

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

CRISTIANI BANHOS FERREIRA

**CARACTERÍSTICAS IMUNO-HISTOQUÍMICAS DAS LESÕES DE
HANSENÍASE EM PACIENTES COM HELMINTOS INTESTINAIS**

VITÓRIA

2012

CRISTIANI BANHOS FERREIRA

**CARACTERÍSTICAS IMUNO-HISTOQUÍMICAS DAS LESÕES DE
HANSENÍASE EM PACIENTES COM HELMINTOS INTESTINAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Coorientadora: Dra. Lucia Martins Diniz

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Ferreira, Cristiani Banhos, 1982-
F383c Características imuno-histoquímicas das lesões de hanseníase
em pacientes com helmintos intestinais / Cristiani Banhos Ferreira.
– 2012.
103 f. Ilus.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.
Coorientadora: Lucia Martins Diniz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Hanseníase. 2. Helmintos. 3. Imunoistoquímica. I.
Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Diniz, Lucia Martins. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda CRISTIANI BANHOS FERREIRA apresentou a dissertação intitulada “CARACTERÍSTICAS IMUNO-HISTOQUÍMICAS DAS LESÕES DE HANSENÍASE EM PACIENTES COM HELMINTOS INTESTINAIS” em sessão pública, no dia 24 de agosto de 2012, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (**aprovar**) (**reprovar**) a dissertação para habilitar a médica CRISTIANI BANHOS FERREIRA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 24 de agosto de 2012

Prof.ª. Dra. Sandra Maria Barbosa Durães
(Membro Externo)

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
(Membro Interno)

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Orientador)

Prof.ª. Dra. Lucia Martins Diniz
(Co-orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas – Centro de Ciências da Saúde – UFES
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29040-091
Telefax (27) 3335-7504

Agradecimentos

À Deus por ter me dado a persistência, iluminação e a força para a conclusão de todo o trabalho;

À minha mãe Mariliza, minha primeira mestra, que tudo fez pela minha formação moral, afetiva e intelectual, pelo carinho e dedicação comigo;

À minha irmã Cristina, pela amizade e compreensão nas horas difíceis;

Aos meus queridos gatos, Serrano, Birú e Pepe, que sempre estiveram ao meu lado estudando;

Aos amigos, que inúmeras vezes puderam me ouvir, e também tiveram ao meu lado aprendendo sobre o tema da minha tese, hanseníase e helmintos intestinais, de tanto que conversava com eles sobre o assunto;

Aos amigos de mestrado, em especial Fabíola, Joaquim, Lorenzo e Renata, pelas trocas de informações durante o curso e amizade;

Às funcionárias da Patologia, Ester de Andrade Rita, Elielma do Rosário Silva Santos, Maria de Lourdes Kiabai, e as do SAME que me receberam com muito carinho e me ajudaram durante a coleta dos dados;

Aos funcionários da Biblioteca Central que sempre me atenderam com solicitude;

Aos funcionários e professores do Núcleo de Doenças Infecciosas, em especial, Fátima, Wayna e a professora Angélica, pela paciência e disponibilidade;

Ao professor e orientador, Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues;

À Dra. Lucia Martins Diniz, minha amiga e coorientadora, pelo incentivo ao estudo desde a época da graduação; dedicação, empenho e pelas inúmeras correções realizadas durante todo o trabalho;

E aos pacientes que foram incluídos no estudo, porque sem eles não teria sido possível a elaboração deste trabalho.

Índice de Figuras

Figura 1: Fluxograma na obtenção dos prontuários e blocos dos pacientes do estudo..	53
Figura 2: Correlação do diagnóstico clínico com o resultado do estudo histopatológico dos 53 pacientes analisados	56
Figura 3: Distribuição dos 53 pacientes em percentual segundo classificação operacional da Organização Mundial da Saúde.....	57
Figura 4: Números absolutos do cruzamento entre sexo e o diagnóstico histopatológico dos 53 pacientes do estudo.....	58
Figura 5: Números absolutos do cruzamento entre tratamento e classificação operacional OMS dos 53 pacientes.....	59
Figura 6: Distribuição percentual dos 53 pacientes segundo comorbidades.....	60
Figura 7: Distribuição percentual dos 53 pacientes segundo resultado do exame parasitológico de fezes.....	61
Figura 8: Distribuição dos 53 pacientes de acordo com a positividade ou negatividade do exame parasitológico de fezes.....	61
Figura 9: Distribuição dos 16 pacientes co-infectados pelos helmintos e pela hanseníase de acordo com a espécie de helminto detectada ao exame parasitológico de fezes EPF.....	62
Figura 10: Números absolutos da correlação entre o sexo dos 53 pacientes e a presença de helmintos ao exame parasitológico de fezes.....	63
Figura 11: Números absolutos do cruzamento entre a classificação operacional OMS e a presença de helmintos no exame parasitológico de fezes.....	64
Figura 12: Correlação entre a positividade ou negatividade do EPF com o sexo dos 53 pacientes	65

Figura 13: Frequência de células com os marcadores CD4, CD8, CD20, CD138, FOXP3 e TIA1-CD8 em hansenianos paucibacilares e multibacilares com e sem co-infecção.....**69**

Figura 14: Marcação pela imuno-histoquímica de células CD8⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.....**70 e 71**

Figura 15: Frequência de Células FOXP3⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.....**72 e 73**

Figura 16: Frequência de Células CD20⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.....**74 e 75**

Figura 17: Frequência de Células CD4⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.....**76 e 77**

Índice de Tabelas

Tabela 1: Caracterização dos 53 pacientes segundo a faixa etária.....	55
Tabela 2: Distribuição dos 53 pacientes pelos diagnósticos clínicos e resultados dos exames histopatológicos com a estatística <i>kappa</i>	56
Tabela 3: Relação entre o sexo e a classificação operacional dos 53 pacientes analisados.....	57
Tabela 4: Correlação entre o tratamento adotado e a classificação operacional dos 53 pacientes estudados.....	59
Tabela 5: Resultados dos exames parasitológicos de fezes dos 53 pacientes.....	60
Tabela 6: Correlação entre o sexo dos 53 pacientes e a presença ou não de helmintos ao exame parasitológico de fezes.....	63
Tabela 7: Correlação entre a classificação operacional OMS e a presença ou não de helmintos ao exame parasitológico de fezes.....	64
Tabela 8: Distribuição dos vinte e cinco pacientes segundo o sexo, idade, forma clínica da hanseníase, histologia das lesões cutâneas, classificação operacional, presença de helmintos e perfil imuno-histoquímico.....	66

Lista de Abreviaturas e Siglas

APTS - Aminopropiltriectxisilano.

BT- Borderline Tuberculóide.

BB- Borderline Borderline

BL- Borderline Lepromatoso

DNA - Ácido desoxirribonucléico.

CD - Cluster of Differentiation.

DAB - Diaminobenzidine.

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid

EPF - Exame parasitológico de fezes.

FOXP3- Forkhead box P3.

GM-CSF- Granulocyte macrophage colony-stimulating factor.

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio.

HDT - Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide.

HDV - Hanseníase Dimorfa-Virchowiana.

HI - Hanseníase Indeterminada.

HIV- Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana).

HLA - Human Leucocyte Antigens.

HLA-DQ - Human Leucocyte Antigens- Locus DQ.

HLA-DR - Human Leucocyte Antigens- Locus DR.

HT - Hanseníase Tuberculóide.

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes.

HV - Hanseníase Virchowiana.

IB- Índice Baciloscópico

IgE - Imunoglobulina E.

IgM- Imunoglobulina M.

IL-1 - Interleukin (Interleucina) 1.

IL-2 - Interleukin (Interleucina) 2.

IL-4 - Interleukin (Interleucina) 4.

IL-5 - Interleukin (Interleucina) 5.

IL-6 - Interleukin (Interleucina) 6.

IL-7 - Interleukin (Interleucina) 7.

IL-8 - Interleukin (Interleucina) 8.

IL-10 - Interleukin (Interleucina) 10.

IL-12 - Interleukin (Interleucina) 12.

IL-13 - Interleukin (Interleucina) 13

IL-25 - Interleukin (Interleucina) 25.

IL-33 - Interleukin (Interleucina) 33.

IFN- γ - Interferon-gama.

Km- quilômetros.

LL- Lepromatoso-lepromatoso

M-CSF- Macrophage colony-stimulating factor.

MHC- Major Histocompatibility Complex (Complexo de Histocompatibilidade Principal).

M. leprae- *Mycobacterium leprae*.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

p- Diferença estatística.

PAMPS - Padrões moleculares associados à patógenos.

PBS - Phosphate Buffered Saline.

PCR - Reação de Cadeia de Polimerase.

PGL - Glicolípídeo Fenólico.

PQT/PB - Poliquimioterapia Paucibacilar.

PQT/MB - Poliquimioterapia Multibacilar.

SAME - Arquivo Geral do HUCAM.

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos Notificáveis.

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences.

TGF- β 1 - Transforming growth factor beta 1.

Th1 - T helper 1.

Th2 - T helper 2.

Th17 - T helper 17.

TIA-1 - T Cell intracellular antigen-1.

TLR - Toll Like Receptor.

TNF- α - Tumor Growth Factor- α (Fator de Necrose Tumoral α).

TNF- β - Tumor Growth Factor β - (Fator de Necrose Tumoral β).

Treg - Células T reguladoras.

TSLP - Thymic Stromal Lymphopoietin.

TT - Tuberculóide Tuberculóide.

SUMÁRIO

❖	Resumo.....	14
❖	Abstract.....	16
❖	Introdução.....	18
❖	Fundamentação Teórica.....	20
➤	HANSENÍASE.....	20
▪	Conceito e aspectos epidemiológicos.....	20
▪	Agente etiológico da hanseníase.....	21
▪	Transmissão do <i>M. leprae</i>	22
▪	Mecanismos Imunológicos da Infecção.....	22
▪	Formas clínicas da hanseníase.....	27
▪	Diagnóstico da hanseníase.....	31
▪	Tratamento da hanseníase.....	39
➤	HELMINTOS INTESTINAIS.....	39
▪	Imunologia nas infecções helmínticas.....	41
❖	Objetivos.....	47
❖	Metodologia.....	48
▪	Tipo de estudo e caracterização da amostra.....	48
▪	População.....	48
▪	Método Imuno-histoquímico.....	49
▪	Análise Estatística.....	51
▪	Considerações Éticas.....	51
❖	Resultados.....	53
❖	Discussão.....	78
❖	Conclusão.....	87
❖	Referências Bibliográficas.....	88
	APÊNDICE 1: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde.....	102

	APÊNDICE 2: Ficha de anotação dos dados dos pacientes do estudo.....	103
--	--	-----

Resumo

Introdução: A imunomodulação determinada pelos nematóides intestinais no homem pode intervir na evolução e na progressão de outras doenças infecciosas, dentre elas a hanseníase. **Objetivo:** O estudo analisa a presença dos marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anti-CD138, anti-TIA-1 e anti-FOXP3 em amostras de biópsias de lesões de pacientes com o diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase, com e sem helmintíase, a fim de determinar a influência das helmintíases intestinais no sistema imune. **Pacientes e métodos:** O estudo foi realizado através da análise retrospectiva de prontuários de pacientes atendidos no Serviço de dermatologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM), no período de 01/1995 a 01/2010, com o diagnóstico de hanseníase e que, após a suspeita clínica, foram submetidos à biópsia e ao exame anátomo-patológico de lesão suspeita na pele, e que realizaram exame parasitológico de fezes. Quando identificado um caso de hanseníase, confirmado clínica e histopatologicamente, foram anotados dados referentes ao paciente: idade, sexo, forma clínica da doença, diagnóstico histopatológico, a presença ou ausência de verminose, e a espécie envolvida. Após, foram separados os blocos de parafina das biópsias das lesões cutâneas dos pacientes, os quais posteriormente foram submetidos ao exame imuno-histoquímico para a pesquisa de marcadores CD4, CD8, CD20, CD138, TIA-1 e FOXP3. **Resultados:** Dos 53 hansenianos analisados, observou-se discreto predomínio do sexo feminino e das formas paucibacilares. Outro achado foi a concentração dos casos paucibacilares nos pacientes do sexo feminino e dos multibacilares no sexo masculino, a mediana de idade foi de 43 anos. Embora sem significância estatística, as verminoses intestinais tiveram ligeiro predomínio nas formas multibacilares, sendo o helminto mais envolvido o *Ascaris lumbricoides*. As frequências de células FOXP3⁺ e CD20⁺ foram maiores entre os hansenianos paucibacilares em

relação aos multibacilares, sendo as células CD20⁺ significativamente mais elevadas nos pacientes multibacilares com helmintos intestinais, quando comparados com os pacientes sem helmintos ($p=0,005$). **Conclusão:** O estudo demonstrou frequência significativa do sexo feminino nas formas paucibacilares da hanseníase, além de ligeiro predomínio, embora sem significância estatística, de helmintos nas formas multibacilares da doença com células CD20⁺, significativamente mais elevadas nos multibacilares com helmintos intestinais.

Palavras-chave: Hanseníase; Helmintos; Imuno-histoquímica; Imunologia.

Abstract

Introduction: Immunomodulation determined by intestinal nematodes in humans can interfere in the evolution and progression of infectious disorders, among them leprosy.

Objective: This study analyses the presence of anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anti-CD138, anti-TIA-1 and anti-FOXP3 markers in biopsy samples of skin lesions from patients with clinical and histopathological diagnosis of leprosy, with and without helminthiasis, in order to determine their influence on the immune system. **Patients and**

methods: The study conducted a retrospective analysis of medical records of patients diagnosed with leprosy from the Department of Dermatology at the University Hospital Cassiano Antonio Moraes (HUCAM), from January 1995 to January 2010, which, after clinical suspicion of leprosy, underwent skin biopsy with histopathological study, and also had stool tests. The following data was collected from leprosy patients: age, gender, disease's clinical type, histopathological diagnosis, the presence or absence of intestinal helminthes and the species involved. Subsequently the paraffin blocks with the biopsy material from patient's skin lesions were separated for

immunohistochemical study of the markers CD4, CD8, CD20, CD138, TIA-1 and FOXP3. **Results:** Out of the 53 leprosy patients analyzed, a small predominance of female patients and paucibacillary types was observed. Another finding was the concentration of paucibacillary types among female patients, and multibacillary types among male patients. The patient's median age was 43 years. Although lacking statistical significance, helminthic infections were slightly predominant in multibacillary patients, most frequently caused by *Ascaris lumbricoides*. The presence of FOXP3⁺ and CD20⁺ cells was higher among paucibacillary patients, and CD20⁺ cells were significantly more frequent in multibacillary patients with intestinal helminthes, when compared to patients without intestinal helminthes ($p=0,005$). **Conclusion:** The

study showed a higher frequency of female sex in paucibacillary types leprosy, as well as the small predominance, although without statistical significance, of helminthes in multibacillary patients. However, CD20+ cells were significantly more frequent among multibacillary patients with helminthic infections.

Key-words: Leprosy; Helminths; Immunohistochemistry; Immununology.

1.0 - INTRODUÇÃO

A hanseníase, doença de alta infectividade e baixa patogenicidade, determinada pelo *Mycobacterium leprae*, constitui, apesar dos esforços de contenção da endemia, um grave problema de saúde pública, não só pela magnitude da doença, como também pelo seu potencial incapacitante, atingindo principalmente, pessoas de faixa etária economicamente ativa.

O espectro clínico da doença está intimamente ligado à resposta imune. Nos pacientes com a forma tuberculóide existe uma forte resposta Th1, com presença de poucos bacilos (hanseníase paucibacilar) e a doença se caracteriza por destruição das fibras nervosas em áreas específicas, o que resulta no aparecimento de lesões de pele localizadas e bem demarcadas, com perda da sensibilidade térmica e dolorosa. Na ausência de uma resposta Th1 efetiva, ocorre um predomínio da resposta Th2, levando a disseminação dos bacilos (hanseníase multibacilar), na qual os macrófagos ficam repletos de parasitas, quadro que caracteriza a forma virchowiana da doença.

As infecções por helmintos intestinais são responsáveis por significativa morbimortalidade e perda econômica nos humanos, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Os mecanismos de resposta imune nas infecções helmínticas são múltiplos, devido ao tamanho e à diversidade metabólica dos parasitas, e tipicamente resultam na indução de forte resposta Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias, eosinofilia, mastocitose e altos títulos de anticorpos IgE.

