inferior com lesões dermatológicas (pápulas, máculas e nódulos)

Fonte: Dermatology Atlas. Disponível em: <http://www.atlasdermatologico.com.br/> Acesso em: 20 fev. de 2009.

O comprometimento nervoso ocorre nos ramúsculos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos. Estes últimos vão apresentar deficiências funcionais e sequelas tardias. São sinais precoces de HV, a obstrução

nasal, rinorréia serossanguinolenta e edema de membros inferiores. (ARAOZ et al., 2006; BRASILEIRO FILHO, 2006; MENDONÇA et al., 2008).

#### 4.5.4.4 Hanseníase dimorfa (HD)

Caracterizada por sua instabilidade imunológica, podemos observar na hanseníase dimorfa uma grande variação em suas manifestações clínicas. Encontramos sinais patológicos, seja na pele, nos nervos ou ainda alterações sistêmicas, envolvendo outros órgãos. As lesões da pele revelam-se numerosas e a sua morfologia mescla aspectos de HV e HT, podendo haver predominância ora de um, ora de outro tipo, estas variações ocorrem devido aos fenômenos reacionais ou reações hansênicas (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Esta forma clínica, também conhecida como boderline, compreende placas eritematosas, manchas hipocrômicas com bordas ferruginosas, manchas eritematosas ou acastanhadas (Figura 10), com limite interno nítido e limites externos imprecisos, placas eritemato-ferruginosas ou violáceas, com bordas internas nítidas e limites externos difusos (lesões foveolares) (ARAÚJO, 2003; BRASILEIRO FILHO, 2006; SANTOS et al., 2005)..



Figura 10 - Hanseníase Boderline ou Dimorfa. Indivíduo apresentando placas eritematosas, bordas nítidas e interior hipocrômico.

Fonte: Dermatology Atlas. Disponível em: <http://www.atlasdermatologico.com.br/> Acesso em: 20 fev. de 2009.



Há infiltração assimétrica da face, dos pavilhões auriculares, e presença de lesões no pescoço e nuca. As lesões neurais são precoces, assimétricas e, com frequência, são incapacitantes. A pesquisa de BAAR pode ser negativa ou positiva com índice bacilar variável (ARAÚJO, 2003; SANTOS et al., 2005).

Nas reações hansênicas observamos uma variação da resposta imunológica do indivíduo ao patógeno e pode ocorrer de forma que é denominada de reação do tipo I ou reação reversa (RR), caracterizada por uma degradação progressiva da imunidade celular mediada por uma resposta humoral em paralelo com o aumento do índice baciloscópico, do tipo interpolar BT (boderline tuberculoide) em direção ao tipo interpolar BL (boderline lepromatoso) da hanseníase, que é marcado por uma melhoria da resposta imune celular, onde frequentemente ocorre dano neural, e tem maior incidência em indivíduos co-infectados e imunossuprimidos (ARAÚJO, 2003; JUNQUEIRA; CAIXETA, 2008; DEPS; LOCKWOOD, 2008).

É frequente alguns pacientes com hanseníase BL desenvolver uma reação do tipo II, ou eritema nodoso da hanseníase (ENH), uma condição dolorosa, inflamatória, mediada imunologicamente. Tanto a reação inversa e o eritema nodoso da hanseníase podem ocorrer antes, durante e após PQT (ARAOZ et al., 2006; BRASILEIRO FILHO, 2006; FOSS, 2003).

#### 4.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E IMUNOPATOLÓGICOS

Como visto anteriormente o quadro clínico e distribuição espectral das formas clínicas da hanseníase serão determinados pelo tipo de resposta imunológica do indivíduo ao *M. Leprae*. No polo de resistência, hanseníase tuberculoide, foram detectadas as citocinas indutoras da reação inflamatória (FOSS, 2003; MENDONÇA et al., 2008).

No polo onde ocorre uma maior suscetibilidade, a hanseníase virchowiana, apresenta depressão da resposta imunológica celular, associada ao aumento da produção de citocinas supressoras e redução dos níveis de citocinas ativadoras da resposta imunológica. Há, ainda, menor produção de elementos

responsáveis pela oxidação intracelular, como intermediários do nitrogênio (RNI), avaliada pela expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MENDONÇA et al., 2008).

Esta resposta imunológica é possível devido a algumas propriedades específicas do sistema imunológico do indivíduo (SANTOS et al., 2005).

A primeira propriedade seria uma extrema especificidade, ou seja, a capacidade de reconhecer e distinguir um enorme número de diferentes moléculas-alvo e responder (ou não) a cada uma delas individualmente (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SANTOS et al., 2005).

A segunda propriedade seria a capacidade que o sistema imunológico tem de discriminar entre o próprio e não-próprio, de modo que, em condições normais, relaciona com inúmeras proteínas e outros materiais orgânicos que compõem o hospedeiro, mas que respondem vigorosamente contra substâncias estranhas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Por último, sabemos que o sistema imunológico é dotado de memória, isto é, tem a capacidade de ser condicionado pelas suas experiências, de modo que qualquer encontro subsequente com um patógeno estranho irá provocar uma resposta mais rápida e mais amplificada do que ocorreu no primeiro encontro (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KUNKEL; BUTCHER, 2002; SANTOS et al., 2005).

A resposta imunológica inicial, ou seja, a primeira linha de defesa contra patógenos é realizada pela resposta inata, composta pela barreira formada pela pele, pelas mucosas íntegras, por fatores solúveis plasmáticos como lisozimas, sistema do complemento, proteínas, citocinas e células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, e células *natural Killer* - NK), porém, muitos microorganismos desenvolveram estratégias para resistir à imunidade inata (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MENDONÇA et al., 2008).

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro, os receptores de reconhecimento de padrões

(PRR) que irão reconhecer os padrões moleculares das micobactérias, como exemplo desse tipo teremos os receptores Toll-like (TLRs) que são essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta da imunidade inata (ARAÚJO, 2003; MENDONÇA et al., 2008; KANG et al., 2004; MAEDA et al., 2005).

Para o reconhecimento de micobactérias, entre cerca de dez TLRs que já foram identificados, os heterodímeros TLR2-TLR1, os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes (MENDONÇA et al., 2008; KANG et al., 2004; MAEDA et al., 2005).

Se a imunidade inata não conseguir eliminar o agente agressivo, esta ainda será importante na sinalização da presença de uma infecção contra a qual uma resposta imunológica deverá ser montada. A imunidade adaptativa é então mobilizada, sendo mais desenvolvida e específica distinguindo-se pela sua memória (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003; BOES, 2000; KUNKEL; BUTCHER, 2002).

Existem dois tipos de respostas imunológicas adaptativas ou adquiridas, a imunidade humoral e a imunidade celular. As células responsáveis pelo reconhecimento específico do antígeno são os linfócitos, divididos, segundo a expressão fenotípica de suas moléculas de superfície e diferenças funcionais, em linfócitos T e B (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KUNKEL; BUTCHER, 2002).

A imunidade humoral é mediada pelas moléculas presentes no sangue e nas secreções das mucosas, conhecidas como anticorpos e produzidas pelos linfócitos B. Já os linfócitos T são responsáveis por mediar a imunidade celular, que promove a destruição dos patógenos intracelulares (dentro de células fagocitárias), ou ainda a destruição das células infectadas para eliminar os reservatórios da infecção (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BOES, 2000).

Para que ocorra a resposta imunológica específica é necessário que exista o encontro do antígeno com uma célula apresentadora de antígeno (APC). As principais células apresentadoras de antígenos são as células de Langerhans

epidérmicas e macrófagos, que expressam na sua superfície o complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Estas células apresentarão o antígeno a um linfócito T e, dependendo da classe antigênica do complexo MHC, a ativação ocorrerá para células T auxiliares (linfócito TCD4<sup>+</sup>), no caso de MHC de classe II ou células T supressoras (linfócito T citotóxico CD8<sup>+</sup>) em MHC classe I (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

As células do sistema imunológico, quando ativadas passam a produzir proteínas, de forma autolimitada, que atuam como modificadoras da resposta biológica a antígenos, chamadas de citocinas (YOSHIE; IMAI; NOMIYAMA, 2001).

As citocinas são importantes mediadores que tem um papel fundamental na imunorregulação da resposta de leucócitos. Trata-se de proteínas polipeptídicas, secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa em resposta a microorganismos e outros antígenos, que medeiam muitas funções dessas células (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SPELLBERG; EDWARDS, 2001; ZLOTNIK; YOSHIE, 2001).

As citocinas que são sintetizadas por leucócitos e atuam interferindo na resposta de outro leucócito são chamadas, com poucas exceções, de interleucinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KUNKEL; BUTCHER, 2002; SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

A natureza da resposta das células T e especificamente os tipos de citocinas produzidos pelas células T ativadas são importantes na determinação das lesões e da infecção clínica pelo *M. leprae*, assim como na progressão da hanseníase. Portanto, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> tem capacidade de induzir as respostas celular ou humoral, relacionadas com os tipos de citocinas secretadas proporcionando o desenvolvimento das respostas em TH1 e TH2, com atividades imunorreguladoras específicas (ANTAS et al., 2004a; ABBAS; LICHTMAN, 2005; MENDONÇA et al., 2008).

O sistema imunológico reage eficazmente às micobactérias pela formação de granulomas. Esta bactéria sobrevive à fagocitose e multiplica-se inclusivamente dentro dos macrófagos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; RAUPACH; SHE, 2001).

Se houver uma reação TH1, citotóxica, com formação de granulomas sequestradores da bactéria e com destruição dos macrófagos infectados, a doença torna-se quase benigna e não é capaz de progredir: é a lepra tuberculoide (ANTAS et al., 2004a; ABBAS; LICHTMAN, 2005; SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

Há predomínio de células T auxiliares CD4+ e citocinas TH1, como IL-2, onde o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são considerados ser essenciais para a ativação dos macrófagos e para o controle da replicação da micobactéria e a formação de granulomas respectivamente (ALGOOD; LIN; FLYNN, 2005; ANTAS et al., 2004a; SPELLBERG; EDWARDS, 2001; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Se no entanto for ativada uma resposta TH2, humoral, com produção de anticorpos, não há formação de granulomas e a bactéria dissemina-se, surgindo a hanseníase virchowiana ou hanseníase típica ou ainda hanseníase lepromatosa (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Nas lesões virchowianas o predomínio é de células T supressoras (CD8+) e citocinas TH2, como IL-4, IL-5 e IL-10, apresentando um alto índice baciloscópico e um importante foco de disseminação da doença (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA et al., 2008).

#### **4.6.1 Citocinas envolvidas no perfil de resposta imunológica TH1**

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma proteína homodimérica produzida por células NK, células TH1 CD4+ e células TCD8+. Sua secreção pelas células NK ocorrem, na imunidade inata, em resposta ao reconhecimento de componentes desconhecidos de microorganismos ou em resposta à IL-12. Na imunidade adaptativa, as células T produzem IFN- $\gamma$  em resposta ao reconhecimento antigénico, e a produção é acentuada por IL-12 e IL-18 (ABBAS; LICHTMAN, 2005; HERRERA et al., 2008; ROA et al., 2008).

Entre as ações biológicas, podemos dizer que o IFN- $\gamma$  participa da ativação de macrófagos pelas células T e NK para eliminar microorganismos fagocitados, ativando a transcrição dos genes que codificam as enzimas necessárias para a geração de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio (SPELLBERG; EDWARDS, 2001; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Outra ação atribuída ao IFN-  $\gamma$  é estimular a expressão de moléculas MHC da classe I e da classe II e co-estimuladores em APCs, acentuando a apresentação de antígeno associada ao MHC, assim também como ativador de células do endotélio vascular na media que potencializa muitas das ações do TNF- $\alpha$  em células endoteliais, promovendo a adesão e o extravasamento de linfócitos T para os locais da infecção (ABBAS; LICHTMAN, 2005; CONDE et al., 2004; LIMA et al., 2007).

O IFN- $\gamma$  promove a diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> naive para a subpopulação TH1 e inibe a proliferação de células TH2, o que é imprescindível para a determinação da forma clínica da hanseníase, e também age nas células B para promover a troca para certas subclasses de IgG (CONDE et al., 2004; LIMA, et al., 2007; WALKER; LOCKWOOD, 2006;).

Segundo Cardoso et al. (2002 apud ANTAS et al., 2004a, p. 54) são encontrados elevados índices de IFN- $\gamma$  no PPD (derivado de proteína purificado) positivos, em indivíduos controles saudáveis, como se pode esperar de uma área endêmica de co-infecção de tuberculose e hanseníase.

O TNF- $\alpha$  é o principal mediador da resposta inflamatória aguda contra patógenos infecciosos e embora células T estimuladas por antígeno, células NK e mastócitos, possam secretar essa proteína, sua principal fonte celular é constituída por fagócitos mononucleares ativados. O IFN- $\gamma$ , produzido por células T e células NK, aumenta a síntese de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados por lipolissacarídeos (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; PFEFFER, 2003; STEFANI et al., 2003).

A principal função fisiológica do TNF- $\alpha$  é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar microorganismos, contribuindo para a formação de granulomas (ANTAS et al., 2004b; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; PFEFFER, 2003).

Há, entretanto na hanseníase, uma resposta imunológica celular capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada por citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e mediadores da oxidação, como os reativos intermediários do oxigênio (ROI), e do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos (ANTAS et al., 2004; ARAOZ et al., 2006; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Macrófagos ativados podem ser identificados através da imunomarcagem de CD68. As moléculas CD, *cluster differentiation*, são moléculas da superfície celular expressas em vários tipos de células do sistema imunológico que são designadas pelo “grupo de diferenciação” ou número CD (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SEGERER et al., 2008).

A molécula CD68 também conhecida como microssialina, pertence à família das proteínas de membrana associadas aos fagossomos (LAMP) e a família dos receptores de depuradores. Embora possua função ainda desconhecida, ela é um importante marcador da resposta imunológica celular já que é expressa por monócitos, macrófagos, células dendríticas, granulócitos, linfócitos T ativados, subconjunto de linfócitos B, sendo uma proteína intracelular com expressão fraca na superfície (ABBAS; LICHTMAN, 2005; LOCKWOOD; COLSTON; KHANOLKAR-YOUNG, 2002; SEGERER et al., 2008).

A função do IFN- $\gamma$  seria ativar a transcrição gênica que codifica as enzimas necessárias para a geração de intermediários reativos do oxigênio e intermediários reativos do nitrogênio, fagócito-oxidase e sintase indutora do óxido nítrico (iNOS), respectivamente, que são responsáveis por destruir os bacilos que estão dentro dos fagolisossomos (AMER; SWANSON, 2002.; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; PFEFFER, 2003).

Na hanseníase tuberculoide, a exacerbação da imunidade celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) impedem a proliferação bacilar, mas podem se tornar lesivas ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais, pela ausência de fatores reguladores (ARAÚJO, 2003; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

#### **4.6.2 Citocinas envolvidas no perfil de resposta imunológica TH2**

O aspecto imunopatológico da hanseníase nas formas multibacilares, caracterizado pela produção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* em grande quantidade, é ineficaz para a eliminação dos bacilos, o que é responsável pela grande manifestação clínica neste polo do espectro (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

A IL-10 é produzida pelos macrófagos ativados e é um exemplo de regulador de feedback negativo já que ela também atua como inibidora de macrófagos ativados e células dendríticas, inibe a produção de IL-12 por estas células, que leva a diminuição da produção do IFN- $\gamma$ , ocorrendo a inativação de células T e conseqüentemente a finalização da imunidade mediada por células (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SPELLBERG; EDWARDS, 2001; TAYLOR et al., 2008).