Neste contexto, não é raro que um portador de uma parasitose intestinal esteja exposto à outra infecção, como por exemplo, a hanseníase, a tuberculose, dentre outras, principalmente em áreas endêmicas do mundo. Prost e colaboradores (1979) demonstraram que em regiões onde a oncocercose e a hanseníase eram endêmicas, a frequência de casos graves da hanseníase era significativamente maior quando

comparada à encontrada em regiões onde apenas a hanseníase era endêmica e com a mesma prevalência da primeira (regiões livres da oncocercose). Estes autores sugeriram que pacientes co-infectados poderiam evoluir para as formas mais graves da doença.

A imunomodulação determinada pelos nematóides intestinais pode intervir na evolução e na progressão de outras doenças infecciosas, fato esse sugerido por alguns estudos que evidenciaram impacto na clínica e na evolução da malária, da tuberculose e da hanseníase.

Considerando-se que a evolução da hanseníase tende ao polo mais grave se a resposta imune humoral, fruto de uma estimulação da resposta Th2, for predominante e que infecções por helmintos intestinais, também desviam a resposta imune para o lado Th2, foi proposto um estudo para avaliar a resposta imune nas lesões cutâneas de hanseníase em pacientes infectados pelos nematóides intestinais comparados aos não infectados por estes helmintos, através da análise imuno-histoquímica dos tecidos.

2.0 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

HANSENÍASE

Conceito e aspectos epidemiológicos

A hanseníase é moléstia infecto-contagiosa crônica e granulomatosa, de alta infectividade e baixa patogenicidade, determinada pelo *Mycobacterium leprae*, transmitida de pessoa a pessoa através do convívio com doentes contagiantes sem tratamento (TALHARI e col., 2006).

O Ministério da Saúde (2000) define como caso de hanseníase, o indivíduo que apresenta um ou mais dos seguintes sinais cardinais e que necessita de tratamento poliquimioterápico: 1) presença de lesão(ões) e/ou áreas da pele com diminuição ou alteração da sensibilidade; 2) acometimento de nervo(s) periférico(s) com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas, e 3) baciloscopia positiva de esfregaço intradérmico.

Apesar da implementação da poliquimioterapia, das novas estratégias e dos esforços na condução dos programas para o controle da moléstia, a hanseníase continua sendo um problema de saúde pública e social, devido às deformidades e incapacidades físicas por ela determinadas, que resultam na discriminação e segregação dos doentes e de seus familiares, sobretudo na Ásia, África e América Latina, em especial na Índia e no Brasil (OMS, 2008).

O panorama internacional da endemia demonstrou que o Brasil, Nepal e Timor Leste foram responsáveis em 2007 por 17% de todos os casos novos registrados no mundo, e em 2008 por 23% desses casos (OMS, 2008).

O número de casos novos detectados no mundo em 2010 foi de 228.474, sendo o Brasil responsável por 34.894 ou 15,3% de todos os casos novos detectados, superado apenas pela Índia com 126.800 ou 55,5% (OMS, 2011).

No Brasil, a distribuição da endemia é heterogênea, sendo as regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, os espaços geográficos responsáveis pelos maiores índices de prevalência da hanseníase e com coeficiente de detecção em patamares muito altos, correspondendo a 53,5% dos casos atendidos em todo o país (ANDRADE e col., 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em relação à região Sudeste, o Espírito Santo no ano de 2008, apresentou o coeficiente de detecção de 31,27 casos novos para cada 100.000 habitantes e no grupo de zero a 14 anos, este coeficiente foi de 12,46 casos para cada 100.000 habitantes, parâmetro considerado como hiperendêmico e importante indicador de transmissibilidade da doença (SESA, 2008).

Agente etiológico da hanseníase

A hanseníase é doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, bactéria intracelular obrigatória, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura, que se apresenta sob a forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, álcool-ácido resistente, corando-se em vermelho pela fucsina ácida (Ziehl-Neelsen) e não se descorando pela lavagem no álcool-ácido. O bacilo apresenta um tropismo pela célula de Schwann, encontrada nos nervos periféricos, e pelos macrófagos da pele (SCOLLARD e col., 2006).

Tem reprodução muito lenta (12 a 14 dias), permanecendo viável até 36 horas no meio ambiente ou aproximadamente nove dias na temperatura de 36,7°C e 77,6% de umidade média, e necessita de temperatura inferior à média de 37°C do corpo humano, em torno de 35°C para se desenvolver, aspecto esse que explica a localização preferencial do bacilo nas regiões mais frias do corpo, como por exemplo: nariz,

testículos e locais onde os nervos periféricos se encontram muito próximos à pele, como os cotovelos e os tornozelos (FOSS, 1999).

Análise da ultraestrutura do *M. leprae* demonstra sua semelhança com outras micobactérias, porém difere das demais por apresentar constituintes específicos, especialmente a espessa parede lipídica formada principalmente pelos glicolípídeos fenólicos (PGL-I, II e III). O PGL-I tem sido objeto de inúmeros estudos, por tratar-se de um antígeno envolvido na interação com a laminina das células de Schwann, o qual facilita a penetração do bacilo nos nervos periféricos afetados (SHIMOJI e col., 1999).

Transmissão do *M. leprae*

Acredita-se que o homem seja o único reservatório natural do bacilo, apesar de existirem relatos de animais selvagens naturalmente infectados, como tatus e macacos, os quais aparentemente não são considerados problemas na cadeia epidemiológica de transmissão (KIRCHHEIMER & STORRS 1971; LEININGER e col., 1980; BOLOGNIA e col., 2011).

Apesar do papel dos pacientes portadores da forma paucibacilar ter sido documentado na cadeia de transmissão da doença, os pacientes multibacilares são considerados a principal fonte de infecção (HALDER e col., 2001).

A pele com presença de solução de continuidade, eventualmente, poderia desempenhar um papel na infecção, porém, as vias aéreas superiores constituem a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo (TALHARI e col., 2006).

Mecanismos imunológicos da infecção

Depois de penetrar no organismo do homem, através das vias aéreas superiores ou, excepcionalmente, por abrasões de pele, os bacilos são fagocitados pelas células

apresentadoras de antígenos, como exemplo macrófagos e células dendríticas, dentre elas as células de Langerhans (subtipo de células dendríticas que iniciam a resposta imune na pele), processados e expressos na superfície dessas células, via moléculas de MHC II, e, desta forma, reconhecidos pelos linfócitos T CD4⁺, que promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-2 e IFN- γ (QUARESMA e col., 2009).

Células dendríticas desempenham papel importante na modulação da resposta imune inata à infecção pelo *M. leprae*, e a interação do bacilo à essas células apresentadoras de antígeno resulta na produção local de citocinas e quimiocinas, que, dependendo do tipo, são capazes de regular a inflamação e determinar o curso da resposta imune adaptativa mediada por células via linfócitos T: respostas Th1 e Th2 (DEMANGEL & BRITTON, 2000). Hansenianos com a forma virchowiana apresentam número significativamente menor de células de Langerhans na pele quando comparados aos pacientes tuberculóides e a indivíduos não infectados, sugerindo a importância do infiltrado dessas células nas formas onde há predomínio da resposta imune celular eficaz (GIMENEZ e col., 1989).

Os linfócitos T CD4 na presença de IL-12 e na ausência de IL-4 diferenciam-se em Th1, importantes na ativação da imunidade celular, com predomínio de dois tipos de citocinas: IL-2 e IFN- γ . Por outro lado, os linfócitos T CD4 em contato com a IL-4 se transformam em Th2, envolvidos na ativação da imunidade humoral, com produção de vários tipos de interleucinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (ALMEIDA e col., 1996).

A destruição ou a multiplicação do bacilo no interior dos macrófagos são determinadas por mecanismos imunológicos e a resposta imunológica montada pelo

hospedeiro determina o fenótipo clínico que o paciente irá desenvolver (GOULARD e col., 2002).

Sabendo-se que a hanseníase possui diferentes formas clínicas e que existem pelo menos dois tipos de macrófagos com funções opostas, alguns trabalhos começaram a avaliar o impacto desses diferentes subgrupos em resposta ao *Mycobacterium leprae*. Maquino e colaboradores (2007) mostraram que após estímulo com *Mycobacterium leprae*, macrófagos diferenciados com M-CSF perdem a capacidade de ativar linfócitos T, enquanto os macrófagos diferenciados com GM-CSF apresentam elevada capacidade estimulatória sobre os linfócitos T.

Os macrófagos infectados pelo *Mycobacterium leprae* produzem e liberam as citocinas: TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β 1 (MOURA e col., 2007). Essas citocinas são opostas em muitas formas de ação, incluindo suas ações sobre o próprio *M. leprae*. De um lado, o TNF- α promove ativação de macrófagos com capacidade de destruir o bacilo intracelular e potencializa os efeitos do IFN- γ . Por outro lado, TGF- β 1 e IL-10 desativam os próprios macrófagos, aumentando a proliferação bacilar. Desta forma, citocinas como IL-10 e TGF- β contrapõem os efeitos do TNF- α e IFN- γ , acreditando-se, portanto, que a exposição de macrófagos a determinada citocina, no tempo apropriado, seja o requisito para a destruição intracelular do parasito (ROJAS-ESPINOSA e col., 1994).

Na hanseníase tuberculóide, o *M. leprae* é destruído completamente nos fagolisossomos das células apresentadoras de antígenos, e os antígenos expressos por essas células via complexo MHC, recruta o sistema imune mediado por células através da liberação de IFN- γ e IL-2, com a formação de granulomas de células epitelióides (ABULAFIA & VIGNALE, 2001). Já na hanseníase virchowiana, os macrófagos, por

serem incapazes de impedir a multiplicação do *M. leprae*, estão repletos de bacilos (KRUTZIK e col., 2003).

O padrão de citocinas encontradas nas lesões cutâneas é produzido por subclasses de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ predominantes, dependendo da forma clínica da doença (QUARESMA e col., 2009).

Demonstrou-se, através de técnicas de imuno-histoquímicas, que no padrão de resposta tipo 1 (Th1), característico da hanseníase paucibacilar, predominam os clones T $CD4^+$, relação $CD4^+/CD8^+$ de 1,9:1, que se distribuem em toda a lesão, produtores de IFN- γ , citocina ativadora de macrófagos; IL-2, fator de crescimento autócrino para células T helper; e níveis indetectáveis de IL-4; já nas lesões virchowianas a relação $CD4^+/CD8^+$ é de 0,6:1, sendo a maioria das células $CD8^+$ que infiltram as lesões lepromatosas de fenótipo CD28 – (supressor), enquanto que as células de fenótipo T citotóxico (CD28+) predominam nas lesões tuberculóides (MODLIN e col., 1983).

A presença do bacilo no interior de macrófagos induz sua ativação que culmina na produção de citocinas IL-1, TNF- α e IL-12, que atuam sobre os linfócitos T, geralmente a população de fenótipo $CD4^+$, tornando-os ativados e com capacidade de produzir citocinas próprias. A IL-12 estimula diretamente a célula Natural Killer, produtora de IFN- γ , que associada ao TNF- α , estimulam o macrófago e atuam sinergicamente, incrementando a atividade bactericida macrofágica, através da produção de radicais microbicidas, os reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio. A subpopulação Th1 de linfócitos T produz citocinas pró-inflamatórias, IL-2, IFN- γ e TNF- β , responsáveis pela manutenção da resposta imune celular, formação do granuloma e destruição bacilar (SCOLLARD e col., 2006).

Na hanseníase virchowiana, os bacilos são parcialmente digeridos e depósitos de fosfolipídeos intracitoplasmáticos podem se formar, o que confere o aspecto de células espumosas nessa forma de hanseníase (ABULAFIA & VIGNALE, 2001).

O padrão de resposta tipo 2 (Th2), característica dos pacientes multibacilares, produz e libera a IL-4, fator de crescimento para células T supressoras, que contribui para a diferenciação de células B e produção de anticorpos. Também, produz clones de células T CD8⁺, que liberam IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, como padrão de citocinas supressoras da atividade macrofágica, contribuindo para o aumento na produção de anticorpos via linfócitos B, escape à oxidação intramacrofágica e disseminação bacilar (ABULAFIA & VIGNALE, 2001; GOULART e col., 2002).

A análise de subpopulações de linfócitos realizada por Modlin e colaboradores (1983) demonstrou que em lesões de hanseníase tuberculóide, os linfócitos entremeados no granuloma epitelióide eram CD4⁺ e o manto circunjacente CD8⁺. Na forma virchowiana, as células CD4⁺ e CD8⁺ estavam entremeadas com histiócitos vacuolados sem definir um manto linfocitário. Para esses autores, a disposição entre CD4⁺ e CD8⁺ estaria associada à maturação dos monócitos, lise bacilar e resposta de hipersensibilidade tardia. Por outro lado, a distribuição ao acaso de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ poderia impedir a apresentação do antígeno as células imunocompetentes, como também não estimular a maturação para células epitelióides.

Portanto, o balanço e a interação complexa das citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, seus receptores e as células do sistema inato e adaptativo conjuntamente, formarão uma rede complexa que irá caracterizar a resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente a evolução clínico-patológica da doença.

Formas clínicas da hanseníase

Rabello foi o pioneiro em estabelecer o conceito das formas polares da hanseníase. Segundo este autor, a partir da forma indeterminada, os pacientes sem tratamento, podem evoluir espontaneamente para a cura ou para a forma tuberculóide, caso o sistema imune seja efetivo, ou para a forma virchowiana, se o sistema imune não conseguir organizar uma resposta imune satisfatória (RABELLO, 1937).

Em 1953, no VI Congresso Internacional de Lepra em Madrid, foram mantidos os critérios propostos por Rabello, isto é, a forma inicial da doença (indeterminada), o tipo lepromatoso (virchowiano), que corresponde ao polo disseminado da doença, e o tipo tuberculóide, polo localizado, e foi estabelecido um novo grupo, o borderline, instável clinicamente, por caracterizar-se entre as formas polares (VI INTERNATIONAL CONGRESS LEPROL. MADRID, 1953).

Nesse sistema há duas formas polares da doença, que são clínica e imunologicamente distintas, denominadas hanseníase tuberculóide e virchowiana, e além dessas formas polares estáveis, existem dois grupos intermediários instáveis, denominados hanseníase dimorfa ou borderleine e hanseníase indeterminada. A evolução da doença para um desses tipos está diretamente relacionada à resposta imunológica do indivíduo frente ao *Mycobacterium leprae* (VI INTERNATIONAL CONGRESS LEPROL. MADRID, 1953).

Na década de 60, Ridley e Jopling estabeleceram a classificação espectral da hanseníase, subdividindo o grupo borderline ou dimorfo em dimorfo-tuberculóide, dimorfo-dimorfo e dimorfo-virchowiano, baseada em parâmetros clínico, bacteriológico, histopatológico e imunológico. Através dessa classificação, subdividiu-se a hanseníase em cinco grupos no espectro imunológico: a) tuberculóide-tuberculóide (TT), que corresponde à forma polar e estável da classificação de Madrid, b) borderline-

tuberculóide (BT), c) borderline-borderline (BB), d) borderline-lepromatoso (BL) e e) lepromatoso-lepromatoso (LL), equivalente à forma lepromatosa e mais agressiva na classificação de Madrid (RIDLEY & JOPLING, 1966).

Em 1982, a Organização Mundial de Saúde definiu que pacientes paucibacilares (PB) eram representados por aqueles com a forma indeterminada, tuberculóide ou borderline-tuberculóide, com índice baciloscópico menor do que dois em qualquer sítio avaliado, já os pacientes multibacilares eram definidos como os borderline-borderline, borderline-lepromatosos e lepromatosos-lepromatosos ou os que apresentassem índice baciloscópico maior ou igual a dois (WHO, 1982).

Posteriormente modificou-se essa classificação definindo que um paciente seria considerado multibacilar quando tivesse baciloscopia positiva em qualquer sítio examinado, independente do índice baciloscopia, ou seja, acima de zero (WHO, 1998).