A IL-10 assim como a IL-4, atuam como imunossupressoras, favorecem a proliferação de bacilos íntegros e estão associadas ao aumento do índice bacteriológico em pacientes infectados por micobactérias (ANTAS et al., 2004b; BARRETO et al., 2005).

A IL-4 é fundamental para o estímulo da produção de IgE e tem um efeito imunorregulatório negativo sobre a imunidade mediada por células, como um antagonista do IFN- $\gamma$ . Estimula o desenvolvimento de células TH2 a partir de células T auxiliares CD4+ naive, além de contribuir para o aumento de anticorpos antiPGL-I em pacientes lepromatosos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA et al., 2008).



O fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) tem como papel principal no sistema imunológico a inibição da proliferação e ativação de linfócitos e outros leucócitos. É secretado por células T estimuladas por antígeno, fagócitos mononucleares ativado por LPS e muitos outros tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

Assim como a IL-10, o TGF- $\beta$  também é uma citocina macrófaga e possui o perfil supressor dessa citocina. Ele é liberado pela presença do bacilo, que o utiliza como um mecanismo de evasão da resposta imunológica competente inibindo os próprios macrófagos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA et al., 2008).

#### **4.6.3 Aspectos histopatológicos**

No exame histopatológico da hanseníase é comum observar a presença de um aspecto inflamatório de reação de hipersensibilidade do tipo tardio com formação de granulomas (ANTAS et al., 2004b; JUNQUEIRA; CAIXETA, 2008; MENDONÇA et al., 2008).

A formação de granulomas é comum em infecções por microorganismos persistentes e ocorre frequentemente associada à fibrose do tecido, o que pode interferir com o seu funcionamento normal (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KUNKEL; BUTCHER, 2002; RUSSELL; LEY, 2002; VON ADRIAN; MACKAY, 2000).

Como citado anteriormente a ativação de macrófagos por células de perfil TH1 é mediada por IFN- $\gamma$ . Os macrófagos ativados são responsáveis por eliminar os microorganismos fagocitados, estimulam a inflamação e reparam tecidos lesados. Porém, caso os macrófagos não consigam debelar a infecção e houver persistência por parte dos microorganismos, os macrófagos então ativados causarão lesão tecidual e fibrose (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BARRETO et al., 2005; KUNKEL; BUTCHER, 2002; RUSSELL; LEY, 2002).

Os macrófagos ativados continuam a produzir citocinas, entre elas a IL-1, a IL-12 e o TNF- $\alpha$ , e fatores de crescimento os quais progressivamente modificam o

ambiente tecidual local. Estas células também sofrem alterações em resposta aos sinais persistentes das citocinas, como aumento do citoplasma e de organelas citoplasmáticas, além de se fundir para formar células gigantes multinucleadas. Estes macrófagos passam, então, a circundar fontes específicas de antígenos e produzem nódulos de tecidos inflamatórios chamados granulomas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ALGOOD; LIN; FLYNN, 2005; KUNKEL; BUTCHER, 2002; RUSSELL; LEY, 2002).

A hanseníase apresenta como característica histopatológica a formação de granulomas que diferem em seus polos tuberculoide e virchowiano. A apresentação da doença na forma virchowiana se deve ao grande número de bacilos não fagocitados pelos macrófagos, o que resulta em uma apresentação clínica disseminada. Na forma tuberculoide o número de bacilos circulantes é pequeno portanto a apresentação clínica se dá de forma localizada como manchas hipocrômicas e com perda de sensibilidade (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ALGOOD; LIN; FLYNN, 2005).

O granuloma tuberculoide é caracterizado por presença de células epitelióides diferenciadas, gigantócitos tipo Langerhans e tipo corpo estranho, além de linfócitos que se dispõem em torno do granuloma em densidade variável e podem ainda penetrar entre as células epitelióides. Estes granulomas geralmente se dispõem em toda a derme a partir da profundidade sob a forma de gomos bem delimitados, que se interligam com gomos mais superficiais, progressivamente menores, até a localização subepitelial, mais raramente os granulomas atingem e erodem a epiderme (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ALGOOD; LIN; FLYNN, 2005; FLEURY, 2005; 2006).

Já os granulomas virchowianos são caracterizados, inicialmente, pela presença de macrófagos transformados, estes apresentam citoplasma abundante e núcleos vesiculosos pequenos e opacos. Estes granulomas se diferenciam dos granulomas tuberculoides, pois não tem um arranjo concêntrico e não são envolvidos por linfócitos apresentando um aspecto mais solto (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ALGOOD; HAGGE et al., 2004; LIN; FLYNN, 2005; FLEURY, 2005; 2006).

## 4.7 FATORES GENÉTICOS

A hanseníase, apesar dos avanços obtidos com a introdução da poliquimioterapia como tratamento, ainda vem sendo considerada um grande problema de saúde pública. Por este motivo têm sido utilizados métodos de pesquisa avançada a fim de verificar a importância do componente genético na susceptibilidade do hospedeiro à doença (AMADOR, 2004; BEIGUELMAN, 2002; PREVEDELLO; MIRA, 2007).

Trata-se de uma doença de alta infectividade e baixa patogenicidade onde se observa que cerca de 95% da população apresenta imunidade contra o patógeno. Populações de algumas regiões apresentam uma maior incidência da doença o que é comum na maior parte territorial da Amazônia Legal (AMADOR, 2004; AQUINO et al., 2003; BEIGUELMAN, 2002; MIRA, 2007).

Estudos têm sido empregados, aqui no Brasil com início a partir da década de 60, a fim de verificar a presença de polimorfismos genéticos associados à hanseníase, prevalência da doença em determinadas populações e distância genética, distribuição familiar, acometimento da hanseníase em gêmeos e estudos genéticos sobre a reação de Mitsuda (BEIGUELMAN, 2002; BLEHARSKI et al., 2003).

Estudos são controversos quanto à associação de polimorfismos no braço inferior do cromossomo 2 humano, no loco 2q35, gene NRAMP1, com a susceptibilidade a hanseníase e a tuberculose, que é, também, uma doença infecciosa macrófago-dependente (ALCAÏS et al., 2000; BEIGUELMAN, 2002; GREENWOOD et al., 2000; HATAGIMA et al., 2001; MEISNER et al., 2001).

Bleharski et al. (2003) correlacionaram a expressão gênica com a classificação da doença, para tal correlação foi utilizada a expressão do gen receptores da família LIR (immunoglobulin-like receptor).

Polimorfismos nos gens TLR2 e TLR4 em humanos são correlacionados com um aumento da susceptibilidade de infecção bacteriana pelo patógeno,

alterando a produção de IL-2, IL-12 , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que são citocinas importantes para a imunidade celular (KANG et al., 2004).

Mira et al. (2004) associaram polimorfismos de alelos do PARK2 e PACRG a uma maior susceptibilidade à hanseníase, alterações nesses genes também são responsáveis pela doença de Parkinson. Esse mesmo polimorfismo foi considerado como fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase em pesquisas com pacientes hanseníacos brasileiros, vietnamitas e indianos (MALHOTRA et al., 2006).

## 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 CASUÍSTICA

Foram utilizados tecidos de pacientes com hanseníase e de indivíduos saudáveis para controle da técnica imunoistoquímica. Os pacientes com hanseníase eram procedentes de Unidades Básicas de Saúde de Belém e de municípios próximos e de ambulatórios médicos, devidamente matriculados e atendidos no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Todos os pacientes foram diagnosticados e classificados de acordo com as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS): hipopigmentação ou lesão na pele com perda de sensação tátil e dolorosa (observada ao indagar o paciente sobre a presença ou não de sensibilidade após submetê-lo a uma alfinetada e/ou ao contato com tubos de ensaio quentes e frios sobre a sua pele); envolvimento de nervos periféricos (observado pelo seu espessamento após palpação dos nervos cubital, poplíteo, e outros); presença na linfa de bacilos álcool – ácidos – resistentes.

Para serem incluídos na pesquisa era necessário que o paciente, no momento da coleta do material, não tivesse iniciado o tratamento pela PQT.

Foram analisadas lâminas de 29 pacientes hansenianos, sendo 13 da forma tuberculoide, 16 da forma virchowiana.

### 5.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os pacientes envolvidos no projeto foram esclarecidos do estudo através do termo de consentimento livre e esclarecido, e o projeto submetido ao comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical, através do protocolo Nº 167/2005-CEP/NMT (ANEXO I), segundo a Resolução nº196 de 10 de 10 de 1996 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos.

### 5.3 TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal com informações colhidas através do banco de dados do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA.

### 5.4 BIÓPSIAS DE PELE

As biópsias de pele foram colhidas após anestesia no local das lesões hansenianas selecionadas com punch no. 3 e emblocadas em parafina. O material foi submetido ao estudo morfológico com a coloração HE e à marcação pela técnica de imunistoquímica para o anticorpo específico.

### 5.5 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A marcação do fenótipo das células inflamatórias, bem como a expressão citocínica associada às formas clínicas empregou os anticorpos primários listados na tabela 1 seguindo o protocolo descrito abaixo.

Foi utilizado o método imunistoquímico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês Streptavidin-Biotin Peroxidase) (HSU; RAINE; FAGNER, 1981).

Inicialmente foram realizados cortes histológicos em lâminas silanizadas das biopsias de lesões cutâneas dos indivíduos portadores das formas polares, tuberculoide e virchowiana, da hanseníase. Em seguida, os cortes foram desparafinizados e foi realizada a recuperação antigênica. O método utilizado para realizar esta recuperação foi de acordo com a necessidade do antígeno a ser pesquisado.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com quatro incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada e, em seguida, os preparados foram novamente lavados em água corrente e água destilada por 5 minutos cada, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4.

A etapa seguinte foi a incubação das amostras com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “overnight” a 4°C. Após três lavagens com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada, as próximas etapas foram realizadas utilizando o reagente LSAB (Dako) de acordo com o fabricante.

As amostras foram incubadas com o anticorpo secundário (biotinylated link) por 30 minutos e lavadas novamente três vezes com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada. Depois, foram incubadas com estreptavidina-peroxidase por 30 minutos. Após nova lavagem em tampão PBS pH 7,4, a reação foi então revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount .

## 5.6 RELAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS PARA IMUNOISTOQUÍMICA

Tabela 1 – anticorpos utilizados para marcação imunoistoquímica

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Marcação</b>
Anti-IFN gama	Interferon gama
Anti-IL10	Interleucina 10
Anti-IL4	Interleucina 4
Anti-TGF beta	Fator transformador do crescimento
Anti-Lisozima	Metabólico de macrófago
Anti-CD68	Macrófago
Anti-iNOs	Sintase do óxido nítrico

Fonte: do autor

## 5.7 ANÁLISE DAS LÂMINAS DE IMUNOISTOQUÍMICA

As marcações das lâminas, obtidas com os anticorpos listados na tabela 1, foram contadas em 5 campos escolhidos de forma aleatória. Para tal, foi utilizado o microscópio Zeiss, modelo 456006 com a lente A-plan objetiva de 40x.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos durante os experimentos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL e analisados usando o programa BIOESTAT 5.0 sendo apresentados sob forma de tabelas e/ou histogramas, curvas de tendência, etc (AYRES et al., 2007).

As variáveis contínuas foram analisadas pelo estudo de medidas de tendência central como média e mediana, bem como por medidas de variabilidade como coeficiente de variância e desvio-padrão. Foi utilizado para a análise comparativa entre as amostras independentes o teste de Mann-Whitney, estabelecendo-se um nível alfa ( $\alpha$ ) = 0,05 (5%), para um intervalo de confiança de 95%.

Para a correlação entre os níveis de citocinas encontrados com a atividade macrofágica nos dois polos foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e de Spearman, que consistem em medidas do grau de associação ou dependência entre duas variáveis. O coeficiente de Spearman é uma alternativa não paramétrica para o coeficiente de correlação de Pearson e deve ser usado quando os dados observados são variáveis ordinais ou quando nenhuma das variáveis em análise tem distribuição normal.

O coeficiente de correlação de Pearson  $r$  varia entre -1 (correlação perfeita negativa) e 1 (correlação perfeita positiva). A hipótese da nulidade indica que as variáveis X e Y não estão correlacionadas.



## 6 RESULTADOS

A amostra foi composta por 29 indivíduos, tabela 2, distribuídos em dois grupos experimentais (Figura 11), um grupo formado por 16 indivíduos (55%) que apresentavam hanseníase virchowiana (MHV) e um grupo formado por 13 indivíduos (45%) que apresentavam a hanseníase tuberculoide (MHT), todos diagnosticados e classificados de acordo com a avaliação clínica e laboratorial, segundo protocolo do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002).

Tabela 2 – Distribuição da amostra segundo a classificação em MHV e MHT.

Grupos					
MHV		MHT		Total	
n	%	n	%	N	%
16	55.0%	13	45.0%	29	100%

Fonte: dados do autor.

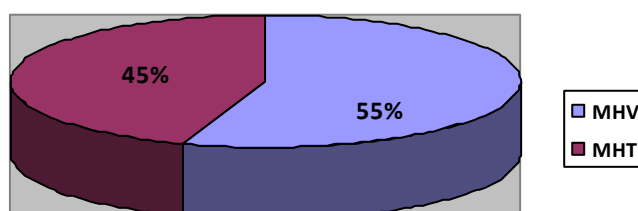


Figura 11 - Distribuição da amostra segundo a classificação em MHV e MHT.

Fonte: dados do autor.

À coloração por hematoxilina eosina (HE) observamos a presença de lesão inflamatória com aspecto granulomatoso e presença de tecido fibroso em ambos os grupos. O granuloma é composto por macrófagos, células epitelióides, células gigantes e cercado por linfócitos T, com características histopatológicas que vão se diferenciar de acordo com o tipo de resposta imunológica predominante, celular ou humoral, como observado nas figuras 12 e 13.

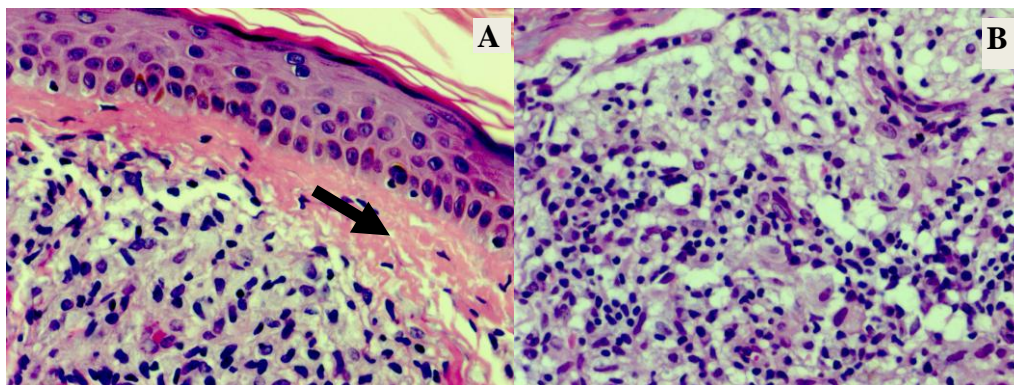


Figura 12 – Secção de pele de paciente do grupo MHV, coloração HE – (A) Aspecto histopatológico de lesão da forma lepromatosa da doença de Hansen mostrando presença de infiltrado inflamatório constituído predominantemente por células epitelióides que muitas das vezes mostram aspecto vacuolizado. HE. Aumento original: 20x. (B) Há presença de faixa de Unna evidente (seta) que separa a epiderme da lesão inflamatória da derme . HE. Aumento original: 40x.  
 Fonte: dados do autor.