Entretanto, tendo em vista a dificuldade em determinadas regiões do mundo, com poucos recursos diagnósticos, de se estabelecer uma classificação baciloscópica de qualidade, a estratégia foi a simplificação do método de classificação dos pacientes com hanseníase. Dessa forma, em 1995, a Organização Mundial de Saúde recomendou para países endêmicos e para regiões sem acesso a exames laboratoriais complementares para o diagnóstico, uma classificação simplificada e operacional, essencialmente clínica, que utiliza o número de lesões cutâneas e/ou troncos nervosos acometidos para alocação de pacientes nos esquemas poliquimioterápicos (WHO, 1995).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu como pacientes paucibacilares, os casos de hanseníase com até cinco lesões cutâneas e/ou apenas um nervo acometido, e multibacilares os casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco neural acometido (WHO, 1995). Critério esse falho, pois não leva em consideração a baciloscopia, histopatologia e o tamanho das lesões, o que pode implicar em erros no

diagnóstico e no tratamento, uma vez que se tem observado lesões únicas com quadros histopatológicos e baciloscópicos próprios dos multibacilares, o que pode contribuir para o retorno e disseminação da doença (FLEURY, 2006).

Gallo e colaboradores (2003) para avaliar a recomendação de critérios clínicos para a alocação dos pacientes com hanseníase no grupo paucibacilares e multibacilares e para verificar o método clínico de classificação baseado no número de lesões cutâneas correlacionando com o exame baciloscópico de esfregaços de pele, estabeleceram a comparação dessa classificação exclusivamente clínica tomando-se como método padrão referência a classificação segundo o padrão de baciloscopia. A avaliação da concordância entre o método clínico e o baciloscópico foi realizada através do cálculo do índice kappa, com demonstração de concordâncias de 83,3%, sendo a sensibilidade e a especificidade relativas dos critérios clínicos de 89,6% e de 83,8%, respectivamente (GALLO e col., 2003).

Foram selecionados para análise 837 casos de hanseníase obtidos no registro do Centro Colaborador em Hanseníase para o Ministério da Saúde do Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, RJ, do período de 1986 a 1999. Dos 652 casos com baciloscopia positiva, 584 (89,6%) tinham mais de cinco lesões cutâneas, e, dos 185 casos com baciloscopia negativa, 155 (83,8%) tinham até cinco lesões cutâneas, o que evidenciou que o método clínico baseado no número de lesões cutâneas para a classificação dos pacientes e o resultado do exame baciloscópico apresenta limitações que não invalidam sua operacionalidade (GALLO e col., 2003).

Geralmente, a hanseníase se inicia pela forma indeterminada, caracterizada clinicamente por áreas hipoestésicas ou manchas hipocrômicas de limites imprecisos, com hipoestesia térmica ou dolorosa, única ou até cinco lesões, que poderão evoluir para a cura espontaneamente ou para uma das formas polares (TALHARI e col., 2006).

A hanseníase tuberculóide, forma de resistência imune ao *M. leprae*, manifesta-se com lesões cutâneas, bem delimitadas, bordas papulosas e infiltradas, coloração eritemato-acastanhada, hipohidrose ou anidrose, queda de pelos, hipoestésicas ou anestésicas, geralmente única, podendo ser acompanhadas de espessamento do tronco neural próximo à lesão. Essas manifestações estão relacionadas à exacerbação da resposta imune celular, com a formação de granuloma, limitação das lesões e, às vezes, sequelas neurais significativas (FOSS, 1999).

A hanseníase virchowiana, forma associada a uma resposta imune celular ineficaz, é caracterizada pela excessiva multiplicação bacilar e disseminação da doença para todo o tegumento e, às vezes, para as vísceras, podendo evoluir insidiosamente. Está associada às lesões infiltradas e amareladas, pápulas e nódulos eritemato-violáceos, hansenomas, xerose cutânea devido à anidrose associado à desnervação das glândulas sudoríparas, rarefação de pelos e alopecia nas extremidades. Com a progressão da doença, afeta múltiplos nervos, que se tornam espessados a palpação e pouco dolorosos (ABULAFIA & VIGNALE, 1999; FOSS, 1999).

Nas formas intermediárias ou borderline/dimorfa as manifestações clínicas são variadas, principalmente nas formas dimorfo-dimorfo, apresentando em geral, lesões em placa, eritemato-edematosas de limites internos bem definidos e externos imprecisos, centro hipocrômico e anestesia local. A presença de nódulos infiltrados na face e pavilhão auricular aproxima o quadro cutâneo do polo virchowiano, tratando-se da dimorfo-virchowiana, e lesões cutâneas pouco numerosas e assimétricas revelam tendência ao polo tuberculóide, a forma dimorfa-tuberculóide (VERHAGEN e col., 1998; FOSS, 1999).

Diagnóstico da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase se baseia em: a) critérios clínicos, através da anamnese e do exame físico criterioso, com a pesquisa de alteração da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil das lesões cutâneas, incluindo a avaliação da sensibilidade protetora das mãos e dos pés através do teste de incapacidade com estesiômetro; b) nas provas da histamina e da pilocarpina, em situações duvidosas; e c) nos exames complementares: baciloscopia de raspado dérmico, histopatologia de lesões cutâneas, e nos centros de pesquisa, pode-se contar com testes sorológicos, de imuno-histoquímica, biologia molecular e cultura do bacilo através da inoculação no coxim da pata de camundongo (TALHARI e col., 2006).

- **Baciloscopia de Raspado Dérmico**

O exame baciloscópico evidencia a presença ou não de bacilos através da coleta de linfa do raspado dérmico. O material é coletado mediante pequena incisão na pele feita com lâmina de bisturi de lesões cutâneas, lóbulos de orelhas, cotovelos e joelhos. Este material é submetido à coloração específica, variante do método Ziehl-Neelsen, onde nos pacientes multibacilares, a baciloscopia é positiva, com presença de bacilos íntegros e nos casos paucibacilares é negativa, o que não afasta o diagnóstico de hanseníase. Além da finalidade diagnóstica, a baciloscopia possibilita o acompanhamento do tratamento, sendo recomendável a coleta em pelo menos quatro sítios cutâneos, no momento do diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O índice baciloscópico (IB) dos pacientes tratados diminui lentamente até sua negatificação. Em geral, o IB diminui em média, uma unidade após um ano e depois, aproximadamente 0,66 por ano (TALHARI e col., 2006).

- **Histopatologia de lesões cutâneas**

O exame histopatológico das lesões cutâneas complementa o diagnóstico dos casos de hanseníase. O material obtido por biópsia é fixado em formol a 10% e processado para duas colorações: hematoxilina-eosina e Wade-Klingmuller ou Fite-Faraco, sendo as duas últimas para a pesquisa de bacilos nas lâminas (TOMIMORI-YAMASHITA e col., 1996).

Na histopatologia da forma indeterminada da doença observa-se infiltrado linfocitário discreto, perineural ou invadindo nervos e ao redor de anexos, com a bainha perineural com aumento da celularidade (TOMIMORI-YAMASHITA e col., 1996).

Na forma tuberculóide, os histiócitos se diferenciam em células epitelióides, que reunidas formam os granulomas com maior capacidade de destruição bacilar. Os granulomas estão presentes na derme e entram em contato íntimo com a epiderme, produzindo atrofia. A alteração histopatológica característica da hanseníase tuberculóide é o granuloma de células epitelióides com quantidades variadas de linfócitos e células gigantes multinucleadas, sendo o dado fundamental para o diagnóstico o bacilo em ramos nervosos, mas estes frequentemente não são detectados (URA e col., 2004).

A forma virchowiana apresenta infiltrado difuso na derme de macrófagos carregados de bacilos e globias (bacilos íntegros, dispostos paralelamente), separado da epiderme por faixa de colágeno, a faixa de Unna. Na coloração convencional, o citoplasma do macrófago mostra-se espumoso e com aspecto vacuolar, contendo lipídeos no seu interior, sendo denominado de célula de Virchow, representando macrófago modificado, contendo bacilos íntegros e degeneração lipóidica (TOMIMORI-YAMASHITA e col., 1996).

No grupo borderline, o exame pode revelar estruturas semelhantes ao polo tuberculóide ou ao virchowiano. Na hanseníase borderline-tuberculóide, a presença da zona subepidérmica clara faz a diferenciação com a tuberculóide; os focos de células epitelióides com halo linfocitário ou a presença de células gigantes tipo Langerhans diferencia da borderline-borderline, sendo que nesta última as células epitelióides estão dispersas nos granulomas bem desenvolvidos, mas menores que as do tuberculóides e as células gigantes tipo Langerhans são ausentes (RIDLEY & JOPLING, 1966; TOMIMORI-YAMASHITA e col., 1996).

- **Imuno-histoquímica**

A imuno-histoquímica é um método de análise dos tecidos observados ao microscópio óptico, no qual um anticorpo específico, quimicamente ligado a uma enzima que converte um substrato incolor em um produto colorido, *in situ*, é utilizado para identificar um determinado receptor/marcador celular, antígenos, etc. O método busca identificar as características moleculares das doenças, baseando-se na conjugação de distintos marcadores com imunoglobulina, que com auxílio de um substrato específico, localiza o antígeno tecidual (MURPHY, 2010). A utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais para a identificação de antígenos específicos é importante no diagnóstico e no estudo da hanseníase. Huerre e colaboradores (1989) foram os primeiros a empregar esta técnica na hanseníase, através da utilização de anticorpos monoclonais contra o PGL-1 (antígeno glicolípido-fenólico-1).

Em 1992, Wang e colaboradores descreveram cinco padrões para análise dos achados de bacilos na hanseníase:

- 1- solitário, no qual o bacilo é uniformemente detectado;
- 2- granular, no qual o bacilo apresenta áreas não coradas em seu interior;
- 3- com “debris”, isto é, bacilo com distribuição irregular;

- 4- vacuolar, com margens bem definidas; e
- 5- amorfo, apresentando-se como uma reação de fundo difusa.

Nas formas virchowiana e borderline-virchowiana, o padrão predominante foi o vacuolar; na forma borderline-borderline os bacilos apresentavam padrão granular no citoplasma; nas formas borderline-tuberculóide foi difícil a visualização do antígeno e nas formas tuberculóide não se detectaram antígenos nas células epitelióides, gigantócitos e vasos sanguíneos (WANG e col., 1992).

Diferentes marcadores podem ser utilizados com a finalidade de identificar a presença e a disposição de células nos tecidos, dentre eles CD4, CD8, CD20, CD138, FOXP3 e TIA-1.

➤ **CD4 e CD8**

São glicoproteínas de superfície dos linfócitos T, expressas de forma isolada em subgrupos exclusivos de células maduras, com padrões distintos de restrição do MHC. Servem como moléculas acessórias na interação entre os linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos ou as células alvo (MICELI & PARNES, 1993).

As células T CD4⁺ virgens podem se diferenciar em diversos tipos de células T efetoras depois de ativadas pelo antígeno. Os dois tipos de células T CD4⁺ efetoras são chamados de células Th1 e Th2, que assim se diferenciam dependendo do microambiente de citocinas, no qual essas células estão expostas. Em particular, o IFN- γ , a IL-12 e a IL-18 são essenciais na fisiologia do desenvolvimento de células Th1, e a IL-4 no desencadeamento da resposta Th2 (KINDT, 2008).

As células Th1 são capazes de controlar determinadas infecções intracelulares, como as causadas pelas micobactérias, por ativar macrófagos infectados, induzindo a fusão de seus lisossomos às vesículas que contêm as bactérias. Também, auxiliam a produção de anticorpos por meio da liberação de sinais co-estimuladores e pela

interação com os linfócitos B. Já as células Th2 estão inteiramente dedicadas à ativação das células B virgens, na produção de anticorpos (MURPHY, 2010).

CD4 é uma molécula de 59 kDa, composta por quatro domínios semelhantes à imunoglobulina (D1, D2, D3, D4), de cadeia única, com afinidade específica para o MHC classe II, expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e células dendríticas. CD8 é dímero de 34 kDa, formado por duas cadeias diferentes (alfa e beta), ligadas por uma ponte dissulfídrica, que contém um único domínio, semelhante a imunoglobulina, ligada à membrana por um segmento de cadeia polipeptídica estendida, altamente glicosilado e importante na conformação e na proteção de clivagem por proteases. É capaz de interagir com o receptor de célula T como co-receptor para moléculas de MHC da classe I no reconhecimento antigênico (MURPHY, 2010).

Na hanseníase tuberculóide, os linfócitos T CD4⁺ se dispõem no centro do granuloma e os linfócitos TCD8⁺ predominam ao seu redor, enquanto que na hanseníase virchowiana, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ estão distribuídos difusamente no infiltrado inflamatório, sem constituir um granuloma (MAEDA, 2003).

Massone e colaboradores (2011) ao avaliarem o imunofenótipo do infiltrado de linfócitos em hansenianos co-infectados com o vírus da Imunodeficiência Adquirida através da técnica de imuno-histoquímica, observaram que as células T CD8⁺ predominavam no infiltrado celular de hansenianos multibacilares co-infectados com HIV (99,4%). Na forma borderline-tuberculóide e na reação reversa da hanseníase, a presença dessas células estava localizada dentro e ao redor dos granulomas, com ausência de identificação de células T CD4⁺.

Gonzalez e colaboradores (1999), através de análise de fenótipos de superfície de células inflamatórias pela imuno-histoquímica, concluíram que as células T são mais frequentes nos grupos TT/BT, existindo maior número destas células nestes casos que

no grupo LL. Demonstraram também, predomínio de anticorpos contra subpopulações de células T CD4⁺ nos casos TT e BT e maior proliferação de células T CD8⁺ nos casos LL.

➤ **CD20**

É um heterodímero com peso molecular de 33 a 37 kDa, da superfamília protéica de transposição-transmembrana-4, expressada especificamente em células da linhagem B do sangue periférico e tecidos linfóides, cuja ligação com os antígenos ativa as vias dependentes de tirosina quinase, determinando a proliferação e a diferenciação dos linfócitos B (KINDT, 2008).

Iyer e colaboradores (2007) identificaram nas lesões de pele de pacientes com hanseníase, através do estudo imuno-histoquímico, um número grande de células CD20⁺ nos casos dimorfo-virchowianos e nos virchowianos, enquanto que nos dimorfo-tuberculóides a presença desse marcador foi esporádica, o que reforçou o predomínio da resposta imune humoral no espectro mais disseminado da doença.

Estudos recentes têm demonstrado papel importante de linfócitos B (CD20) na defesa contra patógenos intracelulares como bactérias e fungos. Nas lesões de hanseníase, as células B são cruciais para reduzir o dano tecidual resultante da resposta vigorosa do hospedeiro ao *M. leprae* e para a contenção da bactéria através da manutenção e do desenvolvimento do granuloma (IYER e col., 2007).

➤ **CD138 (Sindecano-1)**

É uma proteína transmembrana tipo I heparan-sulfato, membro da família proteoglicana dos sindecanos, de 30,5 kDa codificada por um gene localizado no braço curto do cromossomo 2. Os sindecanos medeiam a ligação celular, sinalização celular e a organização do citoesqueleto, funcionando como uma proteína integral da membrana celular e participam da proliferação, migração e integração com a matriz celular via

receptor para proteínas da matriz extracelular. É expressa em células pré-B, células B imaturas, plasmócitos, superfícies basolaterais de células epiteliais, células mesenquimais embrionárias, células do músculo liso vascular, endotélio, células neurais e de câncer de mama, mas estão ausentes nos linfócitos B maduros circulantes (KINDT, 2008).

Iyer e colaboradores (2007) demonstraram através da análise imuno-histoquímica num estudo prospectivo em hansenianos, moderada positividade de células CD79 e CD138 no infiltrado celular dos pacientes dimorfo-virchowianos e nos virchowianos, enquanto que, nos dimorfo-tuberculóides a positividade ou a negatividade foi esporádica, confirmando a presença de células B maduras e plasmócitos, respectivamente, naquelas lesões, resultando no aumento dos títulos de anticorpos circulantes naquelas formas de hanseníase.

➤ **FOXP3**

Fator de transcrição da família das proteínas FOX, de 50 a 55 kDa, expresso em células T reguladoras naturais, envolvido na modulação da resposta imunológica contra diferentes patógenos (MURPHY, 2010). Células T reguladoras que expressam o FOXP3 são críticas na determinação de tolerância imunológica, suprimindo a função de células T auto-reativas, além de modificar a apresentação de algumas doenças, como a tuberculose, cuja presença de células Tregs em elevada frequência, está associada com a redução dos níveis de IFN- γ e no comprometimento funcional das células T, o que tende a determinar uma evolução da doença para o pólo mais grave (RIBEIRO-RODRIGUES e col., 2006).

Massone e colaboradores (2009) demonstraram através de um estudo retrospectivo envolvendo vinte hansenianos, a presença de células FOXP3⁺ em 95% dos casos, com uma densidade média de 2,9% do infiltrado, sem diferença estatística na

expressão nos casos TT, BT, BL e LL, enquanto que um significativo incremento foi observado na reação reversa comparado aos pacientes com eritema nodoso hansênico e nas formas não reacionais. Esses autores também constataram, que nas formas TT e BT, as células encontravam-se dentro e ao redor dos granulomas, enquanto que, nos BL e LL estavam dispostas difusa e aleatoriamente no infiltrado inflamatório.

Taflin e colaboradores (2009) sugeriram que a presença de células Treg (FOXP3⁺) dentro dos granulomas apresenta papel mais preventivo do que curativo, com função protetora na manutenção da tolerância imunológica.

➤ **TIA-1 (Antígeno 1 intracelular de células T)**

Trata-se de proteína associada a grânulos citoplasmáticos, de 17 kDa, expressa em células com capacidade citotóxica, podendo estar envolvida na sinalização da apoptose mediada pela cascata de Fas (IZQUIERDO, 2005).

Harvell e colaboradores (2003) demonstraram a expressão do marcador TIA-1 em leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos, mastócitos e em dermatoses benignas como líquen plano, psoríase, líquen escleroso, morféia, lúpus eritematoso, dermatite herpetiforme, urticária e eritema anular centrífugo, modificando a idéia que essa proteína era específica de linfócitos T citotóxicos.

Massone e colaboradores (2011) ao avaliarem o imunofenótipo do infiltrado de linfócitos em hansenianos co-infectados com o vírus da Imunodeficiência Adquirida através da técnica de imuno-histoquímica, observaram que as células FOXP3⁺ e TIA-1⁺ foram detectadas dentro e ao redor dos granulomas nos pacientes TT e BT, e distribuídas difusamente no infiltrado macrofágico nos BL, sendo que mais de 75% das células CD8⁺ apresentavam o fenótipo de citotoxicidade (TIA-1).

Tratamento da hanseníase

O tratamento da hanseníase preconizado pelo Ministério da Saúde se baseia na poliquimioterapia, oficialmente desde 1990, responsável pela drástica redução da endemia e pela proposta de se evitar o aparecimento de resistência medicamentosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Para os casos paucibacilares, recomenda-se dapsona 100 mg por dia, auto-administrada, e rifampicina 600 mg, uma vez por mês, supervisionada, nos pacientes adultos, seis doses. Estes pacientes não poderão ter mais de três faltas seguidas nas tomadas mensais da rifampicina. A alta por cura é dada, caso o paciente complete as seis doses do esquema em até nove meses consecutivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Nos pacientes multibacilares, o esquema preconizado é dapsona dose mensal de 100 mg supervisionada e 100mg auto-administrada, rifampicina 600mg supervisionada e clofazimina 300mg mensal, com administração supervisionada, e 50 mg auto-administrada. Será dada a alta quando os pacientes completarem 12 doses em até 18 meses, não podendo haver mais que quatro faltas consecutivas nas tomadas das doses mensais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

HELMINTOS INTESTINAIS

Helmintos ou vermes são animais metazoários, que podem parasitar várias partes do corpo humano, e através das alterações imunológicas por eles determinadas são capazes de influenciar na resposta imunológica a outras doenças infecciosas (MOREAU e col., 2010).

Os helmintos podem ser classificados em três grandes grupos: nematódeos ou vermes cilíndricos; cestóides ou vermes chatos desprovidos de tubo digestivo; e trematódeos, os vermes providos de ventosas (REY, 2008).

Os nematóides mais frequentes são: *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Enterobius vermicularis*, *Wuchereria bancrofti*, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*; no grupo dos cestódeos destacam-se: *Taenia solium* e *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus*, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*; e dentre os trematódeos a *Fasciola hepática* e *Schistosoma mansoni* (REY, 2008).

Infecções parasitárias por helmintos intestinais, como por exemplo, a ascaridíase, tricuriase e ancilostomíase são frequentes, 26%, 17% e 15%, respectivamente, em países de baixo e médio nível de desenvolvimento, sobretudo naqueles com condições sócio-econômicas e higiênicas precárias (SUPALI e col., 2010), onde são consideradas problema de saúde pública (MONTRESOR, 2003).

As maiores taxas de infecções por *Ascaris* ocorrem na China, Sudeste da Ásia, nas regiões costeiras África Ocidental e na África Central. As infecções por *Trichuris* apresentam sua maior prevalência na África Central, Sul da Índia e Sudeste da Ásia e as infecções por ancilostomídeos são mais comuns na África Sub-Saariana, Sul da China e Sudeste da Ásia (SILVA e col., 2001; MONTRESOR, 2003).

Mesmo com essa alta frequência de infecções parasitárias, não são consideradas prioritárias pelas autoridades de saúde, por não estarem associadas com alta mortalidade. No entanto, as enteroparasitoses podem afetar o equilíbrio nutricional, pois interferem na absorção de nutrientes, induzem sangramento intestinal, reduzem a ingestão alimentar e ainda podem causar complicações como obstrução intestinal,

diarréia crônica, crises epilépticas, hipertensão portal, prolapso retal e formação de abscessos (REY, 2008).

O espectro e a prevalência parasitária variam nas diferentes regiões brasileiras, de acordo com as condições climáticas, sanitárias, sócio-econômicas e educacionais de cada área. Ludwig e colaboradores (1999) estabeleceram uma correlação entre as condições de saneamento básico e a frequência de parasitoses e evidenciaram uma relação inversa entre a prevalência de exames parasitológicos de fezes positivos e a população atendida por melhoria das condições de saneamento básico.

Imunologia nas infecções helmínticas

Tanto a resposta imune inata quanto a adquirida do hospedeiro são de fundamental importância no controle das infecções helmínticas, e ambas dependem de inúmeros fatores, dentre os quais se destacam: a) carga parasitária: intensidade de infecção, b) espécie do helminto: ciclo de vida, habitat definitivo e migração, c) estágio de infecção: aguda ou crônica, d) frequência de exposição: primo-infecção, re-infecção ou tratamento anti-helmíntico prévio, e e) fatores genéticos e intrínsecos do hospedeiro: estado nutricional, imunomodulação promovida por produtos parasitários e status imunológico (WANG e col., 2008; HELMBY, 2009).

Apesar do complemento e de outros fatores da resposta imune natural contribuírem para a defesa contra a infecção pelos helmintos, a resposta imune específica com a produção de anticorpos é de suma importância na eliminação desses parasitas. Há forte estimulação da resposta imune Th2, com expressão aumentada das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, as quais, dentre outras funções, induzem a produção de IgE pelas células B e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, componentes

fundamentais na defesa contra helmintos (BENTWICH e col., 1996; MULCAHY e col., 2003; HELMBY, 2009).

Dados recentes indicam que moléculas lipídicas derivadas de helmintos (PAMPS) são responsáveis pela ativação de TLR2 (Toll Like Receptor), que induzem tanto a expressão de células T reguladoras (inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas co-estimulatórias, MHC II), quanto estimulam as células dendríticas no direcionamento da resposta Th2 (VAN DER KLEY e col., 2002; MULCAHY e col., 2003; HEWITSON, 2009; EVERTS, 2010; SMITS e col., 2010). Esse fenômeno explica como a estimulação imune crônica, contínua, determinada pela infecção crônica por nematóides é tolerada apesar da forte resposta Th2 (BORKOW e col., 2000).

Para facilitar sua sobrevivência em hospedeiros imunocompetentes, os helmintos desenvolveram sofisticadas estratégias, incluindo a capacidade de modular e manipular o sistema imune do hospedeiro. Essa habilidade em alterar a resposta imune, torna o hospedeiro hiporresponsivo, através da indução de células T reguladoras e modulação da resposta imune inata, tais como macrófagos, células dendríticas e células do estroma local, com aumento de níveis de IL-10 e TGF- β , como também interfere na resposta imune contra antígenos parasitários e na proteção contra outros patógenos (HELMBY, 2009).

Através da indução de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg) e do desvio do sistema imune para Th2, infecções por nematóides intestinais apresentam papel benéfico no controle de desordens auto-imunes e nas doenças que cursam com resposta imune celular exacerbada, em que há predomínio da resposta Th1, como no caso das doenças inflamatórias intestinais (WANG e col., 2008). No entanto, a

interferência das infecções por nematóides intestinais tem evidenciado papel deletério na evolução de outras doenças infecciosas (HELMBY, 2009; SMITS, 2010).

Bentwich e colaboradores (1999) demonstraram que indivíduos co-infectados pelos HIV e *S. mansoni* apresentaram cargas virais elevadas em comparação com indivíduos HIV em áreas não-endêmicas, não portadores dessa verminose. No entanto, quando a terapêutica anti-helmíntica foi administrada aos infectados pelo *S. mansoni*, houve redução da carga viral plasmática do HIV, comparável aos indivíduos não infectados, em áreas não endêmicas. Este fato sugere que o tratamento com drogas anti-helmínticas é capaz de restaurar a resposta imune e retardar a progressão da doença, como por exemplo, na infecção pelo HIV.

Tristão-Sá e colaboradores (2002) encontraram em um estudo caso-controle, uma maior frequência de nematóides intestinais no grupo com tuberculose pulmonar quando comparado ao grupo controle sem tuberculose, sugerindo que o efeito modulador da resposta imunitária induzida por nematóides intestinais possa ter contribuído para a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e/ou progressão da doença (TRISTÃO-SÁ e col., 2002).

Considerando-se que a imunidade efetiva contra o *Mycobacterium tuberculosis* é dependente da eficiência da resposta imunitária Th1/Th17, é possível que uma infecção prévia por nematóides intestinais possa facilitar uma infecção subsequente pela micobactéria e/ou promover a progressão da doença para formas mais severas, através do aumento da atividade de células T reguladoras ou da produção de citocinas Th2 (DINIZ e col., 2010).

Diniz e colaboradores (2001), em um estudo caso-controle retrospectivo, observaram um aumento na frequência da infecção por nematóides intestinais em pacientes com hanseníase quando comparados aos controles (pacientes sem hanseníase,

controlados para idade e gênero e oriundos de um mesmo hospital), sendo essa relação mais significativa nas formas mais graves da doença, ou seja, nas formas dimorfa e virchowiana da doença. Esses dados sugerem que a infecção por helmintos intestinais pode facilitar a infecção por *Mycobacterium leprae* e/ou a progressão da doença para o polo lepromatoso.

Diniz e colaboradores (2010), em um estudo prospectivo de hansenianos multibacilares com nematóides intestinais, demonstraram um aumento significativo na liberação das citocinas IL-4 e IL-10 em culturas de células do sangue periférico destes pacientes, estimuladas com antígenos do *M. leprae*, quando comparados a pacientes não infectados por helmintos intestinais. Esses dados sugeriram que a presença de helmintos possa ter favorecido a resposta imune Th2.

Estudos em seres humanos têm sugerido que infecções por helmintos afetam também a susceptibilidade à infecção por malária. Spiegel e colaboradores (2003) mostraram que crianças infectadas pelo *Schistosoma mansoni*, especialmente aquelas com alta carga parasitária, apresentaram uma frequência maior de surtos de ataques maláricos. Porém, outros estudos sugeriram que a indução de citocinas anti-inflamatórias por infecções helmínticas concomitantes, foi capaz de reduzir a resposta inflamatória e suprimir o desenvolvimento de malária cerebral (HELMBY, 2009).

Geiger e colaboradores (2002) demonstraram, através da condução de um estudo em duas comunidades rurais (Motas e Pires), localizadas a 70 km da cidade de Belo Horizonte, na região Sul, que a co-infecção *Ascaris lumbricoides* e/ou *Trichuris trichiura* e a alta carga parasitária, não somente resultou no aumento da resposta celular específica contra os parasitas, como também reduziu a resposta Th1. Foi observado também, que citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12 e IFN- γ) estavam suprimidas

no grupo com alta carga parasitária, mono infectados com *Ascaris* ou co-infectados pelos *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*.

Tendo em vista que os mecanismos reguladores induzidos por agentes infecciosos também inibem a exacerbação da resposta Th1, seria esperado que as infecções tivessem capacidade de prevenir o surgimento de doenças auto-imunes. Summers e colaboradores (2003) demonstraram através de um ensaio clínico, que a exposição a helmintos inibiu as manifestações clínicas da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa, doenças auto-imunes, através da regulação da resposta Th1.

Silva e colaboradores (2010) conduziram um estudo transversal com o objetivo de avaliar a associação entre a dermatite atópica e a ascaridíase em crianças entre dois e dez anos, residentes no bairro de Pedregal, Campina Grande (PB), área de baixos indicadores sócio-econômicos. Verificou-se, através desse estudo, que a exposição parasitária diminuiu a ocorrência da forma grave da dermatite atópica devido à tolerância imunológica.

A observação em países em desenvolvimento, com alta carga de infecções parasitárias, sugeriu um efeito protetor das infecções parasitárias contra as manifestações alérgicas mediadas pela IgE. Nesses países, a prevalência de doenças atópicas é muito menor do que nas nações industrializadas. As infecções parasitárias se correlacionam com a produção de IL-10, induzida por helmintos, a qual, por sua vez, foi inversamente associada à sensibilização alérgica. Esses achados sugeriram que as propriedades anti-inflamatórias da IL-10, induzida pela infecção por helmintos, podem atenuar a resposta alérgica ou promover tolerância (VAN DEN BIGGELAAR e col., 2000). Essa relação inversa com sensibilidade reduzida ao teste cutâneo foi demonstrada em infecções por helmintos, tais como: ascaridíase, tricuriase e ancilostomíase (COOPER e col., 2003).

Portanto, o que se observa, é que as infecções helmínticas causam alterações nas células T, no perfil de ativação dessas células, determinando importante impacto na resposta imune do hospedeiro, o que culmina na interferência da defesa a outras doenças, aumentando ou diminuindo a capacidade do hospedeiro em reagir a outros patógenos.

3.0 - OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Determinar as características imuno-histoquímicas das lesões das formas clínicas da hanseníase em pacientes com e sem helmintos intestinais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo epidemiológico para verificar a existência de associação entre as variáveis: a) forma clínica da hanseníase e classificação operacional, b) diagnóstico clínico e histopatológico, c) forma clínica e sexo dos pacientes, e d) presença de verminoses e sexo dos pacientes.
- Analisar a presença e frequência de células CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD138⁺, TIA-1⁺ e FOXP3⁺ através da imuno-histoquímica, em amostras de biópsias de lesões de pele, de pacientes com o diagnóstico clínico-histopatológico de hanseníase com e sem verminose intestinal.

4.0- METODOLOGIA

4.1-Tipo de estudo e caracterização da amostra

Estudo descritivo, baseado na análise retrospectiva de prontuários e de exames anátomo-patológicos de biópsias de pele de pacientes atendidos no período de 1995 a 2010, no Serviço de Dermatologia e Patologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, situado em Vitória (Espírito Santo).

Esses prontuários foram selecionados mediante análise prévia dos arquivos existentes no Serviço de Dermatologia, de todos os pacientes que foram submetidos à biópsia e ao exame histopatológico e encaminhados à sessão de dermatopatologia, realizada uma vez por semana.

Quando identificado um caso de hanseníase, através da análise do prontuário, confirmado tanto clínica quanto histologicamente, eram anotados os seguintes dados dos pacientes: idade, sexo, forma clínica de apresentação da doença, diagnóstico histopatológico e a presença ou ausência de verminose e a espécie envolvida.

Em seguida, foram separados os blocos de parafina da biópsia cutânea desses pacientes, que se encontravam no Setor de Patologia do Hospital, e foram encaminhados para o Serviço de Imunologia do Hospital da Universidade de Graz, Graz, Áustria, para a realização da análise imuno-histoquímica para a pesquisa de marcadores anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anti-TIA-1, anti-CD138 e anti-FOXP3.