Os granulomas virchowianos (Figura 12) são formados por macrófagos transformados, estes apresentam citoplasma abundante e núcleos vesiculosos pequenos e opacos. As células epitelióides se apresentam com aspecto vacuolizado.

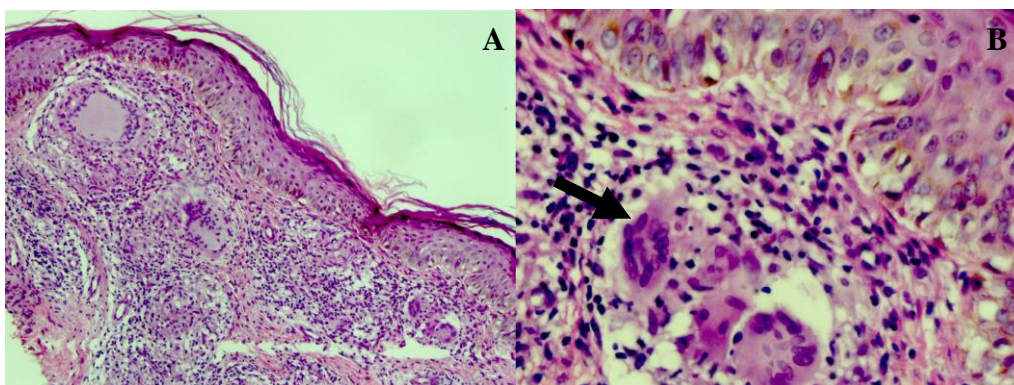


Figura 13 - Secção de pele de paciente do grupo MHT, coloração HE – (A) aspecto histopatológico de lesão da forma tuberculoide da doença de Hansen mostrando granulomas bem formados em lesões circunscritas. Coloração HE. Aumento original: 20x. (B) constituídas por linfócitos, células epitelióides e gigantócitos (seta). Coloração HE. Aumento original: 40x.  
 Fonte: dados do autor.

Os granulomas tuberculoides (Figura 13 A e B) tem um arranjo concêntrico, são envolvidos por linfócitos e há presença de células epitelióides e gigantócitos (Figura 13 B).

## 6.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO PERFIL DE CITOCINAS E ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS NOS POLOS TUBERCULOIDE (MHT) E VIRCHOVIANO (MHV) DA HANSENÍASE

Em cada grupo analisado foram utilizadas medidas de tendência central, média e mediana, obtidas pelo número de imunomarcações de citocinas de perfis TH1 e TH2, assim como marcadores de atividade macrofágica como a microssialina (CD68), reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (iNOS) e a lisozima, descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição da amostra quanto a imunomarcação de citocinas de perfil TH1 e TH2 e marcadores de atividade macrofágica.

	MHV (n=16)			MHT (n=13)		
	$\bar{x}$ mín	$\bar{x}$ máx	Md	$\bar{x}$ mín	$\bar{x}$ máx	Md
<b>CD68</b>	0	42,6	11,5	2,2	49,4	4,0
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,4	35,4	12,0	0,8	10,6	2,0
<b>IL-10</b>	0,6	18,4	2,38	0,6	15,2	2,0
<b>iNOS</b>	12,2	64,8	36,0	2,4	65,7	19,0
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	1,8	21,6	6,0	1,4	25,4	7,0
<b>Lisozima</b>	5,4	70,2	23,0	2,0	58,0	48,0

$\bar{x}$  mín = média mínima;  $\bar{x}$  máx = média máxima; Md = mediana.

Fonte: dados do autor.

## 6.2 ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE CITOCINAS NOS POLOS TUBERCULOIDE (MHT) E VIRCHOVIANO (MHV) DA HANSENÍASE

Realizou-se para a análise comparativa, para as imunomarcações de citocinas e marcadores de atividade macrofágica, obtidas em polo virchowiano e tuberculoide, entre as amostras independentes, o teste de Mann-Whitney, estabelecendo-se um nível alfa ( $\alpha$ ) = 0,05 (5%).

Tabela 4 - Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de CD68 MHV x CD 68 MHT

CD 68	MHV	MHT	U	Z(U)	p-valor (unilateral)	p-valor (bilateral)
N	16	13	85.00	0.8332	0.2024	0.4047
Soma dos postos (Ri)	259.0	176.0				
Mediana	11.5	4.0				

Fonte: dados do autor.

Na tabela 4 é mostrado que a expressão de CD68 foi maior no grupo MHV, figura 14 A e B, porém os níveis de CD68 no polo MHV não diferem com significância dos níveis de CD68 no polo MHT, figura 14 C e D ( $p$ -valor = 0.4047).

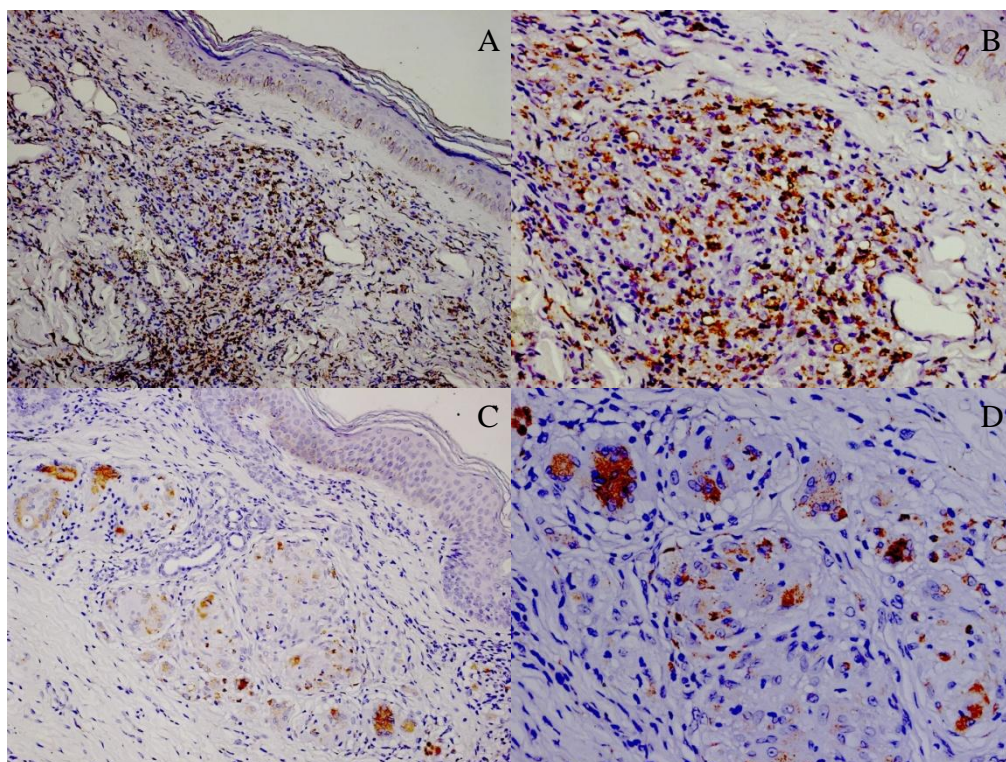


Figura 14 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para CD68. A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x.

Fonte: dados do autor.

Durante a análise das imunomarcações para o IFN- $\gamma$  (tabela 5) observou-se que, uma lâmina pertencente ao grupo MHV não apresentou marcação alguma e foi portanto excluída do estudo por possível falha na técnica imunoistoquímica.

Tabela 5 - Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis IFN-  $\gamma$  MHV x IFN-  $\gamma$  MHT

IFN- $\gamma$	MHV	MHT	U	Z(U)	p-valor (unilateral)	p-valor (bilateral)
N	15	13	24.00	3.3858	0.0004	0.0007
Soma dos postos (Ri)	291.0	115.0				
Mediana	12.0	2.0				

Fonte: dados do autor.

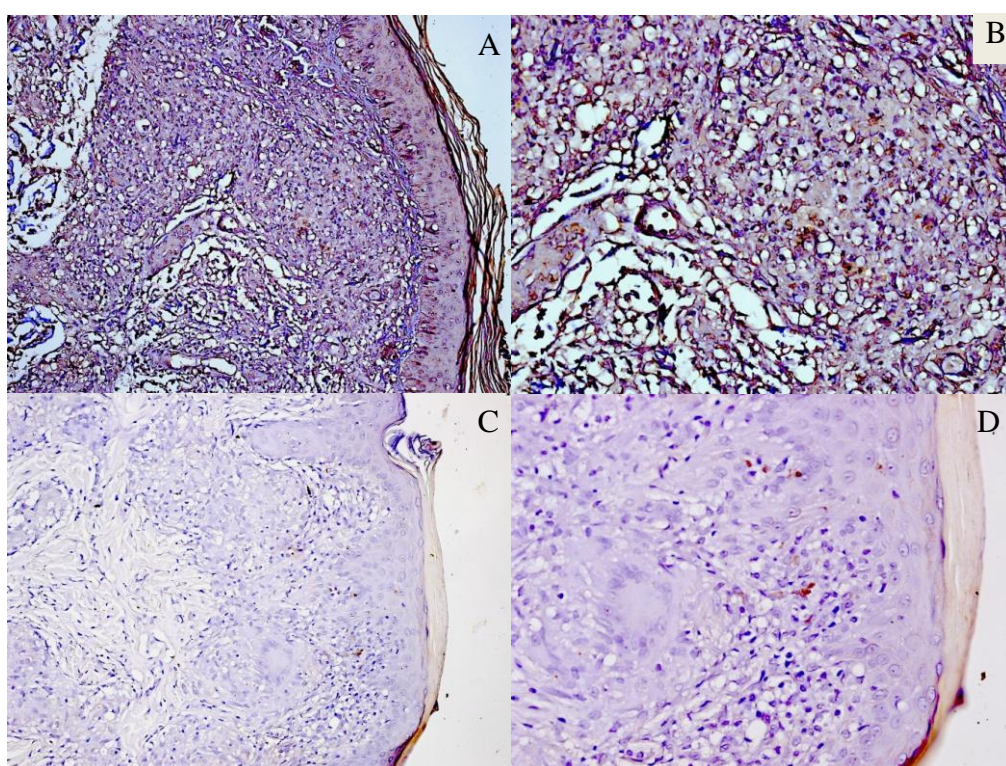


Figura 15 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para IFN- $\gamma$ . A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x. Fonte: dados do autor.

Verificou-se que a expressão do IFN- $\gamma$  nos indivíduos do grupo MHV, figura 15 A e B, foi maior que nos indivíduos MHT, figura 15 C e D, de forma altamente significativa (tabela 5, Figura 16).

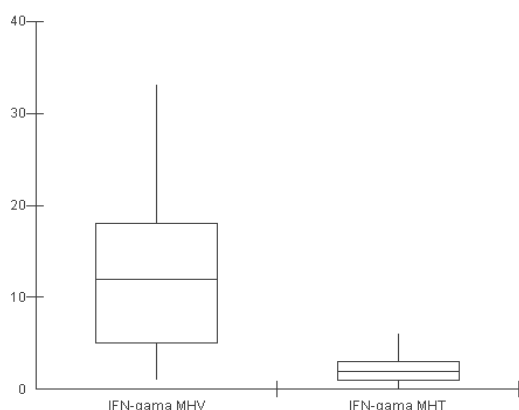


Figura 16 – Comparação entre os níveis de IFN-  $\gamma$  MHV x IFN-  $\gamma$  MHT  
 Fonte: dados do autor.

Devido a sua fraca expressão em ambos os grupos, MHV, figura 17 A e B, e MHT, figura 17 C e D, não foi possível calcular a diferença da expressão de IL-4 entre os polos.

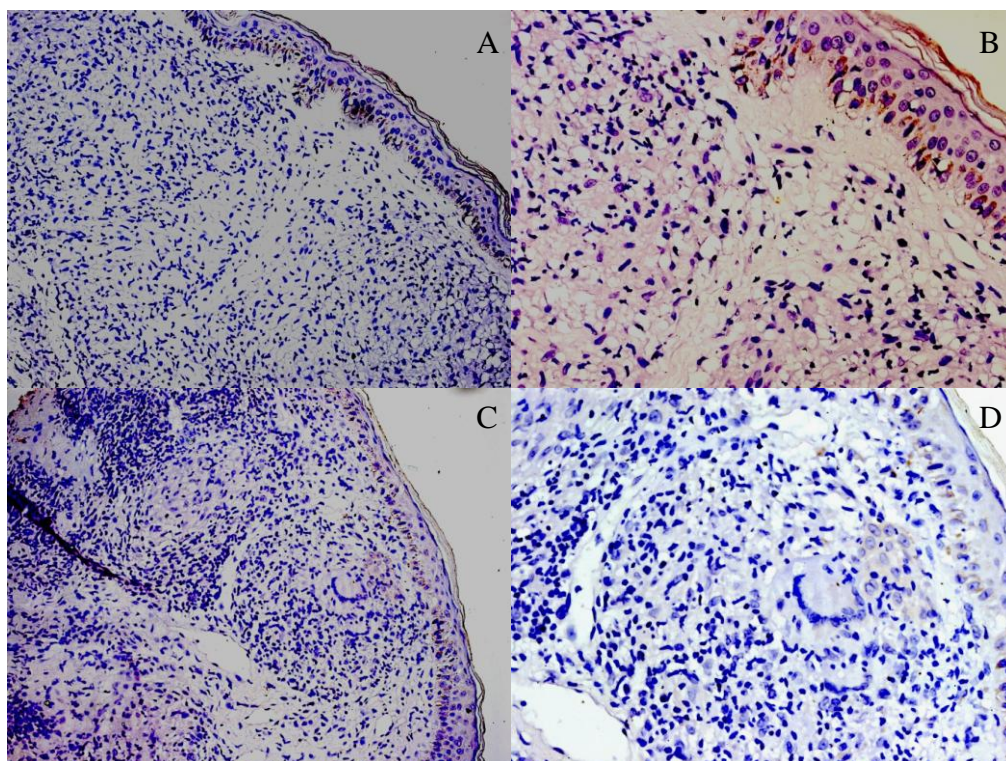


Figura 17 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para IL-4. A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x.  
 Fonte: dados do autor.

A Tabela 6 apresenta a diferença entre os níveis de IL-10 dos grupos estudados. É possível observar, através das figuras 18 A, B, C e D, que em ambos os pólos o número de marcações encontradas foi semelhante.

Tabela 6 - Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de IL-10 MHV x IL-10 MHT

IL-10	MHV	MHT	U	Z(U)	p-valor (unilateral)	p-valor (bilateral)
N	15	13	102.00	0.0877	0.4651	0.9301
Soma dos postos (Ri)	238.0	197.0				
Mediana	2.38	2.0				

Fonte: dados do autor.

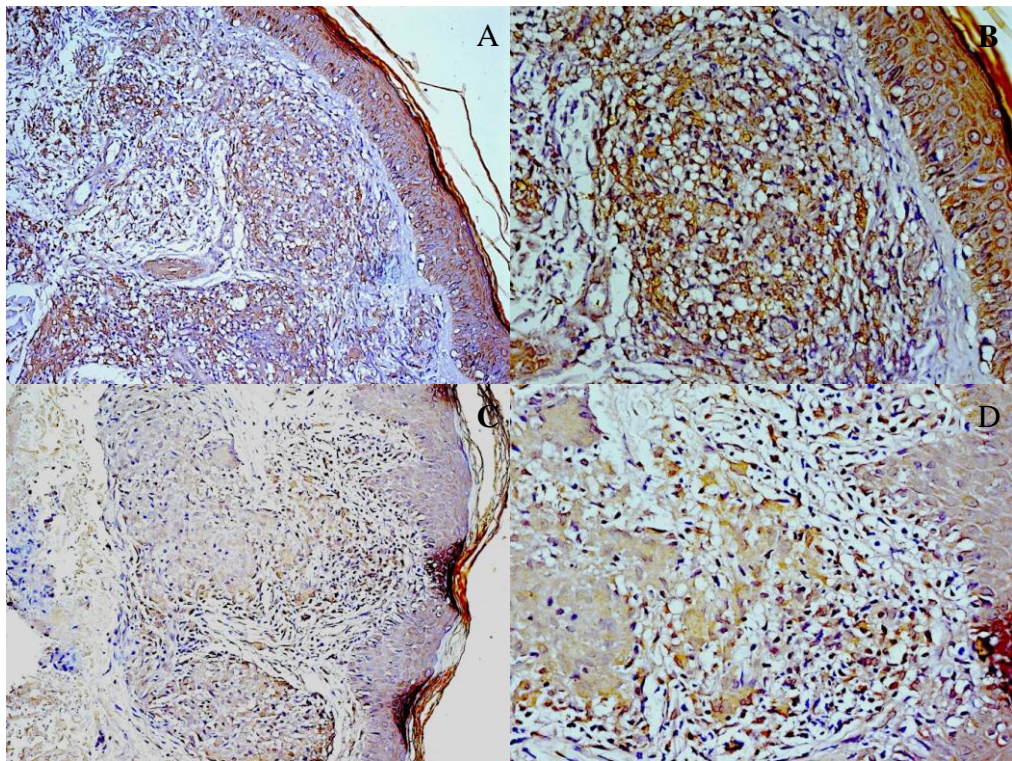


Figura 18 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para IL-10. A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x.  
Fonte: dados do autor.

A IL-10 mostrou-se nos dois polos (Figura 19) sem diferença significativa de expressão entre os grupos MHV, figura 18 A e B, e MHT, figura 18 C e D, como podemos observar na tabela 6 (p-valor = 0.9301).

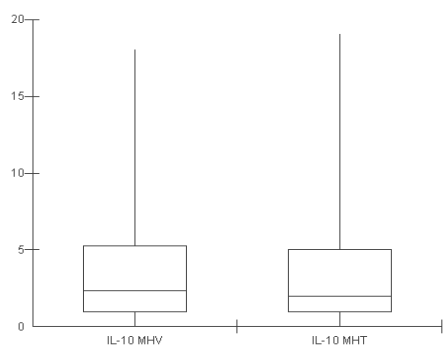


Figura 19 – Comparação entre os níveis de IL-10 MHV x IL-10 MHT  
 Fonte: dados do autor.

A Tabela 7 apresenta a diferença entre os níveis de iNOS dos grupos estudados. É possível observar que uma lâmina de um paciente do grupo MHT foi excluída do estudo pela ausência total de imunomarcações para o iNOS, o que poderia ser atribuído a falha da técnica de imunohistoquímica.

Tabela 7 - Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de iNOS MHV x iNOS MHT

iNOS	MHV	MHT	U	Z(U)	p-valor (unilateral)	p-valor (bilateral)
N	16	12	55.50	1.8802	0.0300	0.0601
Soma dos postos (Ri)	291.0	115.0				
Mediana	36.0	19.0				

Fonte: dados do autor.

A figura 20, A e B, apresenta uma maior expressão de iNOS no polo virchowiano quando comparada a sua expressão no polo MHT, figura 20 C e D, porém esta diferença não se mostra significativa, figura 21 ( $p=0,0601$ ).



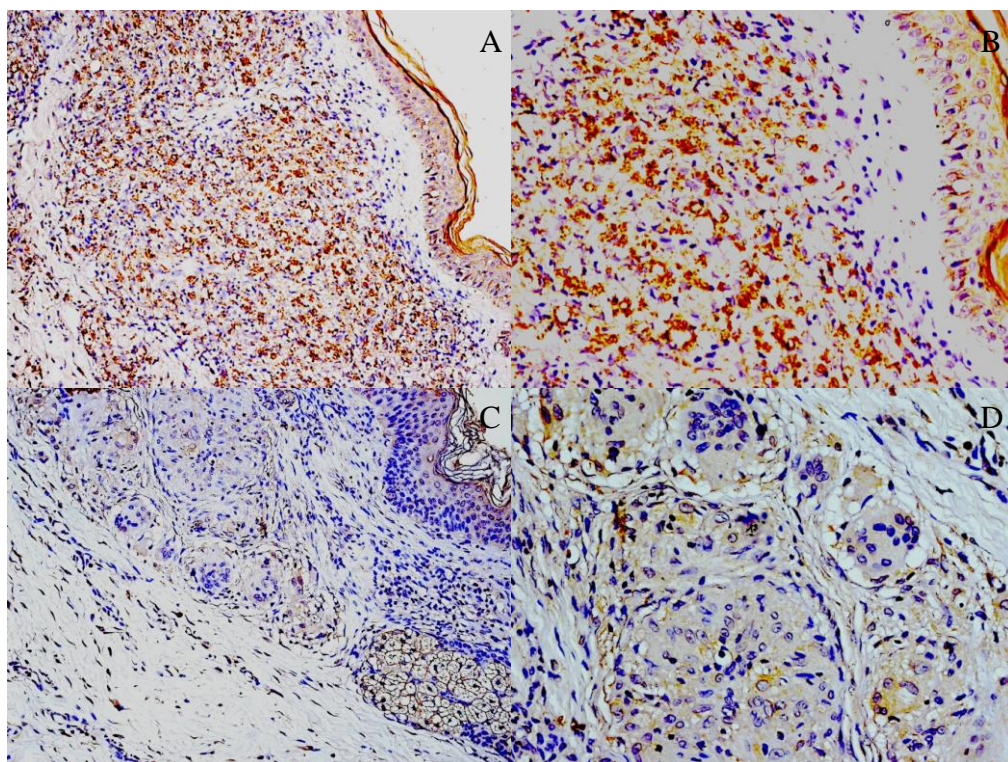


Figura 20 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para iNOS. A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x.  
 Fonte: dados do autor.

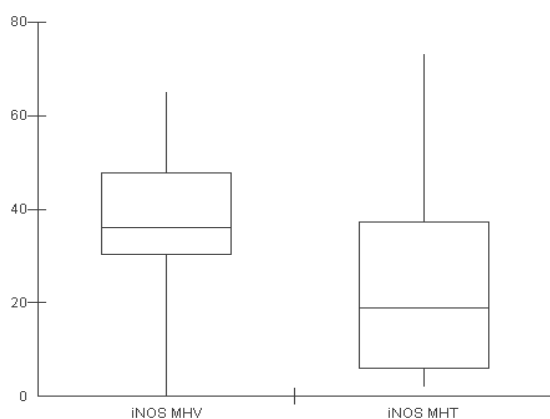


Figura 21 - Comparação dos níveis de iNOS MHV x iNOS MHT.  
 Fonte: dados do autor.

A Tabela 8 apresenta a diferença, porém sem significância (p-valor= 0,7257) entre os níveis de TGF-  $\beta$  dos grupos estudados.

Tabela 8 - Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de TGF- $\beta$  MHV x TGF- $\beta$  MHT

TGF- $\beta$	MHV	MHT	U	Z(U)	p-valor (unilateral)	p-valor (bilateral)
N	16	13	96.00	0.3508	0.3629	0.7257
Soma dos postos (Ri)	232.0	203.0				
Mediana	6.00	7.00				

Fonte: dados do autor.

A produção do TGF- $\beta$  não se mostrou diferente nos dois polos analisados MHV, figura 22 A e B, e MHT, figura 22 C e D, como mostrado na tabela 8 (p-valor = 0,7257).

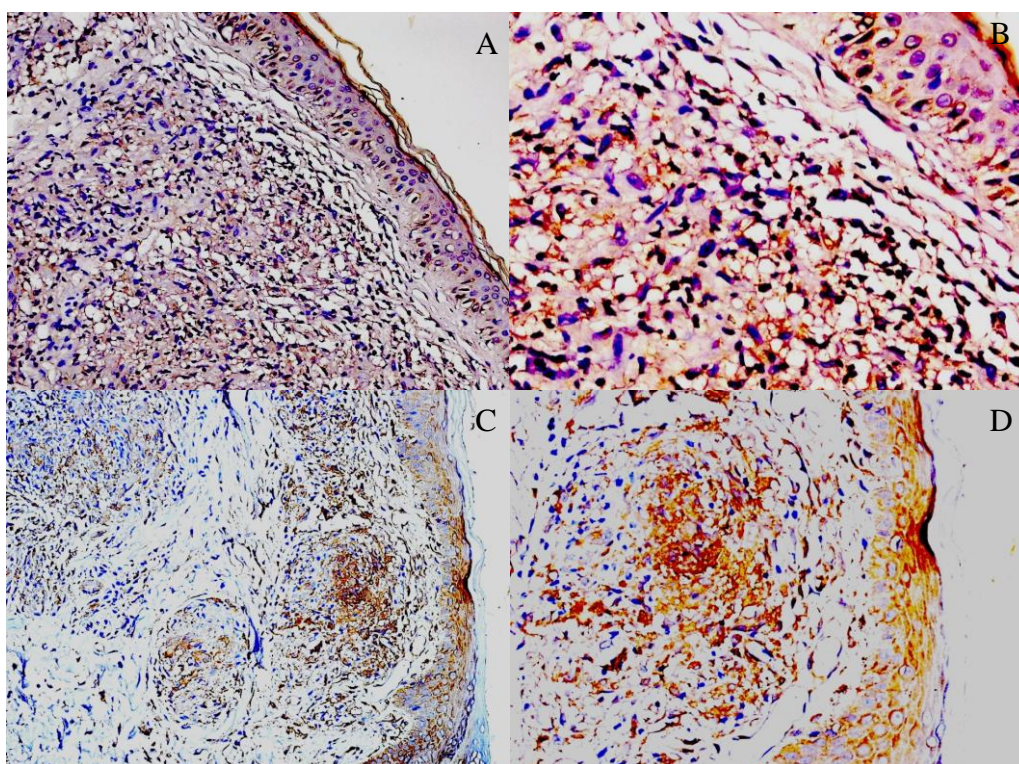


Figura 22 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para TGF- $\beta$ . A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x. Fonte: dados do autor.

Sete lâminas que estavam imunomarcadas para a Lisozima apresentaram danos, não sendo possível analisá-las. Destas três pertenciam ao grupo MHV e quatro ao grupo MHT (tabela 9).

Tabela 9 - Teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de Lisozima MHV x Lisozima MHT

Lisozima	MHV	MHT	U	Z(U)	p-valor (unilateral)	p-valor (bilateral)
N	13	9	46.00	0.8347	0.2019	0.4039
Soma dos postos (Ri)	137.0	116.0				
Mediana	23.00	48.00				

Fonte: dados do autor.

Através da imunomarcagem, não foi observada diferença significativa (Tabela 9) entre os níveis de lisozima nos polos MHV, figura 23 A e B, e MHT, figura 23 C e D ( $p$ -valor=0.4039).

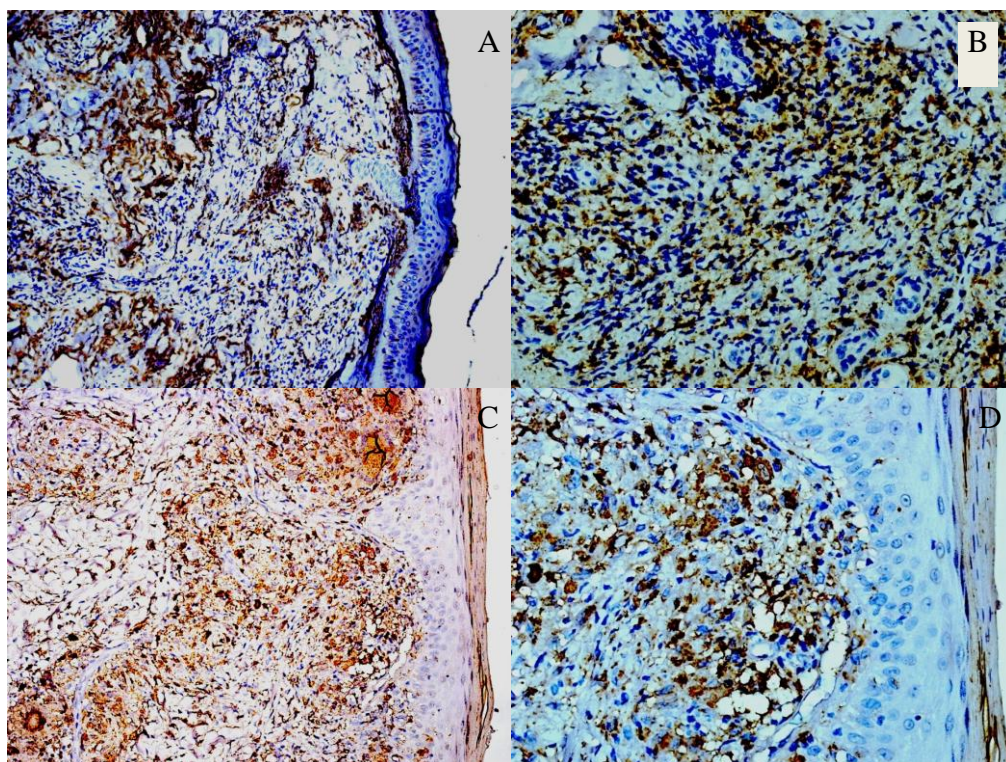


Figura 23 – Secção de pele com lesão hanseniana apresentando marcações imunoistoquímicas para Lisozima. A) Paciente com MHV, aumento original 20x. B) Paciente com MHV, aumento original 40x. C) Paciente MHT, aumento original 20x. D) Paciente MHT, aumento original 40x.

Fonte: dados do autor.

### 6.3 CORRELAÇÕES ENTRE O PERFIL DE CITOCINAS E A ATIVIDADE MACROFÁGICA

Foi feita uma correlação entre os níveis de citocinas encontrados com a atividade macrofágica nos dois polos. A atividade macrofágica era considerada segundo o número de imunomarcações encontradas para CD68, iNOS e Lisozima.

#### 6.3.1 Correlações observadas no grupo MHV

Observou-se, de acordo com a Figura 24, que houve uma correlação moderadamente negativa ( $r = -0.3562$ ) entre os níveis de CD68 e IFN-  $\gamma$  no polo virchowiano, porém sem significância,  $p=0,1924$ .