4.2- População

Pacientes atendidos no período de 1995 a 2010, no Serviço de Dermatologia do HUCAM, com o diagnóstico de hanseníase e que, após a suspeita clínica, foram submetidos à biópsia e exame anátomo-patológico de lesão de pele.

Critérios de Inclusão dos pacientes:

- ◆ Pacientes com diagnóstico clínico de hanseníase e confirmado pelo exame histopatológico.
- ◆ Pacientes que realizaram exame parasitológico de fezes e tiveram seu resultado anotado no prontuário médico

Critérios de Exclusão dos pacientes:

- ◆ Pacientes com hanseníase confirmada pelo exame histopatológico, mas que não realizaram ou não foi anotado no prontuário o resultado do exame parasitológico de fezes.

4.3- Método Imuno-histoquímico

O exame imuno-histoquímico, técnica essencialmente qualitativa, consiste no método de análise molecular dos tecidos, observado ao microscópio, buscando identificar as características moleculares das doenças. Esse procedimento foi realizado a partir do processamento dos blocos de parafina obtidos do Setor de Patologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes e encaminhados para o Serviço de Imunologia do Hospital da Universidade de Graz, Graz, Áustria.

As fitas de parafina e as etapas consistiram em: microtomia, com a obtenção de cortes histológicos de dois a três μm de espessura. As fitas de parafina obtidas no processo de corte pela microtomia foram cuidadosamente colocadas em banho-maria histológico e os cortes depositados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriétilsilano (APTS). As lâminas com os cortes foram levadas à estufa a 60°C e deixadas por 24 horas para melhor adesão do tecido.

Os cortes passaram por três banhos de xilol, por pelo menos cinco minutos cada, e três banhos em uma série de diluições de etanol indo de etanol 100% a etanol a 10% de álcool absoluto (10 segundos em cada), para completar a desparafinização. Por último, foram deixadas em banho de solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) por cinco minutos. Após as lâminas terem permanecido por pelo menos cinco minutos no PBS, foram transferidas para a bandeja e iniciaram-se os procedimentos de bloqueio, recuperação de epítomos e incubação. Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos, de 10 minutos cada, de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol; seguindo-se de lavagens com água destilada e PBS (pH 7,2). As lâminas foram incubadas no ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 0,1 mM para recuperar os epítomos de CD4 e CD8, pelo calor, durante quatro minutos, contados a partir da fervura, seguindo-se de lavagens em água corrente e destilada. Após as etapas de recuperação de antígeno, as lâminas foram mergulhadas novamente na solução salina de PBS (pH 7,2), transferidas para a bandeja e incubadas com os anticorpos específicos (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anti-CD138, anti-FOXP3 e anti-TIA-1), diluído em tampão PBS, durante 16 a 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação durante a noite, as lâminas foram lavadas com PBS e os anticorpos secundários adicionados. O anticorpo secundário empregado nessa técnica foi marcado com biotina, e a enzima apresentou-se sob a forma de um complexo diretamente ligado a avidina ou estreptoavidina.

O anticorpo secundário ligado à biotina foi submetido à incubação por 30 minutos e então, se procedeu com novas lavagens em PBS. Acrescentou-se o complexo estreptoavidina conjugado com a peroxidase, incubou-se por mais 30 minutos e novamente realizou-se lavagem com PBS, enxugando o excesso e pingando a solução de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), substância cromógena, que ficou por cinco minutos.

Finalizado os cinco minutos, as lâminas foram mergulhadas em água corrente, contra-coradas com hematoxilina, hidratadas, diafanizadas e montadas com bálsamo e analisadas através de um microscópio óptico.

4.4- Análise estatística

As variáveis foram estudadas através do programa de estatística SPSS 17.0 e Prisma 5 OSX, versão 5 de 2009, tomando-se como base o nível de significância $p < 0,05$.

Para a análise da concordância clínico-histopatológica foi empregado o teste *kappa*, que se baseia no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os diagnósticos. O *kappa* varia de -1 a +1. O valor +1 representa total concordância entre os dois avaliadores, ou seja, os dois avaliadores classificaram todos os domínios exatamente da mesma forma, o valor zero significa a existência de relação entre as classificações dos dois avaliadores, e o valor -1 significa que os dois avaliadores classificaram exatamente o oposto, sugerindo discordância, mas não a intensidade da discordância. Em geral, observam-se as seguintes classificações para a interpretação do *kappa*: menor de 0,40 significando pequena concordância, valores entre 0,41 e 0,60 representando concordância regular, valores entre 0,61 e 0,80, boa concordância e maior de 0,80 excelente concordância.

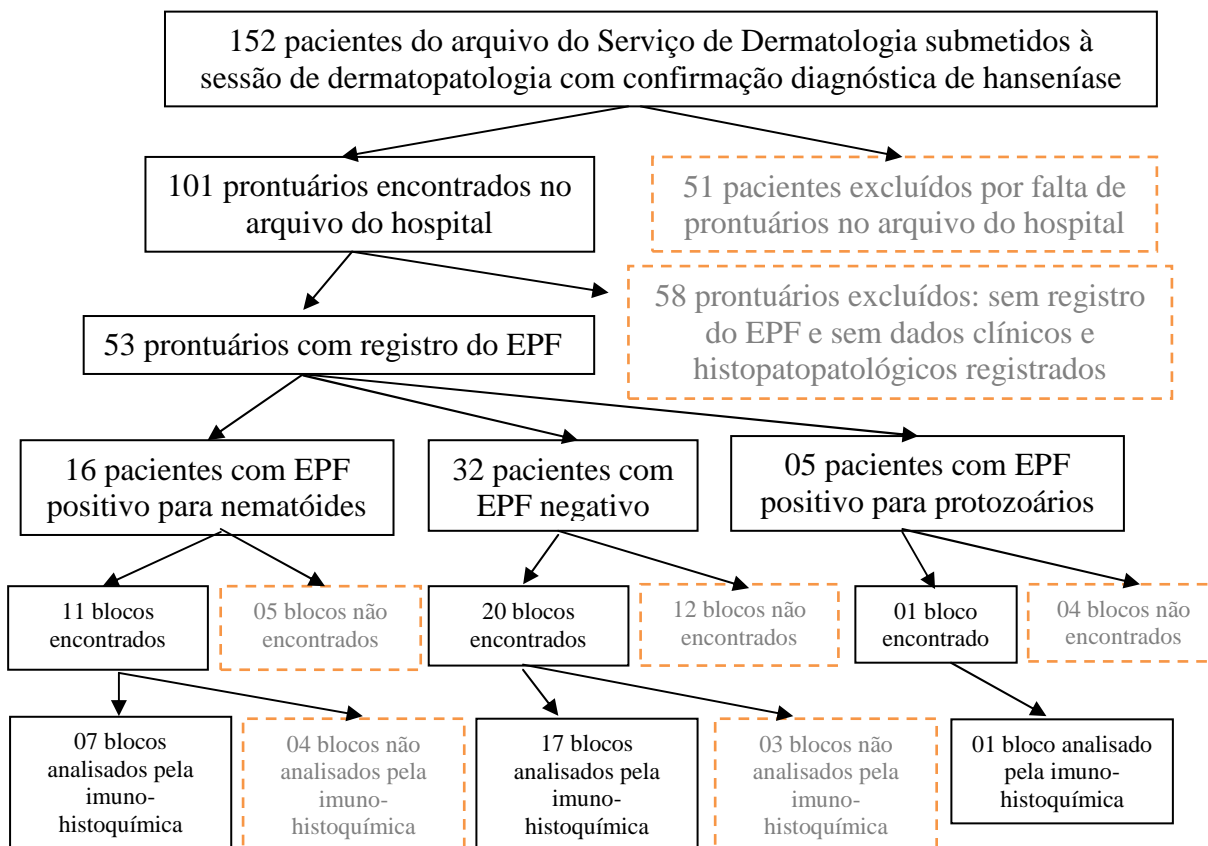
4.5 – Considerações Éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número 042/11, sendo aprovado em Reunião Extra Ordinária realizada em 04 de maio de 2011.

O estudo não trouxe prejuízos aos sujeitos envolvidos. Os participantes tiveram assegurado sua identidade no anonimato, de acordo com o prescrito na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que contém diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, e todos os aspectos éticos e legais referentes às fases do projeto foram respeitados de acordo com essa resolução.

5.0- RESULTADOS

Figura 1: Fluxograma na obtenção dos prontuários e blocos dos pacientes do estudo.



Foram selecionados no arquivo de Dermatologia, 152 pacientes atendidos durante o período do estudo, com o diagnóstico clínico de hanseníase e confirmado pelo estudo histopatológico das lesões cutâneas. Destes, 101 prontuários foram obtidos no arquivo geral do Hospital (SAME), sendo, portanto, excluídos 51 por não serem disponibilizados pelo setor. Em seguida procedeu-se a análise dos prontuários obtidos, sendo excluídos 58 prontuários por falta de registro de exame parasitológico de fezes (EPF), quer seja pela não anotação do resultado deste exame ou pela ausência de solicitação por parte da equipe, e por falta de dados clínicos e/ou histopatológicos dos pacientes.

Dos 53 prontuários de pacientes com hanseníase e com registro de EPF, dezesseis eram positivos para nematóides, cinco positivos para protozoários e trinta e dois apresentavam resultado negativo para helmintos e protozoários.

Dos dezesseis pacientes que apresentaram o resultado do exame parasitológico positivo para nematóides, onze blocos de parafina estavam disponíveis no Setor de Patologia do Hospital, dos cinco com protozoários foi disponibilizado um bloco, e dos trinta e dois com resultado negativo no exame, vinte foram encontrados, como pode ser observado no fluxograma acima.

Esses trinta e dois blocos de parafina de pacientes com hanseníase co-infectados pelos nematóides intestinais, protozoários e sem a co-infecção foram encaminhados ao Serviço de Imunologia do Hospital da Universidade de Graz, Graz, Áustria, e submetidos ao estudo imuno-histoquímico, realizado pelo colaborador Dr. Cesare Massone.

Dos onze blocos disponibilizados de pacientes com a co-infecção hanseníase e nematóides intestinais, sete puderam ser analisados pelo exame imuno-histoquímico, sendo quatro indisponíveis para o exame, quer seja, pela qualidade ruim do bloco ou da biópsia muito superficial; dos vinte blocos de pacientes com hanseníase sem nematóides intestinais, dezessete puderam ser analisados, sendo três excluídos pelas mesmas razões anteriormente mencionadas; e o bloco do paciente co-infectado com *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* pode ser estudado.

A idade mediana dos cinquenta e três pacientes do estudo foi de 43 anos (desvio padrão de 17 anos e nove meses), sendo a idade mínima de 16 anos e a idade máxima de 78 anos. A caracterização da faixa etária pode ser avaliada na Tabela 1. Em relação ao sexo, vinte e nove (54,7%) pacientes eram femininos e vinte e quatro (45,3%) masculinos.

Tabela 1- Caracterização dos 53 pacientes segundo a faixa etária.

Faixa etária	n	%
16 a 19 anos	2	3,8
20 a 29 anos	13	24,5
30 a 39 anos	8	15,1
40 a 49 anos	8	15,1
50 a 59 anos	8	15,1
60 a 78 anos	14	26,4
Total	53	100

A distribuição dos 53 pacientes em relação às formas clínicas da hanseníase comparada ao resultado do estudo histopatológico das lesões cutâneas pode ser observada na Tabela 2. Nenhum paciente teve suspeita clínica de hanseníase indeterminada. Os diagnósticos clínicos nem sempre coincidiram com as formas clínicas observadas ao exame histopatológico da lesão cutânea. Três pacientes os quais não tiveram como primeira hipótese diagnóstica a hanseníase, mas sim outras doenças dermatológicas, como granuloma anular, carcinoma basocelular e vasculite, apresentaram confirmação de hanseníase ao exame histopatológico, sendo dois da forma tuberculóide e um da forma virchowiana da doença.

No estudo, observou-se boa concordância ($kappa = 0,61$) entre o diagnóstico clínico e o histopatológico (Tabela 2), sendo que a concordância foi maior para as formas polares: HT e HV (Figura 2), o que de certo modo era esperado, uma vez que essas formas da doença apresentam características clínico-histológicas peculiares, enquanto que as formas dimorfas são imunologicamente instáveis, dificultando o diagnóstico.

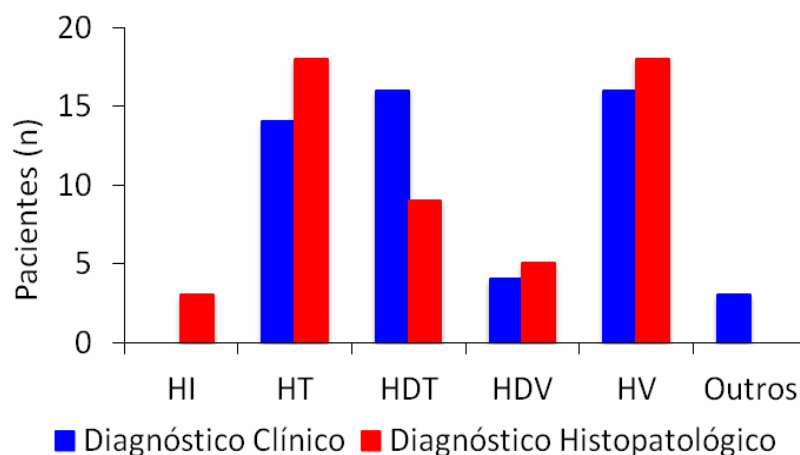
Tabela 2 – Distribuição dos 53 pacientes pelos diagnósticos clínicos e os resultados dos exames histopatológicos, com a estatística *kappa*.

Diagnóstico Clínico	Diagnóstico histopatológico					<i>Kappa</i>
	HI	HT	HDT	HDV	HV	
HT (14 casos)	2	12	0	0	0	0,61*
HDT (16 casos)	1	4	9	1	1	
HDV (4 casos)	0	0	0	3	1	
HV (16 casos)	0	0	0	1	15	
Outros (3 casos)	0	2	0	0	1	
Total	3	18	9	5	18	

* Coeficiente estatisticamente significante.

Legenda: HI (Hanseníase Indeterminada), HT (Hanseníase Tuberculóide), HDT (Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide, HDV (Hanseníase Dimorfa-Virchowiana), HV (hanseníase Virchowiana).

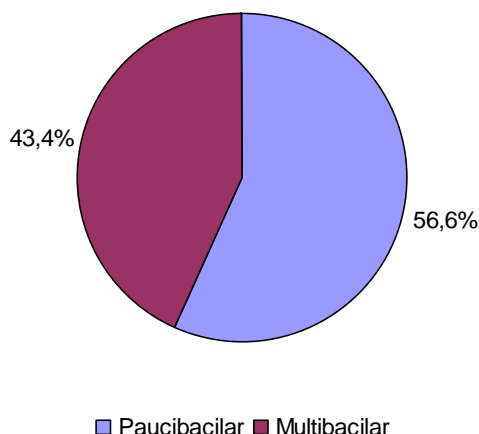
Figura 2: Correlação do diagnóstico clínico com o resultado do estudo histopatológico dos 53 pacientes analisados.



Legenda: HI (Hanseníase Indeterminada), HT (Hanseníase Tuberculóide), HDT (Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide, HDV (Hanseníase Dimorfa-Virchowiana), HV (hanseníase Virchowiana).

O resultado do histopatológico foi adotado como padrão na classificação da hanseníase. Desta forma, trinta (56,6%) pacientes eram paucibacilares (HI, HT e HDT) e 23 (43,4%) eram multibacilares (HDD, HDV e HV), pela classificação operacional da Organização Mundial de Saúde (Figura 3).

Figura 3 – Distribuição dos 53 pacientes em percentual segundo classificação operacional da Organização Mundial de Saúde.