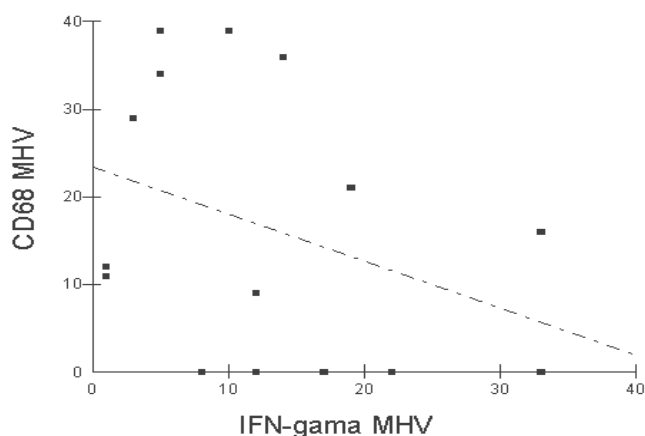


Figura 24 - Correlação entre CD68 MHV x IFN-gama MHV.  
 $r$  (Pearson)  $=-0.3562$ ;  $(p)=0.1924$ .  
Fonte: dados do autor.

Na Figura 25, observou-se no grupo MHV tendência a uma correlação também negativa entre a expressão de CD68 e a IL-10. Esta correlação, no entanto, não apresentou significância ( $p=0,0640$ ).

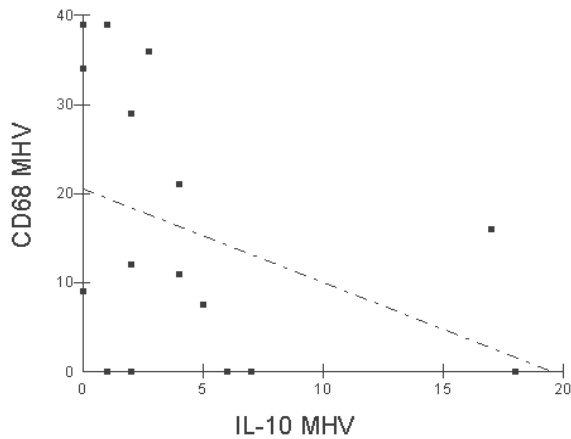


Figura 25 - Correlação entre CD68 MHV x IL-10 MHV  
 Coeficiente de Spearman (rs)=-0.4733; (p)=0.0640.  
 Fonte: dados do autor.

Quando comparada a expressão de CD68 aos níveis de TGF- $\beta$  no grupo MHV, observa-se (Figura 26) uma correlação moderadamente negativa ( $r = -0,3705$ ), porém não significativa ( $p = 0,1577$ ).

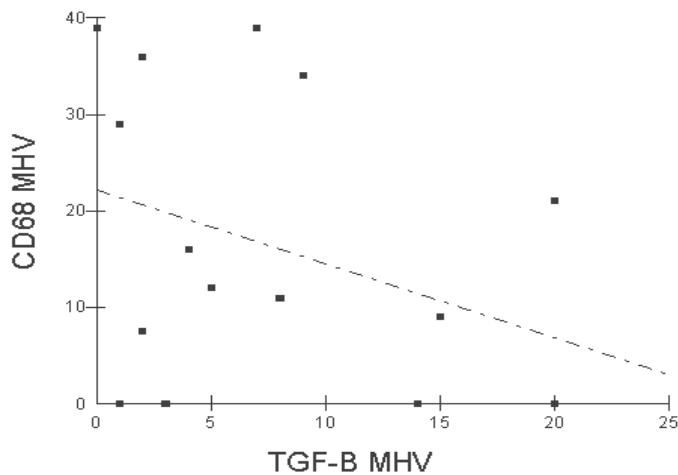


Figura 26 - Correlação entre CD68 MHV x TGF- $\beta$  MHV  
 $r$  (Pearson) =-0.3705; (p) =0.1577.  
 Fonte: dados do autor.

No polo virchowiano também foi possível observar uma correlação negativa baixa entre os níveis de iNOS x IFN- $\gamma$ ,  $r$  (Pearson)=-0,1210, sem significância; (p)=0.6676 (Figura 27).

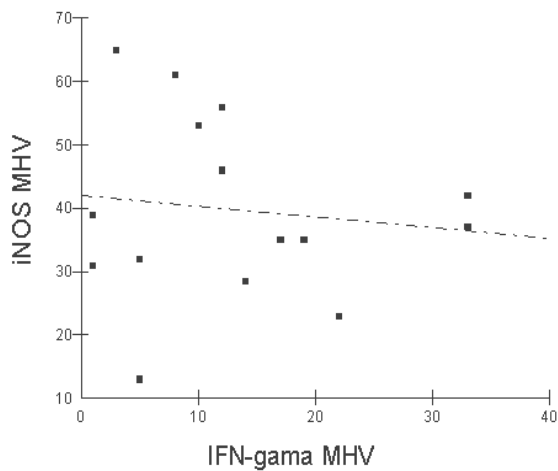


Figura 27 - Correlação entre iNOS MHV x IFN-gama MHV  
 $r$  (Pearson)=-0.1210; (p)=0.6676.  
 Fonte: dados do autor.

Houve uma correlação negativa ínfima ( $r_s=-0,0853$ ) entre a produção de iNOS e os níveis de IL-10 (Figura 28) no grupo MHV.

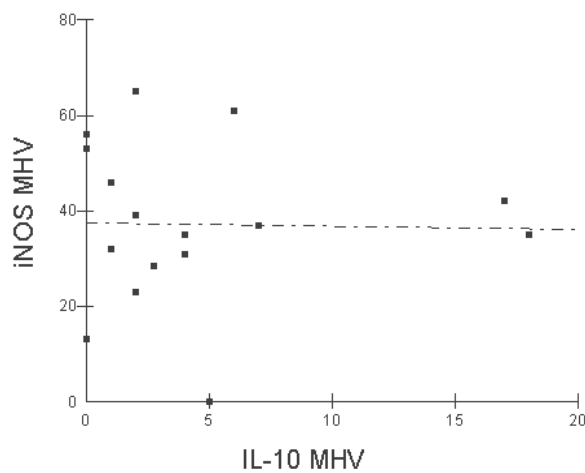


Figura 28 - Correlação entre iNOS MHV x IL-10 MHV  
 Coeficiente de Spearman  $r_s=-0.0853$ ; (p)=0.7536.  
 Fonte: dados do autor.

Na Figura 29 é possível observar uma correlação negativa baixa entre os níveis de iNOS e os níveis de TGF- $\beta$ .

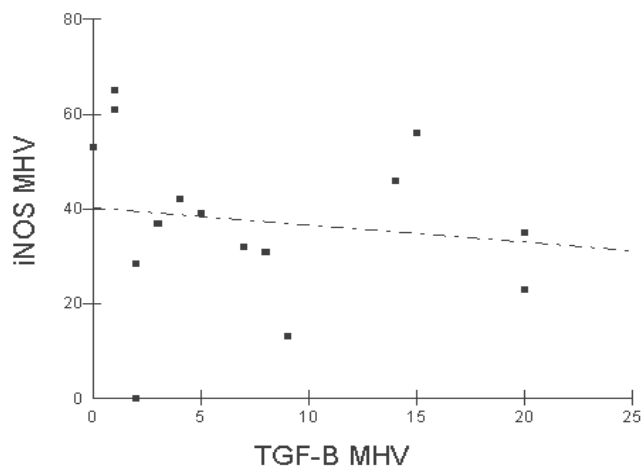


Figura 29 - Correlação entre iNOS MHV x TGF-β MHV  
 $r$  (Pearson)=-0.1570;  $(p)$ =0.5616.  
 Fonte: dados do autor.

Ainda como resultado, no polo virchowiano, observou uma associação negativamente moderada ( $r$ =-0.4126) entre os níveis de lisozima e IFN-γ (Figura 30).

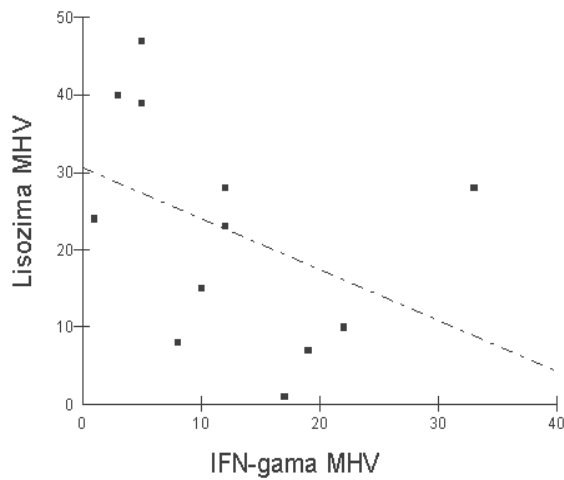


Figura 30 - Correlação entre Lisozima MHV x IFN-gama MHV  
 $r$  (Pearson)=-0.4126;  $(p)$ =0.1825.  
 Fonte: dados do autor.

Foi possível observar no grupo MHV, figura 31, uma correlação negativa entre a IL-10 e a Lisozima ( $r_s$ =-0.5278), porém não significativa.

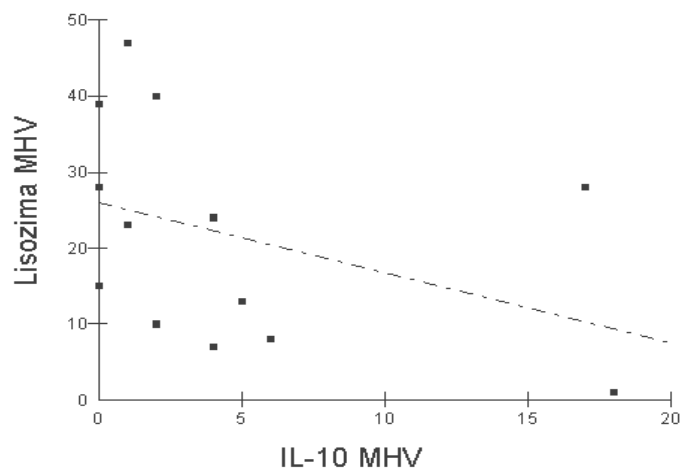


Figura 31 - Correlação entre Lisozima MHV x IL-10 MHV  
 Coeficiente de Spearman ( $r_s$ )=-0.5278; ( $p$ )=0.0637.  
 Fonte: dados do autor.

Os níveis de lisozima também apresentaram, segundo a figura 32, uma correlação negativa moderada com os níveis de TGF- $\beta$ .

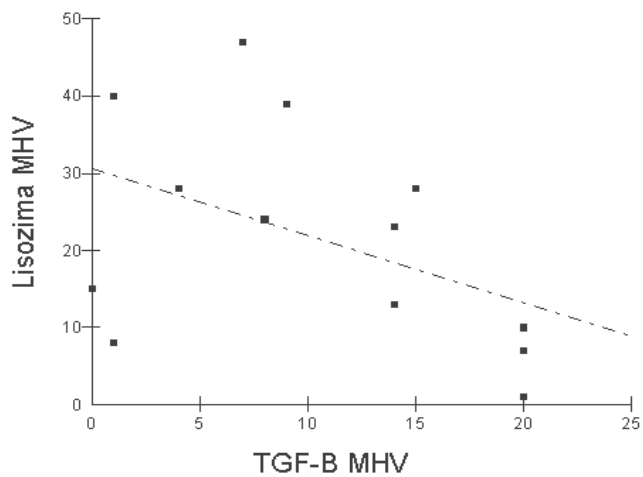


Figura 32 - Correlação entre Lisozima MHV x TGF- $\beta$  MHV  
 $r$  (Pearson) = -0.4527; ( $p$ ) =0.1203.  
 Fonte: dados do autor.

### 6.3.2 Correlações observadas no grupo MHT

Os níveis de IFN- $\gamma$  apresentaram uma correlação positiva baixa ( $r=0.0784$ ) com a expressão de CD68 no polo tuberculoide (Figura 33).



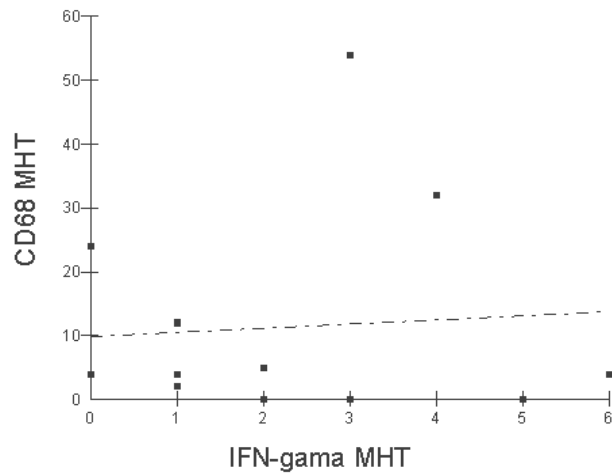


Figura 33 - Correlação entre CD68 MHT x IFN-gama MHT  
 $r$  (Pearson)=0.0784;  $(p)$  =0.7989.  
 Fonte: dados do autor.

De acordo com os dados obtidos também foi possível observar que no grupo MHT os níveis de CD68 estavam associados positivamente com a produção de IL-10 (Figura 34),  $r_s$ = 0.1627, sem significância estatística.

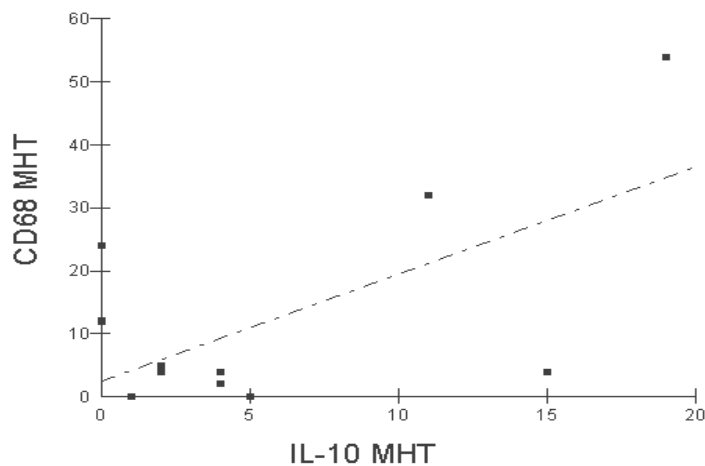


Figura 34 - Correlação entre CD68 MHT x IL-10 MHT  
 Coeficiente de Spearman ( $r_s$ )=0.1627;  $(p)$ =0.5954.  
 Fonte: dados do autor.

A correlação foi positiva também entre os níveis de TGF- $\beta$  e a expressão de CD68, figura 35, mas sem significância estatística ( $r_s$ =0.2360).

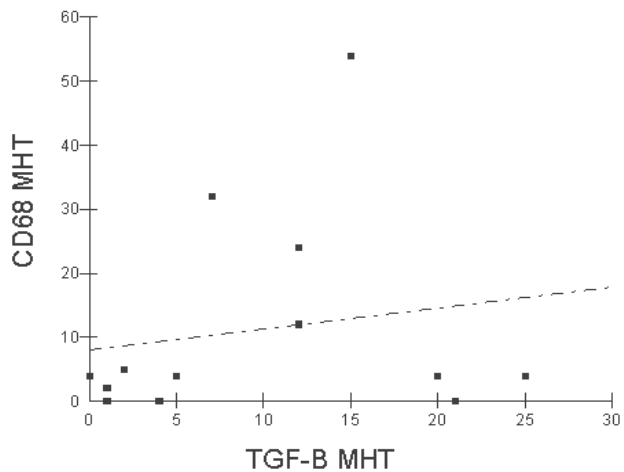


Figura 35 - Correlação entre CD68 MHT x TGF-β MHT  
 Coeficiente de Spearman (rs)=0.2360; (p)=0.4376.  
 Fonte: dados do autor.