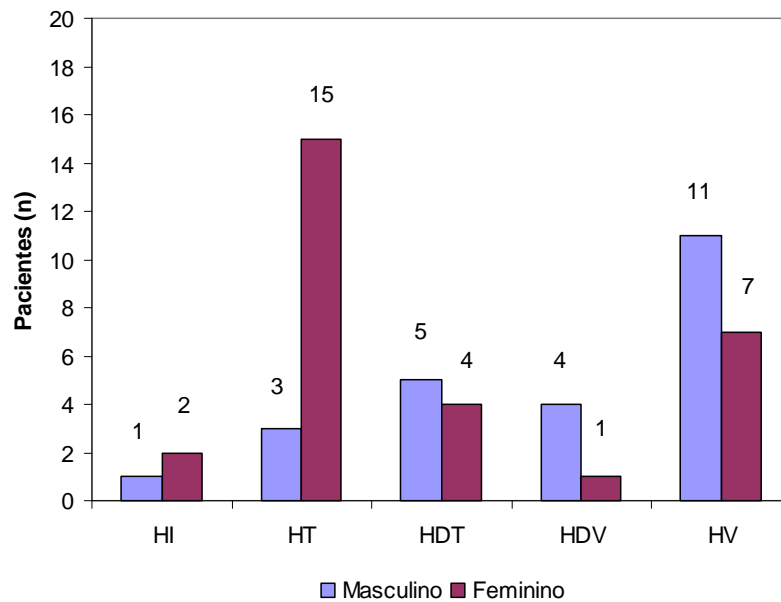


Dentre os 24 pacientes masculinos, nove (37,5%) eram paucibacilares (um HI, três HT e cinco HDT) e quinze (62,5%) eram multibacilares (quatro HDV e onze HV). Dos vinte e nove pacientes do sexo feminino, vinte e um (72,4%) eram paucibacilares (dois HI, quinze HT e quatro HDT) e oito (27,6%) multibacilares (um HDV e sete HV), conforme demonstrado na Tabela 3 e na Figura 4. Foi observado, então, que o sexo feminino foi mais frequente nos casos paucibacilares e o masculino nos casos multibacilares ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Relação entre o sexo dos pacientes e a classificação operacional dos 53 pacientes analisados.

Classificação Operacional	Sexo		Total	p-valor
	Masculino	Feminino		
Casos Paucibacilares	9 (37,5%)	21 (72,4%)	30 (56,6%)	0,02
Casos Multibacilares	15 (62,5%)	8 (27,6%)	23 (43,4%)	0,02
Total	24 (100%)	29 (100%)	53 (100%)	-

Figura 4 - Números absolutos do cruzamento entre o sexo e o diagnóstico histopatológico dos 53 pacientes do estudo.



Legenda: HI (Hanseníase Indeterminada), HT (Hanseníase Tuberculóide), HDT (Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide, HDV (Hanseníase Dimorfa-Virchowiana), HV (hanseníase Virchowiana).

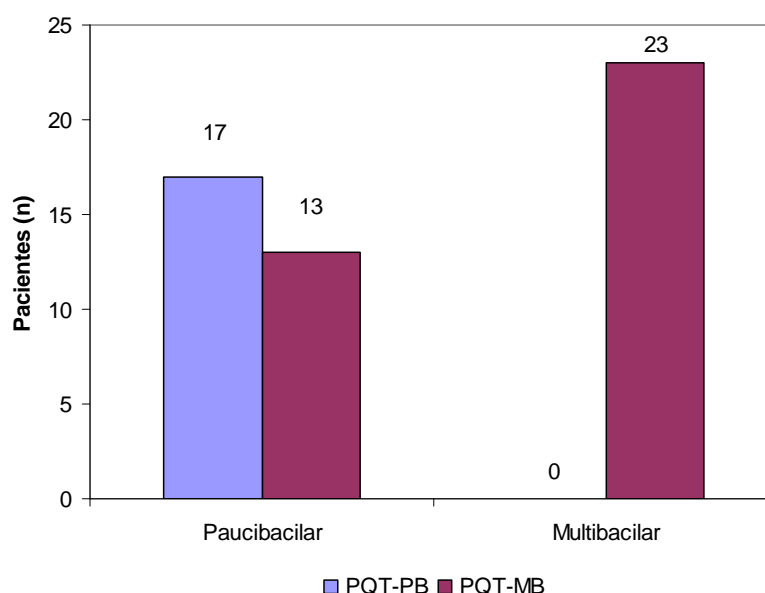
Os episódios reacionais (reação reversa e/ou eritema nodoso), aos quais os pacientes podem ter apresentado durante o tratamento, com consequente necessidade do uso de corticosteróides ou talidomida, não puderam ser avaliados por falta de dados clínicos anotados nos prontuários dos pacientes.

Em relação ao tratamento adotado nos pacientes do estudo, dos 30 pacientes paucibacilares, dezessete (56,7%) utilizaram a PQT/PB, e os demais paucibacilares (n=13 pacientes, 43,3%) a PQT/MB, como também, todos (23 pacientes) os multibacilares, conforme demonstrado na Tabela 4 e Figura 5.

Tabela 4 – Correlação entre o tratamento adotado e a classificação operacional dos 53 pacientes estudados.

Tratamento	Classificação operacional		Total	p-valor
	Paucibacilar	Multibacilar		
PQT-PB	17 (56,7%)	0 (0,0%)	17 (32,1%)	0,000
PQT-MB	13 (43,3%)	23 (100%)	36 (67,9%)	0,000
Total	30 (100%)	23 (100%)	53 (100%)	-

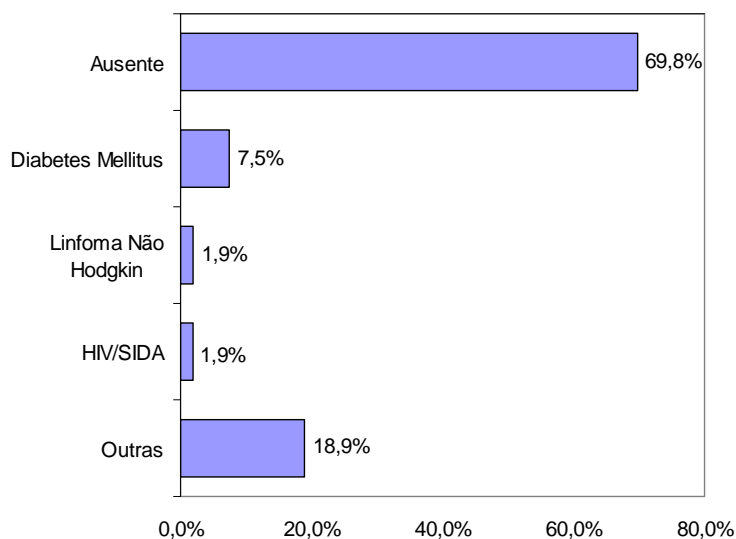
Figura 5 – Números absolutos do cruzamento entre o tratamento adotado e a classificação operacional OMS dos 53 pacientes.



Legenda: PQT-PB (poliquimioterapia paucibacilar); PQT-MB (poliquimioterapia multibacilar).

Trinta e sete pacientes (69,8%) não apresentavam comorbidades na história clínica, quatro (7,5%) tinham diabetes mellitus, um era portador de infecção pelo HIV/SIDA (1,9%), um estava em tratamento de linfoma não-Hodgkin (1,9%) e dez (18,9%) pacientes, outras doenças que não determinavam imunossupressão, tais como: hipertensão arterial, epilepsia, anemia e doença pulmonar obstrutiva crônica (Figura 6).

Figura 6- Distribuição percentual dos 53 pacientes segundo comorbidades.



Dos 53 pacientes, 32 (60,4%) não apresentavam nem helmintos e nem protozoários ao exame parasitológico de fezes, 16 (30,2%) eram positivos para helmintos e cinco (9,4%) para protozoários (*Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica*), conforme demonstrado na Tabela 5 e nas Figuras 7 e 8.

Tabela 5: Resultados dos exames parasitológicos de fezes dos 53 pacientes.

Variáveis	n	%
Exame Parasitológico de Fezes		
Negativo	32	60,4
<i>Ascaris lumbricoides</i>	8	15,1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3	5,7
<i>Enterobius vermicularis</i>	2	3,8
<i>Ancylostomídeos</i>	2	3,8
<i>Entamoeba coli</i> e <i>Entamoeba histolytica</i>	5	9,4
<i>Schistosoma mansoni</i>	1	1,9
Helmintos		
Negativo	32	60,4
Presente	16	30,2
Protozoários		
	5	9,4
Presença de Helmintos		
Ausente	37	69,8
Presente	16	30,2
Total	53	100

Figura 7- Distribuição percentual dos 53 pacientes segundo resultado do exame parasitológico de fezes.

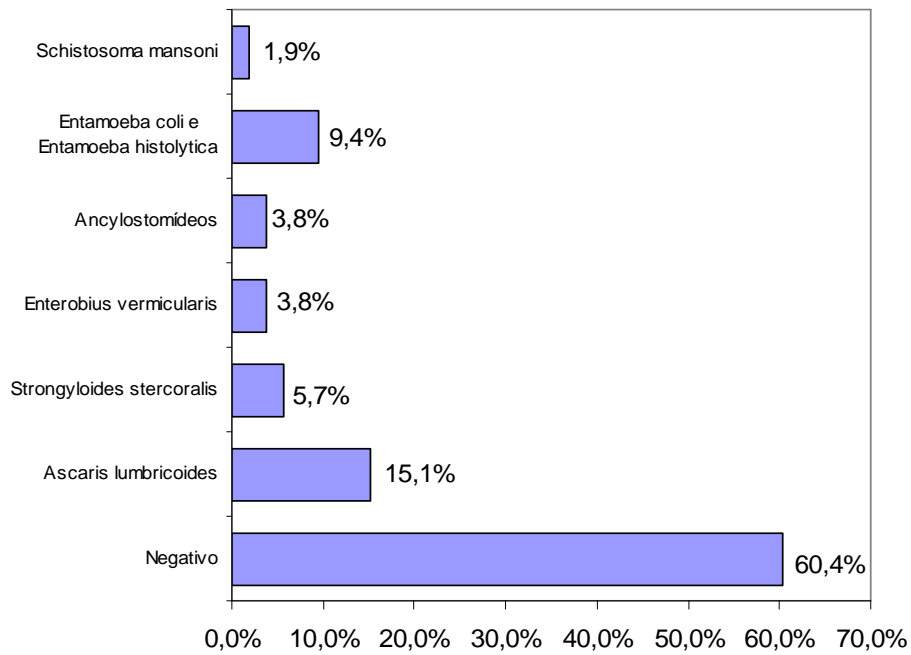
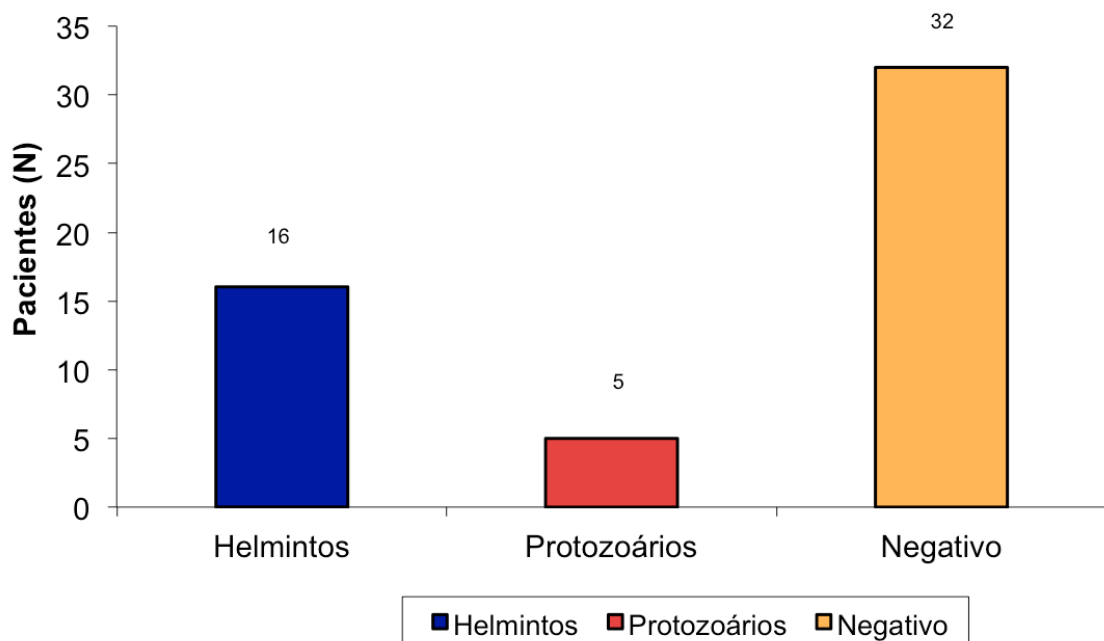


Figura 8- Distribuição dos 53 pacientes de acordo com a positividade ou negatividade do exame parasitológico de fezes.



Dos 16 hansenianos co-infectados pelos helmintos intestinais, oito (50%) eram positivos para *Ascaris lumbricoides*, três (18,7%) para *Strongyloides stercoralis*, dois (12,5%) para *Ancylostomídeos*, dois (12,5%) para *Enterobius vermicularis*, um (6,25%) para *Schistosoma mansoni*, como visualizado na Figura 8, sendo onze (68,75%) do sexo masculino e cinco (31,25%) do sexo feminino (Figura 9).

Dos trinta e sete não co-infectados pelos helmintos intestinais, treze (35,1%) eram do sexo masculino e vinte e quatro (64,9%) do sexo feminino, como demonstrado na Tabela 6 e Figura 10, com predomínio de exames parasitológicos de fezes negativos no sexo feminino, embora sem significância estatística ($p=0,05$).

Figura 9 – Distribuição dos 16 pacientes co-infectados pelos helmintos e pela hanseníase de acordo com a espécie de helminto detectada ao exame parasitológico de fezes.

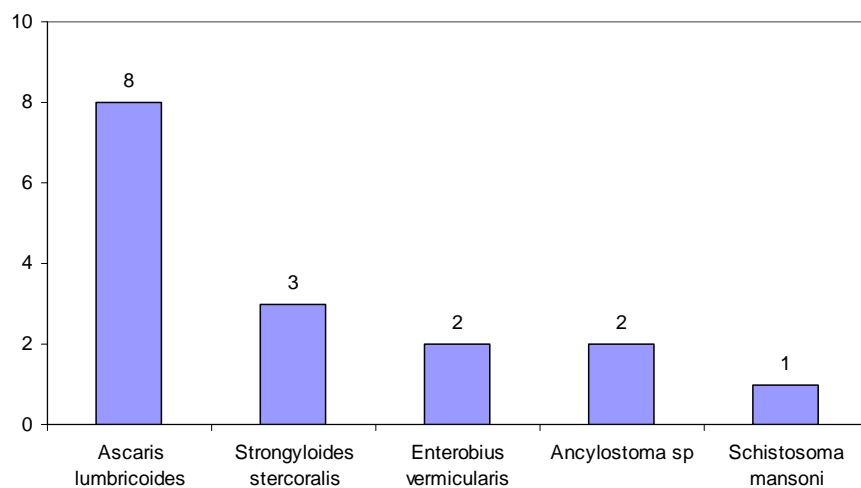
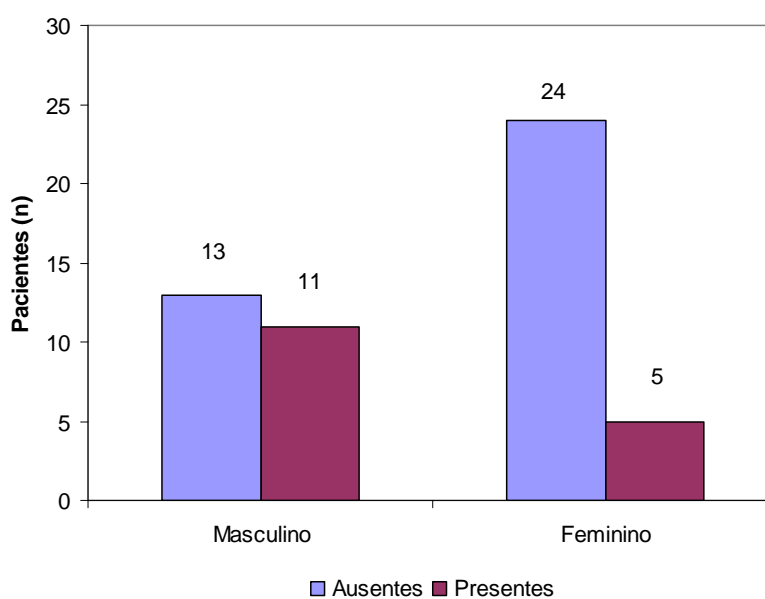


Tabela 6 – Correlação entre o sexo dos 53 pacientes e a presença ou não de helmintos ao exame parasitológico de fezes.