Os níveis de IFN-γ apresentaram uma correlação positiva baixa de acordo com a apresentação da figura 36,  $r = 0.2582$ .

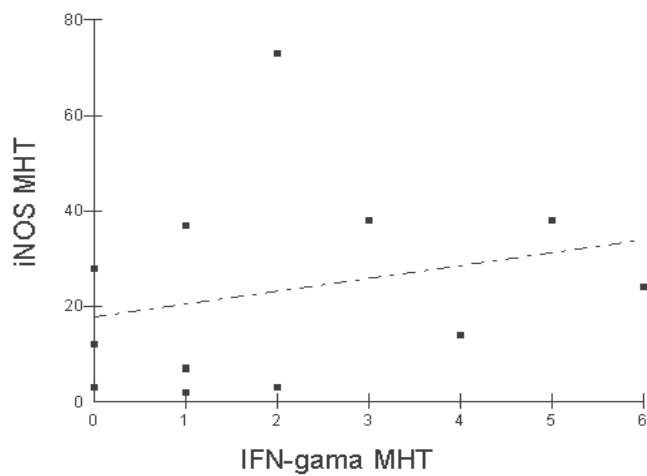


Figura 36 - Correlação entre iNOS MHT x IFN-gama MHT  
 $r$  (Pearson)=0.2582; (p)=0.4178.  
 Fonte: dados do autor.

Neste polo foi possível observar, figura 37, uma correlação negativa ínfima entre os níveis de iNOS e os níveis de IL-10 ( $r = 0.0502$ ).

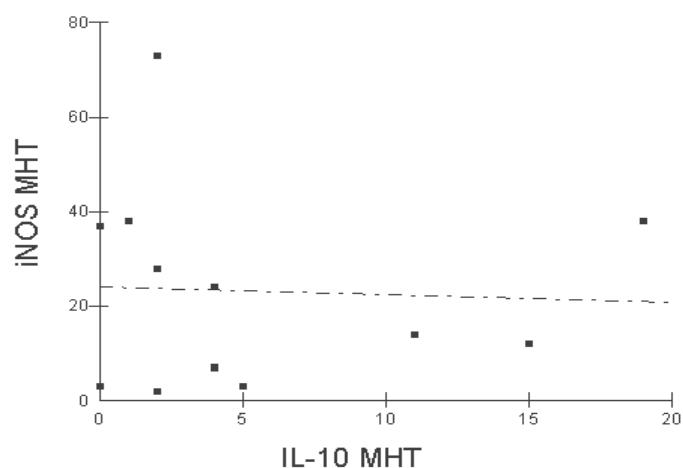


Figura 37 - Correlação entre iNOS MHT x IL-10 MHT  
 $r$  (Pearson) = -0.0502;  $(p)=0.8768$ .  
 Fonte: dados do autor.

Os níveis de iNOS no grupo MHT apresentaram uma associação positiva ínfima com o TGF- $\beta$ , de acordo com a figura 38 ( $r=0.0499$ ).

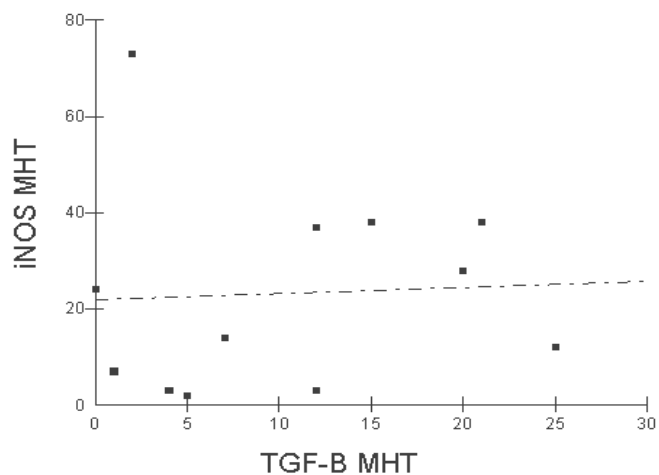


Figura 38 - Correlação entre iNOS MHT x TGF- $\beta$  MHT  
 $r$  (Pearson) =0.0499;  $(p) =0.8777$ ;  
 Fonte: dados do autor.

A lisozima, no tecido de pacientes hansênicos tuberculoides, correlacionou-se negativamente, como mostrado na figura 39, com os níveis de IFN- $\gamma$  ( $rs=-0.1234$ ) sem significância estatística.

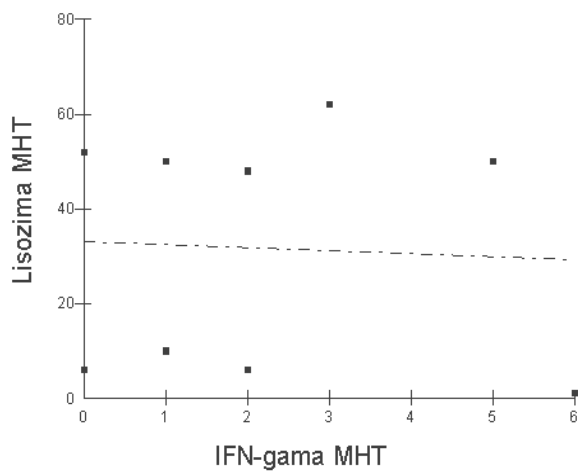


Figura 39 - Correlação entre Lisozima MHT x IFN-gama MHT  
 Coeficiente de Spearman (rs)=-0.1234; (p)=0.7518;  
 Fonte: dados do autor.

No grupo MHT os níveis de lisozima apresentou correlação positiva baixa com a produção da IL-10,  $r=0.2033$  (Figura 40).

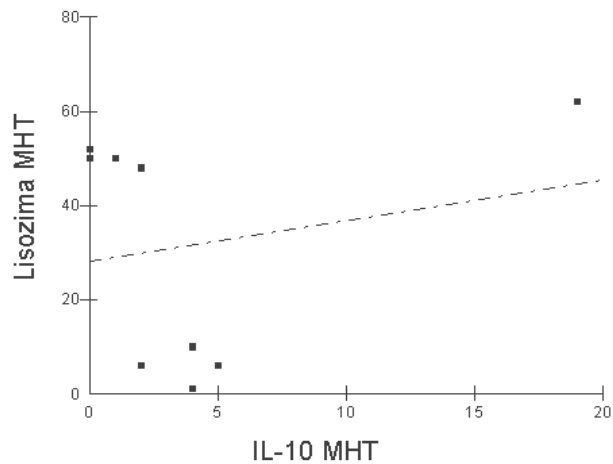


Figura 40 - Correlação entre Lisozima MHT x IL-10 MHT  
 $r$  (Pearson) = 0.2033; (p) =0.5998.  
 Fonte: dados do autor.

A figura 41 demonstra uma correlação positiva da lisozima com os níveis de TGF- $\beta$  nos indivíduos do grupo MHT,  $rs=0,5106$ , sem significância estatística.

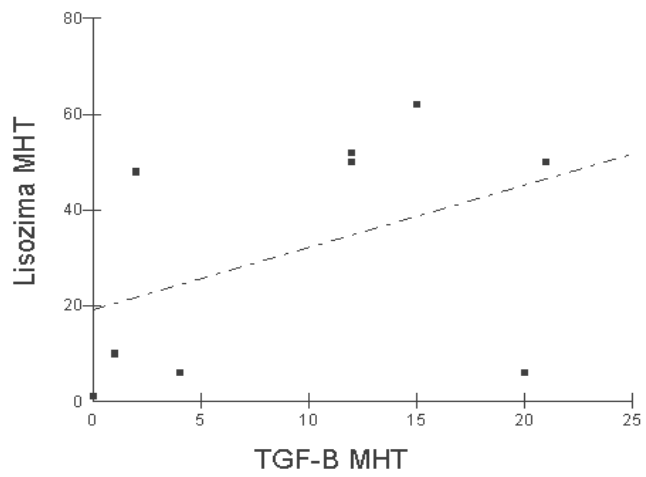


Figura 41 - Correlação entre Lisozima MHT x TGF-B MHT  
Coeficiente de Spearman ( $r_s$ )=0.5106; ( $p$ )=0.1601.  
Fonte: dados do autor.

## 7 DISCUSSÃO

Com frequência o Pará tem sido citado nos meios de comunicação como o estado com o maior número de novos casos no Brasil e que não tem conseguido atingir as metas de diminuição da prevalência da hanseníase definidas pela OMS.

As respostas funcionais das células T são iniciadas pelo reconhecimento dos complexos peptídeo-MHC nas superfícies das APCs. Essas respostas requerem reconhecimento específico do antígeno, adesão estável entre a célula T e as APCs e a liberação de sinais de ativação para as células T. Esses componentes de respostas das células T aos antígenos são mediados por distintas séries de moléculas expressas nas células T (MACHADO et al., 2004).

As células T CD4 e CD8 são co-receptores expressos em subpopulações mutuamente exclusivas de células T maduras que se ligam, respectivamente, a regiões não-polimórficas das moléculas do MHC. A CD4 é expressa nas células T auxiliares restritas à classe II e a CD8 é expressa nas CTLs restritas à classe I. Quando as células T reconhecem os complexos peptídeo-MHC, CD4 e CD8 liberam sinais que são essenciais para iniciar as respostas das células T (ALVES et al., 2006; SOUZA; PEREIRA, 2007; SAMANO et al., 2004).

As citocinas são proteínas que sinalizam e medeiam muitas das respostas de imunidade inata e adaptativa. As que medeiam a imunidade inata são produzidas principalmente por macrófagos ativados e incluem a IL-12 que estimula a produção de IFN- $\gamma$  e esta funciona com citocina ativadora de macrófago e a IL-10 que é um inibidor de macrófagos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003; MACHADO et al., 2004).

Há também as citocinas que medeiam e regulam as respostas imunológicas adaptativas, produzidas principalmente por linfócitos T estimulados por antígenos, entre elas a IL-4 que estimula a produção de IgE e o desenvolvimento de células TH2 e o TGF- $\beta$  que inibe a proliferação de linfócitos T e a ativação de leucócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003; MACHADO et al., 2004).

A imunidade inata contra bactérias intracelulares, com o bacilo de Hansen, é mediada principalmente pelos macrófagos. Entretanto, as bactérias intracelulares são capazes de sobreviver e se replicar dentro das células do hospedeiro, incluindo os fagócitos, porque elas desenvolveram mecanismos para resistir à degradação dentro do fagócito. Na imunidade adaptativa, mediada por células encontramos a ativação de macrófagos por células T CD4+, bem como a destruição de células infectadas pelas CTLs CD8+. Com resposta patológica característica a inflamação granulomatosa.

Diversas são as hipóteses que tem sido utilizadas para explicar as diferentes respostas imunológicas entre os polos tuberculoide e virchowiano da hanseníase. O paradigma TH1 e TH2, baseado na discriminação funcional de células Th de acordo com o padrão de citocinas produzidas promovem respectivamente uma resposta imunológica celular e humoral (MENDONÇA et al., 2008; ROA et al., 2008; SAMPAIO; SARNO, 1998; SCOLLARD et al., 2006; SPELBERG; EDWARD, 2001).

Segundo Santos et al. (2005) a defesa do organismo contra o *M. leprae* é efetuada pela resposta imunológica celular onde os macrófagos serão capazes de fagocitar e destruir os bacilos. Essa ação será mediada por citocinas (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e mediadores da oxidação, como os reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição dos bacilos no interior dos macrófagos.

O IFN- $\gamma$  é uma citocina importante na ativação de macrófago o que faz com que essas células passem a apresentar uma maior produção de reativos intermediários do nitrogênio e do oxigênio que são importantes na destruição do patógeno intracelular. Segundo alguns autores essa citocina é encontrada em níveis séricos maiores nos pacientes portadores de hanseníase tuberculoide (FOSS, 1997; HAGGE et al., 2004).

Quiroga et al. (2004) afirmaram que a forma virchowiana ocorre por uma diminuição da sinalização pelo antígeno para a produção de IFN- $\gamma$ , apresentado uma

diminuição da produção de citocinas de perfil TH1 o que resulta numa baixa resposta imunológica celular.

Roa et al. (2008) descreveram o papel sinergista das interleucinas, IL-12 e IL-18, na promoção da resposta imunológica celular ao *M. Leprae*, eles também enfatizam que é possível, através destas citocinas, restabelecer os níveis de IFN- $\gamma$  em células mononucleares do sangue periférico.

Os níveis de IFN- $\gamma$ , nos indivíduos estudados, foram maiores no grupo MHV, com alta significância estatística ( $p= 0,0007$ ), tabela 5, figura 12, porém, quando correlacionados neste grupo com o CD68, o iNOS e a lisozima, os níveis de IFN- $\gamma$  apresentaram uma correlação negativa evidenciando uma baixa atividade macrófágica apesar da alta expressão do IFN- $\gamma$ . Segundo Xavier (2005) a pesquisa através de imunoistoquímica em pacientes hanseníacos co-infectados com HIV evidencia que CD68+ está presente em todas as formas de hanseníase.

Esta ocorrência provavelmente se deve a uma resposta ao maior número de bacilos e poderá posteriormente ser explicado através de pesquisas que tentem esclarecer a eficiência do fagossomo. O número pequeno de indivíduos nos dois grupos pode também ter interferido nesse resultado.

O presente estudo parece discordar da literatura quando se refere a prevalência das citocinas por polo, embora os estudos citados tenham sido realizados com dosagem séricas não houve coerência com os resultados obtidos através da imunoistoquímica em lesões de pele de pacientes com hanseníase tuberculoide e virchowiana.

No grupo MHT, observa-se uma coerência com a literatura já que o IFN- $\gamma$  teve correlação positiva com os níveis de iNOS,  $r$  (Pearson)=0.2582, e com a expressão de CD68,  $r$  (Pearson)=0.0784, evidenciando a ação macrófágica neste grupo porém, apresentou uma correlação negativa com os níveis de lisozima, sem significância estatística.



A expressão de iNOS não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados, ( $p=0,06$ ), porém, no grupo MHV os níveis de iNOS apresentaram uma correlação negativa com todas as citocinas estudadas, IFN- $\gamma$  ( $r$  Pearson=-0,1210), IL-10 ( $r_s=-0.0853$ ) e TGF- $\beta$  ( $r$  Pearson =-0.1570).

Kang et al. (2004) observaram num grupo de pacientes com hanseníase que polimorfismos dos genes TLR2 mostraram uma diminuição significativa da produção das citocinas IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , além do aumento da produção de IL-10, levando a conclusão de que a mutação do TLR2 em Arg677Trp pode levar ao mecanismo da fraca resposta imunológica celular que ocorre no polo lepromatoso.

As células que apresentam esta mutação, quando são estimuladas pelo bacilo ou antígenos do *M. leprae*, é possível observar uma falha da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, relevante para a produção de citocinas inflamatórias, determinando diminuição da produção de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e aumento da produção de IL-10, em comparação com células sem a mutação (BOCHUD; HAWN; ADEREM, 2003; KANG et al., 2004).

Neste estudo foi possível observar uma correlação negativa baixa entre os níveis de IL-10 e iNOS nos dois grupos, confirmando o papel inibidor dessa citocina sobre a ação dos macrófagos.