Helmintos	Sexo		Total	p-valor
	Masculino	Feminino		
Ausente	13 (54,2%)	24 (82,8%)	37 (69,8%)	0,05
Presente	11 (45,8%)	5 (17,2%)	16 (30,2%)	0,05
Total	24 (100%)	29 (100%)	53 (100%)	-

Figura 10- Números absolutos da correlação entre o sexo dos 53 pacientes e a presença de helmintos ao exame parasitológico de fezes.

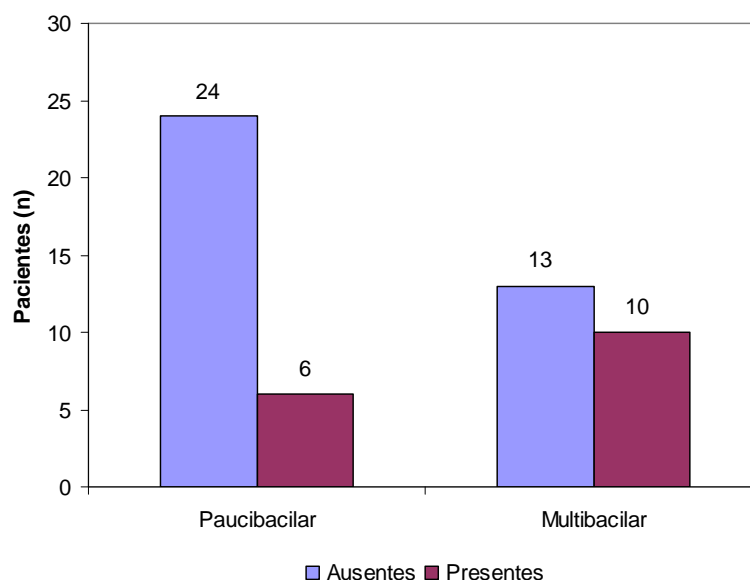


Dos 23 pacientes classificados como multibacilares, treze (56,5%) eram negativos para helmintos e dez (43,5%) positivos para helmintos e dos 30 paucibacilares, vinte e quatro (80%) eram negativos para helmintos e seis (20%) apresentavam positividade para helmintos, sem diferença estatística no cruzamento entre positividade de helmintos e a classificação operacional (Tabela 7 e Figura 11).

Tabela 7 – Correlação entre a classificação operacional OMS e a presença ou não de helmintos ao exame parasitológico de fezes.

Helmintos	Classificação operacional			p-valor
	Paucibacilar	Multibacilar	Total	
Ausente	24 (80,0%)	13 (56,5%)	37 (69,8%)	0,12
Presente	6 (20,0%)	10 (43,5%)	16 (30,2%)	0,12
Total	30 (100%)	23 (100%)	53 (100%)	-

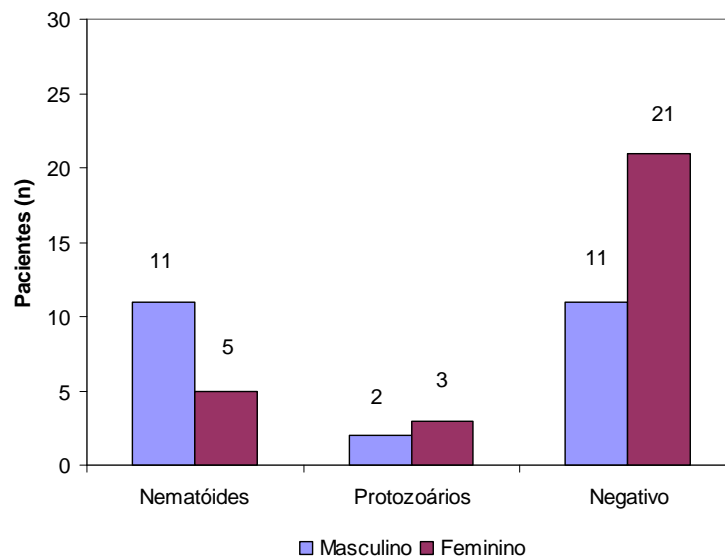
Figura 11 – Números absolutos do cruzamento entre a classificação operacional OMS e a presença de helmintos no exame parasitológico de fezes.



Dos vinte e quatro pacientes masculinos, onze (45,8%) não tinham vermes ao exame parasitológico de fezes, cinco (20,8%) apresentaram *Ascaris lumbricoides*, três (12,5%) *Strongyloides stercoralis*, três (12,5%) pacientes apresentavam, respectivamente, os vermes *Enterobius vermicularis*, *Ancylostomideo* e *Schistosoma mansoni* e dois (8,4%) os protozoários *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica*. Dos vinte e nove pacientes do sexo feminino, vinte e um (72,4%) eram negativos ao EPF,

três (10,3%) positivos para *Ascaris lumbricoides*, um (3,45%) paciente apresentava *Enterobius vermicularis*, um (3,45%) *Ancylostomídeo* e três (10,4%) eram positivos para protozoários. Estes dados podem ser visualizados na Figura 12.

Figura 12 - Correlação entre a positividade ou negatividade do exame parasitológico de fezes com o sexo dos 53 pacientes.



Dos cinquenta e três pacientes do estudo, foi possível a realização da imunohistoquímica em vinte e cinco (47,2%), sendo sete (28%) co-infectados com helmintos, dezessete (68%) sem a co-infecção com helmintos ou protozoários, e um (4%) co-infectado por protozoário.

A distribuição dos vinte e cinco pacientes em relação ao sexo, idade, forma clínica, diagnóstico histopatológico de lesão cutânea, classificação operacional, resultado do exame parasitológico de fezes e o perfil imunohistoquímico pode ser observada na Tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição dos vinte e cinco pacientes segundo o sexo, idade, forma clínica da hanseníase, histopatologia das lesões cutâneas, classificação operacional, presença de helmintos e perfil imunohistoquímico.

ID	Sexo	Idade (anos)	Diag. Clínico	Histo-patologia	OMS	EPF	Frequência (%)					
							CD4	CD8	CD20	CD138	FOXP3	TIA1
1	F	65	CBC	MHT	PB	<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	90	10	15	10	90
2	M	40	MHV	MHV	MB	<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	95	5	100	15	90
3	M	20	MHT	MHT	PB	<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	98	2	0	0	100
4	M	69	MHDT	MHT	MB	<i>E. coli</i> e <i>E. histolytica</i>	<1	85	15	30	5	90
5	F	44	MHT	MHT	PB	<i>Enterobius vermicularis</i>	<1	95	5	10	5	90
6	M	77	MHT	MHT	MB	<i>Enterobius vermicularis</i>	5	75	20	5	8	90
7	F	55	MHDT	MHT	PB	<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	90	10	2	0	100
8	M	78	MHDV	MHDV	MB	<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	90	10	5	0	100
9	M	37	MHDT	MHDT	MB	Negativo	0	98	2	100	3	100
10	F	43	MHT	MHI	MB	Negativo	0	100	0	0	2	100
11	M	49	MHV	MHV	MB	Negativo	2	5	3	50	5	100
12	F	73	MHT	MHT	PB	Negativo	<1	98	2	0	3	100
13	F	29	MHV	MHV	MB	Negativo	0	90	10	0	5	85
14	F	66	MHDT	MHDT	MB	Negativo	0	100	0	0	10	100
15	M	26	MHDT	MHT	PB	Negativo	<1	90	10	0	5	90
16	F	66	MHT	MHT	PB	Negativo	<1	80	20	2	10	85
17	F	53	MHT	MHT	PB	Negativo	<1	98	2	0	9	95
18	F	42	MHT	MHT	PB	Negativo	3	80	17	0	13	90
19	F	57	MHV	MHV	MB	Negativo	0	97	3	100	4	100
20	F	37	MHT	MHI	PB	Negativo	<1	90	10	10	15	100
21	F	57	MHDT	MHDT	MB	Negativo	<1	100	0	0	3	90
22	M	57	MHV	MHV	MB	Negativo	0	95	5	5	0	100
23	F	67	MHDV	MHDV	MB	Negativo	0	70	30	5	0	80
24	M	27	MHDT	MHDT	MB	Negativo	0	100	0	0	0	90
25	F	25	MHDT	MHDT	MB	Negativo	0	75	25	5	0	100

Legenda: ID (Identificação); M (Masculino); F (Feminino); CBC (Carcinoma Basocelular); MHI (Hanseníase Indeterminada); MHT (Hanseníase Tuberculóide); MHDT (Hanseníase Dimorfo-Tuberculóide); MHDV (Hanseníase Dimorfo- Virchowiana); MHV (Hanseníase Virchowiana); OMS (Classificação Operacional da Organização Mundial de Saúde); PB (Paucibacilar); MB (Multibacilar); EPF (Exame Parasitológico de Fezes).

Dos vinte e cinco pacientes que foram analisados através da imunohistoquímica, observou-se predomínio de células T CD8⁺ no infiltrado inflamatório de todos os pacientes estudados, isto é, dos pacientes com hanseníase multibacilar co-infectados e não co-infectados com helmintos e dos casos paucibacilares com e sem a co-infecção, sem diferença estatística entre os grupos, sendo que, a maioria dessas células CD8⁺ apresentava o fenótipo de citotoxicidade (TIA-1⁺ CD8), atingindo aproximadamente 95% de todo o infiltrado celular, como pode ser visualizado nas Figuras 13 e 14.

Nota-se que no grupo dos pacientes paucibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos, a disposição das células CD8⁺ predominou ao redor do granuloma de células epitelióides (Figuras 14 A e B) enquanto que no grupo dos multibacilares co-infectados e não co-infectados essas células estiveram dispostas difusamente por todo o infiltrado inflamatório (Figura 14 C e D).

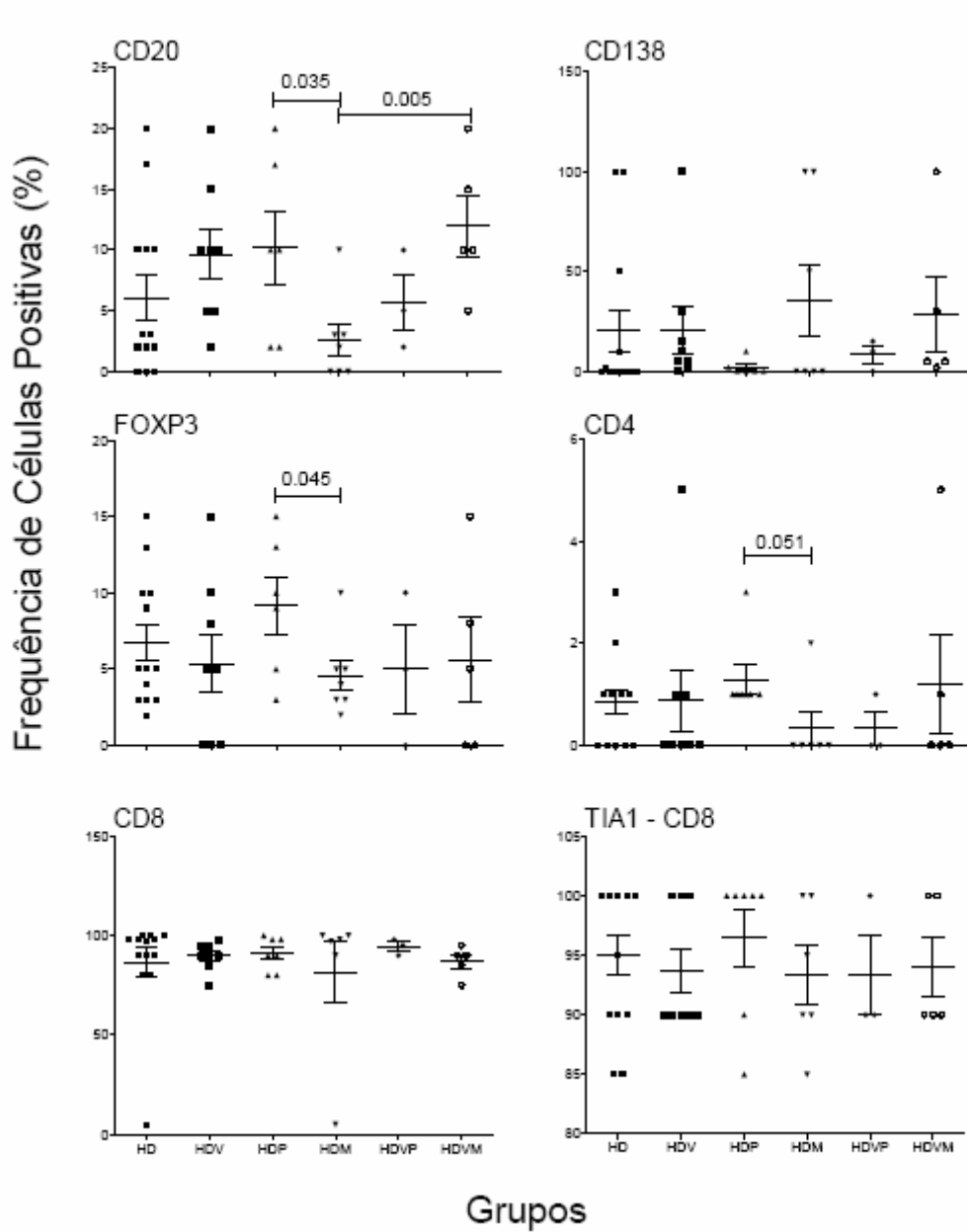
Em relação às células FOXP3⁺, marcadoras de células T reguladoras, observou-se predomínio no grupo dos pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares, com significância estatística ($p=0,045$). A disposição dessas células em relação aos grupos de pacientes avaliados pode ser visualizada na Figura 15.

As células CD20⁺, marcadoras de células da linhagem B, estiveram mais presentes no grupo de pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares, com significância estatística ($p=0,035$), e dentre os multibacilares, houve predomínio dessas células nos pacientes multibacilares co-infectados com helmintos em relação aos pacientes multibacilares não co-infectados ($p=0,005$). Observa-se que no grupo dos pacientes paucibacilares, as células CD20 estavam dispostas predominantes ao redor do granuloma e em maior frequência que no grupo multibacilar (Figura 16).

Constatou-se, também, ligeiro aumento de células CD4⁺ no grupo de pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares, sem significância estatística entre os grupos ($p=0,051$), e com baixa representação dessas células em todos os grupos de pacientes (Figura 13 e 17).

Níveis reduzidos de células CD138⁺ foram detectados no infiltrado celular dos pacientes não co-infectados e co-infectados tanto paucibacilares como multibacilares, sem diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 13).

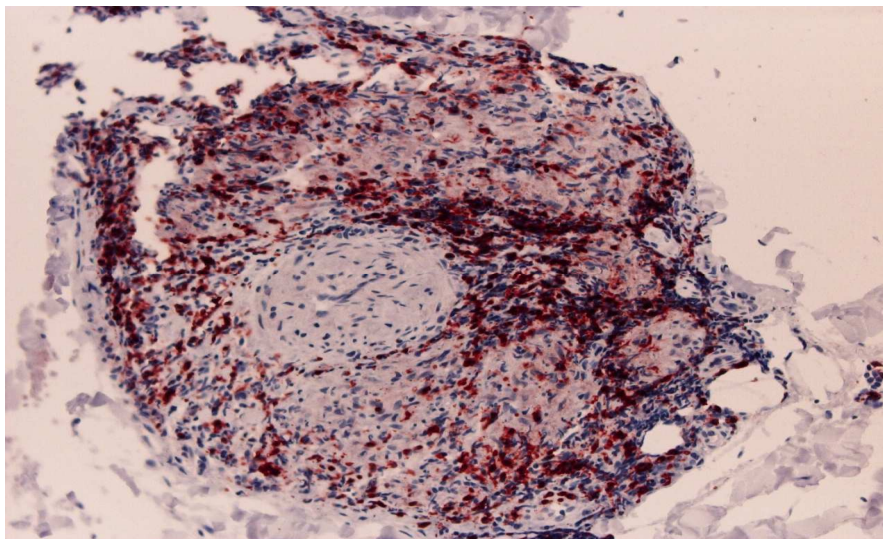
Figura 13 - Frequência de células com os marcadores CD4, CD8, CD20, CD138, FOXP3 e TIA-1CD8 em hansenianos paucibacilares e multibacilares com e sem co-infecção.