Foss, Oliveira e Silva (1995) encontraram em seus estudos uma depressão da resposta imunológica celular na hanseníase virchowiana, diretamente relacionada com a deficiência de estimulação macrofágica e a menor produção de TNF- $\alpha$ , favorecendo a multiplicação bacilar e a disseminação da doença, e que a presença do TGF- $\beta$  leva a uma diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e de intermediários do oxigênio.

Na presente pesquisa observou-se que em lesões de pele de pacientes virchowianos o TGF- $\beta$  não se mostrou significativamente diferente dos níveis encontrados em tecidos de indivíduos tuberculoides e ainda que no polo virchowiano essa citocina apresentou uma correlação negativa baixa com a produção de iNOS,

ao passo que, os níveis de iNOS no grupo MHT apresentaram uma associação positiva ínfima com o TGF- $\beta$ .

Oliveira (1996) observou, através de um estudo imunohistoquímico correlacionado com a dosagem sérica de citocinas, que em pacientes virchowianos encontraram-se níveis séricos de IL-4 elevados em relação aos soros de tuberculoídes. No presente estudo esta citocina apresentou fraca expressão nos tecidos de pacientes, tanto tuberculoide quanto virchowiano, não sendo possível compará-los concordando com os achados de Stefani (2003).

Dados encontrados por Almeida, 1996, sugerem que a produção de IL-4, citocina supressora da atividade macrofágica, está relacionada à depressão da resposta imunológica.

A interleucina 10 (IL-10) tem atividade anti-inflamatória e imunoreguladora sobre a resposta TH1 pela supressão de IFN- $\gamma$ , TNF e GM-CSF. Na hanseníase, esta citocina está envolvida com a evolução da doença, já que uma alta razão TNF/IL-10 está associada a um melhor prognóstico em contatos sadios (LIMA et al., 2000; SOUZA; PEREIRA, 2007).

A IL-10 está aumentada na forma multibacilar da doença (SOUZA; PEREIRA, 2007). No presente estudo os níveis de IL-10 não diferem entre os grupos estudados, contrapondo a literatura.

Estudos observaram que alterações inatas do receptor LIR-7 desencadeiam uma diminuição da produção de interleucina-12 e aumento da expressão de interleucina-10 resultando no bloqueio da atividade antimicrobiana. Foi possível então, para os autores, correlacionar o perfil de expressão gênica dos Toll-like receptores e a definição das formas clínicas da hanseníase além de novas linhas para pesquisas sobre a regulação de respostas imunológicas aos patógenos (BLEHARSKI et al., 2003).

Meisner (2001) encontrou polimorfismos no gene da proteína 1 do macrófago associado à resistência natural (Nramp1) e associou com a hanseníase

MB em pacientes africanos, e esse gene também tem sido relacionado com a deficiência da resposta imunológica celular ao *Mycobacterium leprae*.

Ainda dentro da complexidade poligênica que tenta explicar a susceptibilidade à hanseníase, estudos aprofundados sobre as regiões 6q21 e 6q25, concluíram que dois alelos eram informativos acerca desta associação, o alelo C do SNP rs1040079 e o alelo T na posição -2599, na região compartilhada pelos genes PARK2 e PACRG (MALHOTRA et al., 2006; MIRA et al., 2004).

A técnica de imunoistoquímica tem limitações quanto à amplificação pela reação com anticorpos assim como quanto aos métodos utilizados para contagem das marcações.

Watanabe et al. (2003) desenvolveram um *software* de processamento de imagens capaz de auxiliar na análise das imagens imunoistoquímicas de dupla marcação afim de uniformizar a quantificação e classificação de imagens, programas como esses automatizam a análise de várias imagens com marcadores de mesmas tonalidades, diminuindo a interatividade, subjetividade e o fator do erro humano. Tudo isso sem a necessidade de *hardware* robusto ou específico, ou pessoal especializado em processamento de imagens.

## 8 CONCLUSÃO

Os grupos estudados não apresentaram diferença significativa quanto aos níveis de IL-10, TGF- $\beta$ , CD68, iNOS e Lisozima.

Os níveis de IL-4 não foram expressivos nos tecidos analisados, portanto, não foi possível compará-la entre os polos.

Os níveis de IFN- $\gamma$  foram maiores nos pacientes do grupo MHV.

No polo virchowiano todas as citocinas tiveram uma tendência a uma correlação negativa com a atividade de macrófagos.

No polo tuberculoide a IL-10 apresentou uma tendência à correlação negativa com os níveis de iNOS, IFN- $\gamma$  e lisozima, evidenciando uma inibição da atividade macrofágica por esta citocina.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

ABEN-ATHAR, J. Relatório apresentado ao Primeiro Congresso Sul-Americano de Dermatologia e Syphiligraphia (1918). In: 8. Congresso Brasileiro de Medicina, 1918, Rio de Janeiro. 2. Boletim. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1921, p. 82-86.

ALCAÏS, A.; SANCHEZ, F. O.; THUC, N. V.; LAP, V. D.; OBERTI, J.; LAGRANGE, P. H.; SCHURR, E.; ABEL, L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **The Journal of Infectious Diseases** v.181, p. 302-308, 2000.

ALGOOD, H. M.; LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41 (Suppl,3), p. S189–93, 2005.

ALMEIDA, A. M. Concentração sérica de citocinas no espectro das formas clínicas da hanseníase. Dissertação de Mestrado, **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da USP**. Ribeirão Preto, 1996.

ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERO, V. C.; SALES, A. M.; DUPPRE, N.C; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M.O. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Contacts. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 509-512, ago. 2004.

ALVES, C.; VIEIRA, N.; MEYER, I.; OLIVEIRA-ALVES, C.; TORALLES, M.B.; OLIVEIRA, M. F. Antígenos de histocompatibilidade humanos e dermatologia: da pesquisa para a prática clínica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 81, n.1, p. 65-73, 2006.

AMADOR, M. P. S. C., Soroprevalência para Hanseníase em Áreas Endêmicas do Estado do Pará. 126 f. Dissertação (Mestrado em Patologia das Doenças Tropicais) - **Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará**, Bélem, 2004.

AMARAL, E. P. Análise Espacial da Hanseníase na Microrregião de Almenara – Minas Gerais: relação entre situação epidemiológica e as condições socioeconômicas. 91 f. Dissertação (Mestrado em Efermagem) - **Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2008.

AMER, A.O.; SWANSON, M.S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 56–61, 2002.

ANTAS, P. R. Z.; CARDOSO, F. L. L.; OLIVEIRA, E. B.; GOMES, P. K. C., CUNHA, K. S.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, P. E. Whole Blood Assay to Access T Cell-immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Healthy Brazilian Individuals. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 53-55, fev. 2004a.

ANTAS, P. R. Z.; SALES, J. S.; PEREIRA, K. C.; CUNHA, K. S.; SARNO, E. N.; Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 8, p. 1119-1129, maio. 2004b.

ANTUNES, S. L. G. CHIMELLI; L. M.; RABELLO, E. T.; VALENTIM, V. C.; CORTE-REAL, S.; SARNO, E. N.; JARDIM, M. R. An immunohistochemical, clinical and electroneuromyographic correlative study of the neural markers in neuritic form of leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 8, p. 1071-1081, abr. 2006.

ARAOZ, R.; HONORE, NADINE; CHO, S. KIM, J.; CHO, SAMG-NAE; MONOT, MARC. Antigen Discovery: a Postgenomic Approach to Leprosy Diagnosis. **Infection and Immunity**, Paris, v. 74, n. 1, p. 175–182, jan. 2006.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 36, n. 3, p. 307 – 382, mai-jun, 2003.

ARAÚJO, H. C. S. **Lazarópolis do Prata**, Pará: Empreza Graphica Amazônia, 1924. 188p.

\_\_\_\_\_. **História da Lepra no Brasil**, Períodos colonial e monárquico (1500-1889) vol.1, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1946. 559p.

\_\_\_\_\_. **História da Lepra no Brasil**, Período Republicano (1890-1952) vol.III, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1956. 715p.

AQUINO, D. M. C.; CALDAS, A. J. M.; SILVA, A. A. M.; COSTA, J. M. L. Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.57-64, jan-fev, 2003.

AYRES, M.; AYRES, M.JR.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S.S. **Biostat 5.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém, Pará, Brasil: Sociedade Civil Mamirauá. Brasília, Distrito Federal, Brasil: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2007. 324 p.

BARRETO, J. A.; BELLONE, A. F. F.; FLEURY, R. N.; SOARES, C. T.; LAURIS, J. R. P. Manifestações de padrão tuberculoide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imuno-histoquímico comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, supl. 3, p. S268-74, 2005.

BEIGUELMAN, B. Genética e Hanseníase. **Ciência & Saúde Coletiva**. São Paulo, v. 7, n.1, p. 117-128, 2002.

BLEHARSKI, J. R.; HUIYING LI; MEINKEN, C.; GRAEBER, T. G.; OCHOA, M. T.; YAMAMURA, M.; BURDICK, A.; SARNO, E. N.; WAGNER, M.; RO'LLINGHOFF, M.; REA, T. H.; COLONNA, M.; STENGER, S.; BLOOM, B. R.; EISENBERG, D.; MODLIN, R. Use of Genetic Profiling in Leprosy to Discriminate Clinical Forms of the Disease. **Science**, v. 301, p. 1527-1530, 12 set., 2003. Disponível em: [www.sciencemag.org/cgi/content/full/sci;301/5639/1527/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/sci;301/5639/1527/DC1) Acesso em: 25 de maio de 2008.

BOBROW, M. N.; HARRIS, T. D.; SHAUGHNESSY, K. J.; LITT, G. J. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. **Journal Immunology Methods**, v.125, p. 279-285, 1989.

BOCHUD, P. Y.; HAWN, T. R.; ADEREM A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 3451-4, 2003.

BOES, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 1141-1149, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). **Normas para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96 e outras)**. Série cadernos técnicos, supl. 3, 139 p, Ministério da Saúde, 2000.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS, Acompanhamento da Hanseníase – Pará. Taxa Prevalência Segundo Município. Período: 2006. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?hans/hanswpa.def> Acesso em: 29 de março 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica **VIGILÂNCIA EM SAÚDE: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica - n. 21 Brasília – DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Amazônia avalia ações do Programa de Controle da Hanseníase**. 2008. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=28488](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=28488). Acesso em: 18 de junho de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Leprologia**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Lepra, 1960. 172 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN/SVS. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. 2008. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf). Acesso em 10/02/2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN. **HANSENÍASE – Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**, 2009. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hanseniaase/bases/Hansbrnet.def>>. Acesso em: 20 de fev. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância da Amazônia. SIVAM. **Amazônia Legal**. 2008. Disponível em: <<http://www.sivam.gov.br/AMAZONIA/apres1.htm>>. Acesso em 18 junho de 2008.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia** 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1488 p.

BUHRER-SEKULA, S.; SARNO, E. N.; OSKAM, L.; SARI, K. The use of ML Dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 68, p. 456-63, dez. 2000. Disponível em: <[http://findarticles.com/p/articles/mi\\_qa3754/is\\_/ai\\_n8915085](http://findarticles.com/p/articles/mi_qa3754/is_/ai_n8915085)> Acesso em 12 de junho de 2008.

BUHRER-SEKULA, S., CUNHA, M. G. S.; FOSS, N. T.; OSKAM, L. FABER, W. R.; KLASTAR, P. R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 4, p. 317-323, abr. 2001.

BUHRER-SEKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; LEEUWEN J. VAN; AMADOR, S; FUJIWARA, T.; KLASTAR, P. R.; OSKAM, L. Simple and fast lateral Flow Test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, maio, 2003.

CONDE, M. B.; SUFFYS, P.; SILVA, J. R. L.; KRITSKI, A. L.; DORMAN, S. E. Immunoglobulin A (IgA) and IgG Immune Responses against P-90 Antigen for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis and Screening for *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 94–97, jan. 2004.

CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA 6. Madrid, 1953. Memória. Madrid: Association de La Lepra, 1953.

DEPS, P. D.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy occurring as immune reconstitution syndrome. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 10, p. 966-968, jul. 2008.

DOUGLAS, T. J.; CELLONA, R. V.; FAJARDO JR, T. T.; ABALOS, R. M.; BALAGON, M. V. F.; KLASTAR, P. R. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 5, p. 897-900, set. 2004.



DUTHIE, S. M.; GOTO, W.; IRETON, C. G.; REECE, S. T.; CARDOSO, L. P. V.; MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. A.; NAKATANI, M.; JESUS, R. C.; NETTO, E. M.; BALAGON, M. V. F.; TAN, E.; GELBER, R. H.; MAEDA, Y.; MAKINO, M.; HOFT, D.; REED, S. G. Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400–1408, nov. 2007.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade** v.13, n. 2, p. 76-88, maio-ago 2004.

ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A.; AMEZCUA, M. E.; PASTÉN, S.; PALLARES, F.; CÁZARES, J. V.; PULIDO, R. M.; FLORES, O.; CASTRO, E.; RODRÍGUEZ, O. Comparative assessment of the leprosy antibody absorption test, *Mycobacterium leprae* extract enzyme-linked immunosorbent assay, and gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of lepromatous leprosy. **Journal of Clinical Microbiology** v. 31, n. 5, p. 1329-1333, maio, 1993.

FLEURY, R. N. Critérios para o emprego de classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica: primeira parte. **Hansenologia Internationalis**, v. 30, n. 2, p. 201-205, 2005.

\_\_\_\_\_. Critérios para o emprego de classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica: segunda parte. **Hansenologia Internationalis**, v. 31, n. 1, 2006. Disponível em: <http://www.ils.br/revista/index.php/hi/article/view/22/9>. Acesso em 18 março de 2008

FOSS, N. T. Episódios Reacionais da Hanseníase. In: Simpósio de Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 36, p. 453-459, abr./dez. 2003.

\_\_\_\_\_. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 30, p.335-339, jul./set. 1997.

FOSS, N. T.; OLIVEIRA, M. S. A.; SILVA, C. L. Avaliação da atividade macrofágica na hanseníase virchoviana e tuberculoide. **Hansenologia Internationalis**, v. 20, n. 1, p. 5-10, 1995.

GAMA, R.; OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, R. Velhice e hanseníase: encontros e desencontros no espaço asilar. 2004, 87 p. **Monografia (Especialização em envelhecimento e saúde do idoso)** Universidade do Estado do Pará – UEPA. Centro de Ciências da Saúde. Belém, 2004.

GOMES, F.G.; FRADE, M.A.C.; FOSS, N.T. Úlceras cutâneas na hanseníase: perfil clínico-epidemiológico dos pacientes. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 433-437, 2007.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, jul-ago, 2002.

GOULART, I. M. B.; SOUZA, D. O. B.; MARQUES, C. R.; PIMENTA, V. L.; GONÇALVES, M. A.; GOULART, L. R. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 1, p. 101-105, jan. 2008.

GREENWOOD, C. M. T; FUJIWARA, T. M.; BOOTHROYD, L. J.; MILLER, M. A.; FRAPPIER, D.; FANNING, E. A.; SCHURR, E.; MORGAN, K. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 405-416, 2000.

GROATHOUSE, N. A.; AMIN, A.; MARQUES, M. A. M.; SPENCER, J. S.; GELBER, R.; KNUDSON, D. L.; BELISLE, J. T.; BRENNAN et al. Use of Protein Microarrays To Define the Humoral Immune Response in Leprosy Patients and Identification of Disease-State-Specific Antigenic Profiles. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6458–6466, nov. 2006.

GUNATILAKE, S. B.; SETTINAYAKE, S. **Leprosy**, Practical Neurology, v. 4, p. 194-203, 2004. Disponível em: <http://pn.bmj.com/cgi/reprint/4/4/194>, acesso em 27 de março 2008.

HAGGE, D. A.; RAY, N. A.; KRAHENBUHL, J. L.; ADAMS, L. B. An In Vitro Model for the Lepromatous Leprosy Granuloma: Fate of *Mycobacterium leprae* from Target Macrophages after Interaction with Normal and Activated Effector Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 7771-7779, 2004.

HATAGIMA, A.; OPROMOLLA, D. V. A.; URA, S.; FEITOSA, M. F.; BEIGUELMAN, B., KRIEGER, H. No evidence of linkage between the Mitsuda reaction and the NRAMP 1 locus. **International Journal of Leprosy**, v. 69, n. 2, 2001. Disponível em: [http://findarticles.com/p/articles/mi\\_qa3754/is\\_200106/ai\\_n8954089/](http://findarticles.com/p/articles/mi_qa3754/is_200106/ai_n8954089/)> acesso em 12 de junho de 2008.

HERRERA, M. T.; TORRES, M.; NEVELS, D.; PEREZ-REDONDO, C. N.; ELLNER, J. J.; SADA, E.; SCHWANDER, S. K. Compartmentalized bronchoalveolar IFN- $\gamma$  and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, doi:10.1016 p. 1-10, fev. 2008.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, abr. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166661>> Acesso em 10 de maio de 2008.

HUNTER, W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n 3. p. 728-735, set. 1981.

IZUMI, S.; FUJIWARA, T.; IKEDA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; KAWATSU, K. Novel Gelatin Particle Agglutination Test for Serodiagnosis of Leprosy in the Field. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 525-529, mar. 1990.

JARDIM, M. R.; ILLARRAMENDI, X.; NASCIMENTO, O. J. M.; NERY, J. A. C.; SALES, A. M.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Pure Neural Leprosy. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 65, n. 4-A, p. 969-973, 2007.

JUNQUEIRA, A. V.; CAIXETA, L. F. Hanseníase: revisão para o neurologista. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n.3, p. 27-30, 2008.

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

KUMAR, V.; FAUSTO, N. ABBAS, A. K.; **Robbins e Cotran: Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1616p.

KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C.; Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity**, v. 16, p. 1-4, 2002.

LIMA, E. S.; ROLAND, I. A.; MAROJA, M.F.; MARCON, J. L. Vitamin A and Lipid Peroxidation in Patients with Different Forms of Leprosy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 211-214, jul-ago. 2007.

LIMA, M. C. B. S.; PEREIRA, G. M. B.; RUMJANEK, F. D.; GOMES, H. M.; DUPPRE, N.; SAMPAIO, E. P.; ALVIM, I. M. P.; NERY, J. A. C.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C. V. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, n. 4, p. 419-28, abr. 2000.

LOCKWOOD, D. N. J.; COLSTON, M. J.; KHANOLKAR-YOUNG, S.R. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 409-415, 2002.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infection. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.79, n.6 Rio de Janeiro Nov./Dez., 2004.

MADEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia**, ed 1. São Paulo. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000, p 13.

MAGALHÃES, M. C. C.; ROJAS, L. I. Evolución de la endemia de La lepra en Brasil, **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 8, n. 4, p. 342-55, 2005.

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

MALHOTRA, D.; DARVISHI, K.; LOHRA, M.; KUMAR, H.; GROVER, C.; SOOD, S.; BELUM SN REDDY, B. S. N.; BAMEZAI, R. N. K. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, p. 438–442, 2006.

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D.; MELO, G E. B. A.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da Hanseníase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343-50, 2008.

MEISNER, S. J.; MUCKLOW, S.; WARNER, G.; SOW, S. O.; LIENHARDT, C.; HILL, A. V. S.; Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 733–735, 2001.

MIRA, M. T.; ALCAÏS, A.; THUC, N. V.; MORAES, M. O.; DI FLUMERI, C.; THAI, V. H.; PHUONG, M. C; HUONG, N. T.; NGOC BA, N.; KHOA, P. X.; SARNO, E. N.; ALTER, A.; MONTPETIT, A.; MORAES, M. E.; MORAES, J. R.; DORÉ, C.; GALLANT, C. J.; LEPAGE, P.; VERNER, A.; DE VOSSE, V.; HUDSON, T. J.; ABEL, A.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**. v. 427, p. 636-40, 2004.

MITSUDA, K. Les lépreux maculo-nerveux, d'une part, les tubereux d'autre part, se comportent différemment à la suite d'une inoculation d'émulsion de tubercle lépreux. In: **Conference Internationale de La Lepre**, 3, Strasbourg, p. 219-220, 1923.

MOREIRA, J. **Les origines plus éloignées de la lépre au Brésil**. *Lepa – Bibliotheca Internationalis*, v. VII, p. 72, 1908.

OLIVEIRA, M. S. A. Correlação entre a resposta imunocelular periférica e características imunohistoquímicas das lesões cutâneas nas formas polares da hanseníase. Tese de Doutorado. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP**. Ribeirão Preto, 1996.

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia**, ed 1. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 80, n. 3, p.293-4, 2005.

OPROMOLLA, P. A. Informação em Saúde: a trajetória da hanseníase no Estado de São Paulo, 1800-2005, 2007. 149 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2007.

PARDILLO, F. E.F; TRANQUILINO, T. F.; FAJARDO, R. M. A.; SCOLLARD, D.; ROBERT, H.G. Methods for the Classification of Leprosy for Treatment Purposes **Clinical Infectious Diseases**. v. 44, p. 1096–1099, 2007.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, n.3-4, p.185-91, jun-ago. 2003.

PONTES, A. R. B.; ALMEIDA, M. G. C.; XAVIER, M. B.; QUARESMA, J. A. S.; YASSUI, E. A. Detecção do DNA de *Mycobacterium leprae* em secreção nasal. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61 (esp), p.734-747, Brasília, 2008.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T.; Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 85, p. 451-459, 2007.

QUIROGA, M. F.; MARTINEZ, G. J.; PASQUINELLI, V.; COSTAS, M. A.; BRACCO, M. M.; MALBRÁN, A.; OLIVARES, L. M.; SIELING, P. A.; GARCIA, V. E. Activation of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Triggers a Signaling Cascade That Enhances TH1 Responses in Human Intracellular Infection<sup>1</sup>. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 4120–4129, 2004.

RAUPACH, B.; SHE, K. Immune responses to intracellular bacteria. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 417-428, 2001.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy**. v. 4, p. 255-273, 1966.

ROA, R. I. L.; VELÁSQUEZ; C. G.; NAVARRO, A. A.; BUELNA, M. M.; NIEBLA, C. G.; MORRIS, M. F. Recovery of IFN- $\gamma$  levels in PBMCs from lepromatous leprosy patients through the synergistic actions of the cytokines IL-12 and IL-18. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 13-14, p. 1715 - 1720, 2008.

RUSSELL, J.H.; LEY, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 323-370, 2002.

SAMANO, E. S. T.; RIBEIRO, L. M.; GORESCU, R. G.; ROCHA, K. G.; GRUMACH, A. S., Involvement of C4 Allotypes in Pathogenesis of Human Diseases, **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 59, n.3, p.138-144, 2004.

SAMPAIO, E. P; SARNO, E. N. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research** v. 31, n. 1, p. 69-76, 1998.

SANTOS, A. P. T.; ALMEIDA, G. G.; MARTINEZ, C. J.; REZENDE, C. Imunopatologia da Hanseníase: Aspectos Clínicos e Laboratoriais. **NewsLab** - edição 73, p. 142-156, 2005.

SANTOS, G. G.; MARCUCCI, G.; GUMARÃES JÚNIOR, J.; MARGARIDO, L. C.; LOPES, L. H. C. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia de polimerase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 245-249, 2007.

SANTOS, V. S. M. Researching documents on the history of Hansen's disease in Brazil. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10, suplemento 1, p. 415-426, 2003.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The Continuing Challenges of Leprosy, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p.338–381, abr. 2006.

SEGERER, S.; HELLER, F.; LINDENMEYER, M. T.; SCHMID, H.; COHEN, C. D.; DRAGANOVICI, D.; MANDELBAUM, J.; NELSON, P. J.; GRÖNE, H. J.; GRÖNE, E. F.; FIGEL, A. M; NÖSSNER, E.; D SCHLÖNDORFF, D. Compartment specific expression of dendritic cell markers in human glomerulonephritis. **Kidney International** , v. 74, p. 37–46, Jul. 2008.

SILVA, R. C. Estudo do comportamento dos testes sorológicos MI Flow e Elisa (PGL-I) em áreas endêmica e não endêmica de hanseníase, 2008. 161f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – **Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2008.

SPELLBERG, B.; EDWARD, J. E. Type 1/ Type 2 Immunity in Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 76-102, jan. 2001.

SOUZA CAMPOS, N., História da endemia leprótica em São Paulo. São Paulo, 1942 (*mimeo*). Disponível em: [http://hansen.bvs.isl.br/textoc/teses/OGUSKU\\_ELIANA/PDF/refer\\_biblio.pdf](http://hansen.bvs.isl.br/textoc/teses/OGUSKU_ELIANA/PDF/refer_biblio.pdf) acesso em 12 de abril de 2008.

SOUZA, V. N. B.; PEREIRA, A. C. Genética Humana na Susceptibilidade à Hanseníase. **Hansenologia Internationalis**, v. 32, n. 1, p. 81-93, 2007.

STEFANI, M. M. A.; MARTELLI C. M. T.; GILLIS T. P.; KRAHE NBUHL J.L. In Situ Type 1 Cytokine Gene Expression and Mechanisms Associated with Early Leprosy Progression. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 1024–1031, out. 2003.

TALHARI, S. et al. *Dermatologia Tropical: hanseníase*. 4. ed. Manaus, 2006.

TAYLOR A.; VERHAGENA, J.; AKKOÇ, T.; WENIG, R.; FLORY, E.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. et al. IL-10 suppresses CD2-mediated T cell activation via SHP-1. **Molecular Immunology**, v. 07, n.031, 2008.

VON ADRIAN, U. H.; MACKAY, C. R. T-cell function and migration. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p.1020-1034, 2000.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J.; The clinical and imunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77 e 78, p 103 –131, nov. 2006.

WATANABE, W. T.; DREYFUSS, J. L.; IVARNE L. S. TERSARIOL, I. L. S.; BISSACO, M. A. S. Quantificação Automática de Marcadores em Imagens de Imuno-histoquímica de Dupla Marcação. **21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, p. 1539 – 1542, 2003.

Wikipedia. A enciclopédia livre. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:M\\_leprae\\_ziehl\\_nielsen2.jpg#file](http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:M_leprae_ziehl_nielsen2.jpg#file)>. Acesso em: 18 de setembro de 2008.

WHO. Global leprosy situation. **Weekly epidemiological record**. Geneva, v. 25, n. 82, p. 225-232, 2007.

WHO. Leprosy: prevalence rates, beginning of 2007. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/PrevStart2007a.pdf> Acesso em: 18 de setembro de 2008.

XAVIER, M. B., Estudo clínico e imunopatológico da hanseníase em pacientes co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, 2005. 141f. Tese (Doutorado) - **Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará**, Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, 2006.

YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Chemokines in immunity. **Advances in Immunology**, v. 78, p. 57-110, 2001.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121-127, 2001.

## **APÊNDICE**



## APÊNDICE I

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução no196 de 10 de 10 de 1996 – CNS)**

1) Identificação do paciente ou responsável legal

**Nome:**

**Documento de identidade no:**

**Nascimento:**        /        /

**Endereço:**

**Cidade:**

**Estado:**

**Tel.: ( )**

2) Dados sobre o estudo

**Título: “DETECÇÃO *IN SITU* DE CITOCINAS DE PERFIL TH1 E TH2 POR IMUNOISTOQUÍMICA E RELAÇÃO COM A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS NAS FORMAS POLARES DA DOENÇA DE HANSEN”.**

**Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em: 22/11/2005, como parte integrante do projeto de pesquisa: AVALIAÇÃO *IN SITU* DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR, EXPRESSÃO DE CITOCINAS E MARCADORES DE LESÃO NEURAL EM PACIENTES HANSENIANOS NAS DIVERSAS FORMAS CLÍNICAS E EM QUADROS REACIONAIS.**

3) Esclarecimento do sujeito:

Você está convidado a participar de um estudo para examinar pacientes hansênicos que tem o objetivo de esclarecer a resposta imunológica desta doença.

A hanseníase é um problema de saúde pública no Brasil, ela é causada por micróbios chamados bacilos de Hansen. A maioria das pessoas é saudável o suficiente para matar os bacilos quando eles invadem os seus corpos. Os serviços de saúde pública precisam saber como o seu corpo reage ao micróbio para desenvolver meios para acabar com a hanseníase e assim garantir à comunidade o bem estar social. É preciso entender porque algumas pessoas adoecem e outras não quando entram em contato com o micróbio e assim conseguir meios de proteger todas as pessoas.

Se você e/ou seu pai ou responsável concordarem em participar deste estudo, você será submetido a um exame cuidadoso de sua pele e se houver alguma possibilidade de você estar doente, você será encaminhado para que um médico te examine e te medique. Depois do exame, nós vamos colher, um pequeno pedaço de pele, onde existir manchas, antes você será anestesiado no local da mancha, você sentirá uma picada leve no local da coleta por conta da anestesia, esta picada arde um pouco, mas não representa nenhum risco para sua saúde.

Você receberá toda a assistência à saúde pela equipe do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, que poderá ser chamada a

qualquer momento, caso haja necessidade. As despesas decorrentes da participação na pesquisa e indenização por eventuais danos decorrentes da mesma, serão de total responsabilidade dos pesquisadores principais e suas respectivas instituições de origem.

Você não é de forma alguma obrigado a participar da pesquisa. Caso você não deseje participar, não deixará de ser atendido e acompanhado durante todo o seu tratamento se assim o desejar.

Dayse Danielle de Oliveira Silva  
Aluna do programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará - fone/Fax: (91) 3266-4663 / 8847-4817

**Autorizo o uso do material destinado ao laboratório da Unidade de Saúde.**  
**Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**Assinatura do paciente ou responsável**

**ANEXO**

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

### PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº167/2005-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** AVALIAÇÃO IN SITU DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR, EXPRESSÃO DE CITOCINAS E MARCADORES DE LESÃO NEURAL EM PACIENTES HANSENIANOS NAS DIVERSAS FORMAS CLÍNICAS E EM QUADROS REACIONAIS.
3. **Pesquisador Responsável:** JUAREZ ANTÔNIO SIMÕES QUARESMA
4. **Instituição / Unidade:** UFPA/NMT
5. **Data de Entrada:** 10/11/2005.
6. **Data do Parecer:** 22/11/2005.

#### PARECER

Considerando: - a urgência em iniciar o estudo referente a proposta em tela; - que o protocolo apresentado, atende as exigências da resolução 196/96/CNS/MS, decidimos aprová-lo "ad referendum" e , apresentá-lo à próxima reunião prevista para 29/11/2005.

Parecer: **APROVADO**

Belém, 22 de novembro de 2005.

**Profª Mª da Conceição Nascimento Pinheiro**  
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.