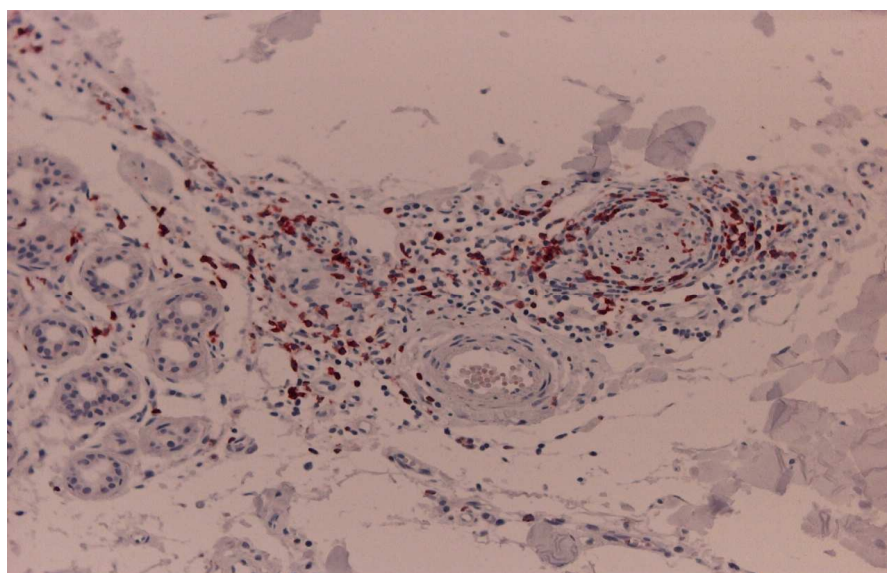
Legenda: HD - total de pacientes com hanseníase; HDV- pacientes com hanseníase co-infectados com vermes; HDP - pacientes paucibacilares não co-infectados; HDM - pacientes multibacilares não co-infectados; HDVP- pacientes paucibacilares co-infectados com vermes; HDVM - pacientes multibacilares co-infectados com vermes.

Figura 14- Marcação pela imuno-histoquímica de células T CD8⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.

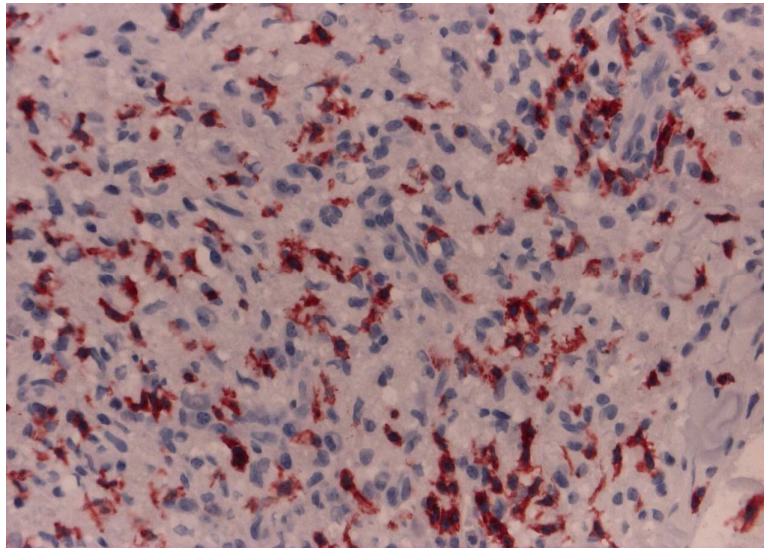
14.A- Lesão de paciente paucibacilar co-infectado



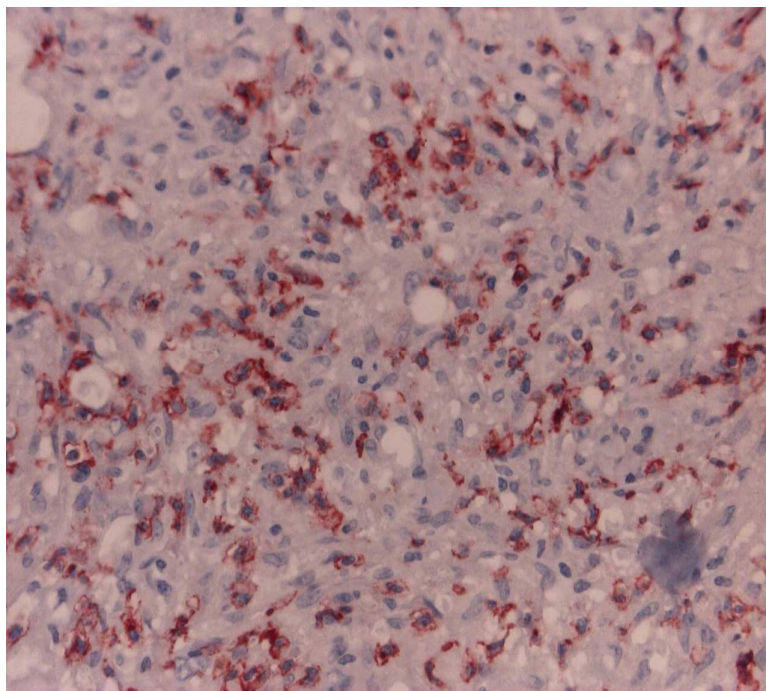
14.B- Lesão de paciente paucibacilar não co-infectado



14.C- Lesão de paciente multibacilar co-infectado



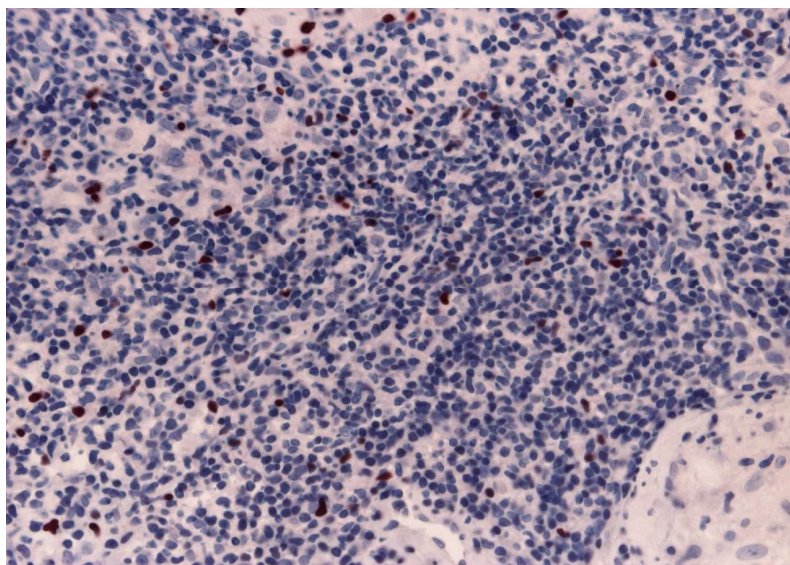
14.D- Lesão de paciente multibacilar não co-infectado



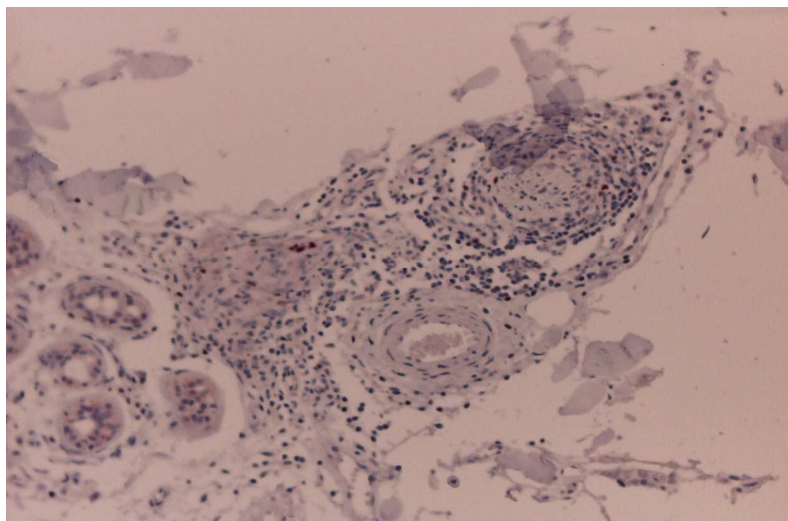
Legenda: 14.A e B- Imuno-histoquímica evidenciando a disposição de células T CD8⁺ no grupo de pacientes paucibacilares (PB) ao redor do granuloma de células epitelióides, tanto no grupo co-infectado (Figura 14.A) quanto no não co-infectado (Figura 14.B); 14.C e 14.D- Disposição aleatória de células T CD8⁺ no grupo de pacientes multibacilares (MB) no infiltrado inflamatório tanto no grupo co-infectado (Figura 14.C) quanto no não co-infectado (Figura 14.D).

Figura 15- Frequência de Células FOXP3⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.

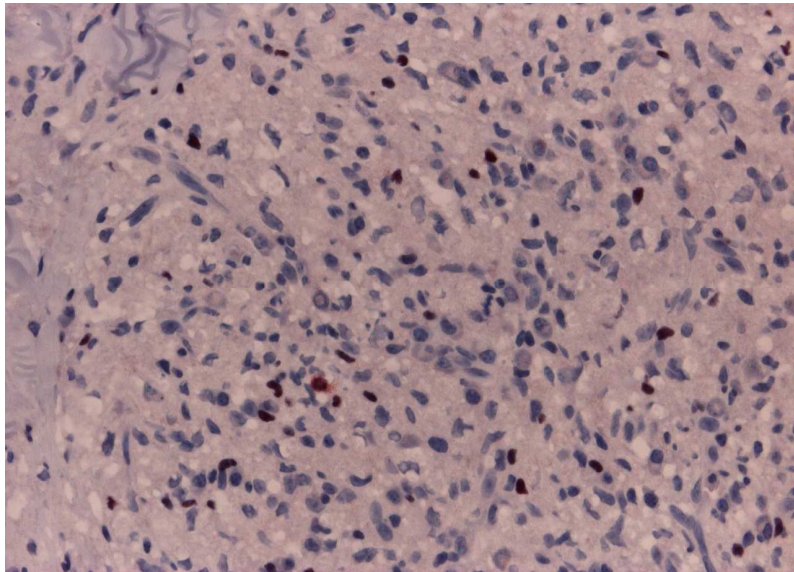
15.A- Lesão de paciente paucibacilar co-infectado



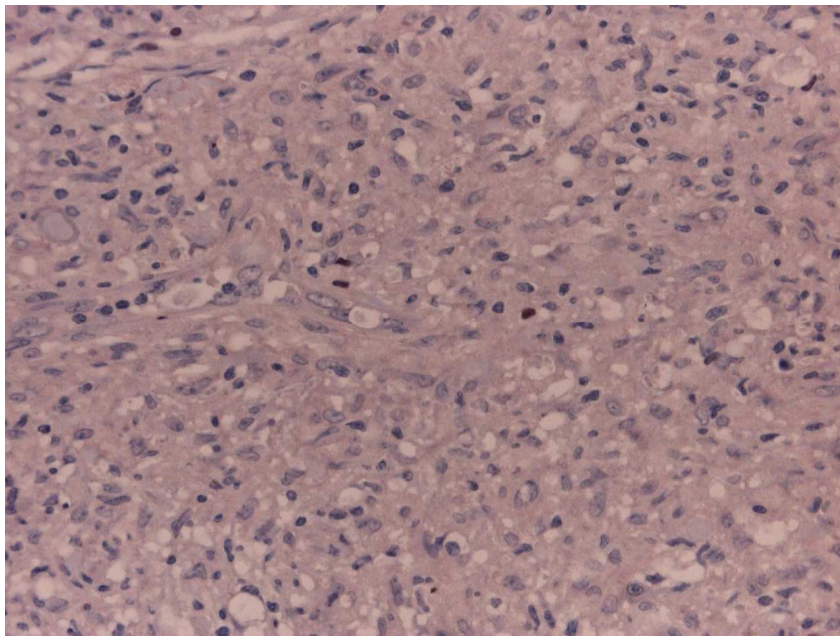
15.B- Lesão de paciente paucibacilar não co-infectado



15.C- Lesão de paciente multibacilar co-infectado



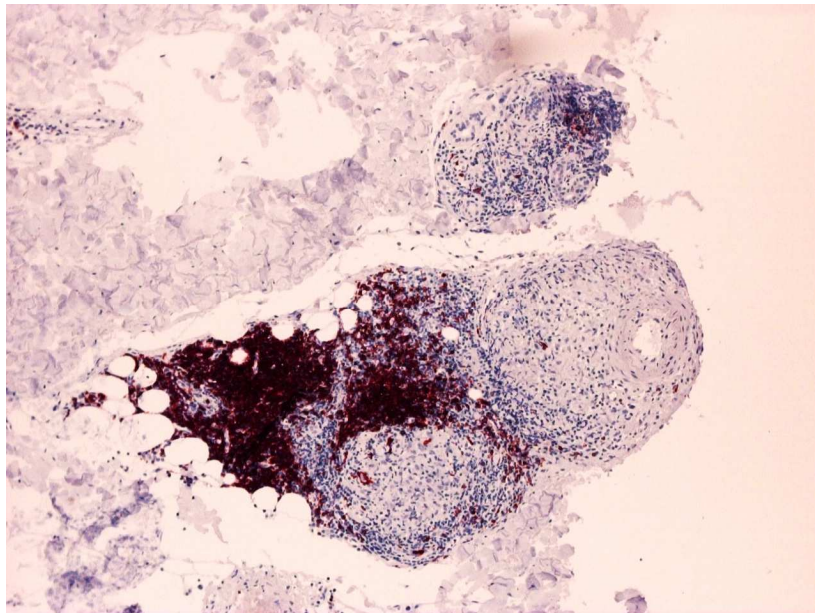
15.D- Lesão de paciente multibacilar não co-infectado



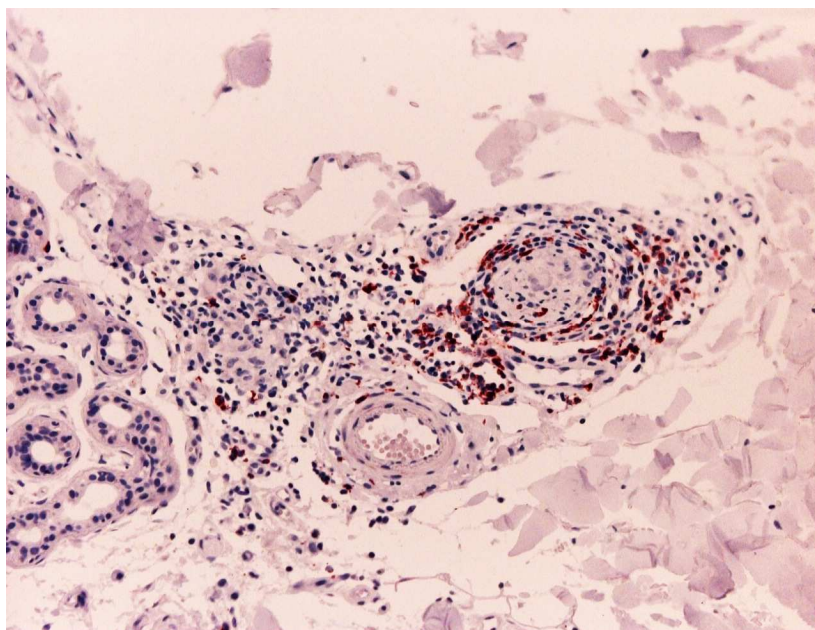
Legenda: 15.A e B- Imuno-histoquímica demonstrando a disposição de células FOXP3⁺ no grupo de pacientes paucibacilares (PB), ao redor e dentro do granuloma de células epitelióides, tanto no grupo co-infectado (Figura 15.A) quanto no não co-infectado (Figura 15.B); 15.C e 15.D- Disposição aleatória de células FOXP3⁺ no grupo de pacientes multibacilares (MB) no infiltrado inflamatório, tanto no grupo co-infectado (Figura 15.C) quanto no não co-infectado (Figura 15.D).

Figura 16- Frequência de Células CD20⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.

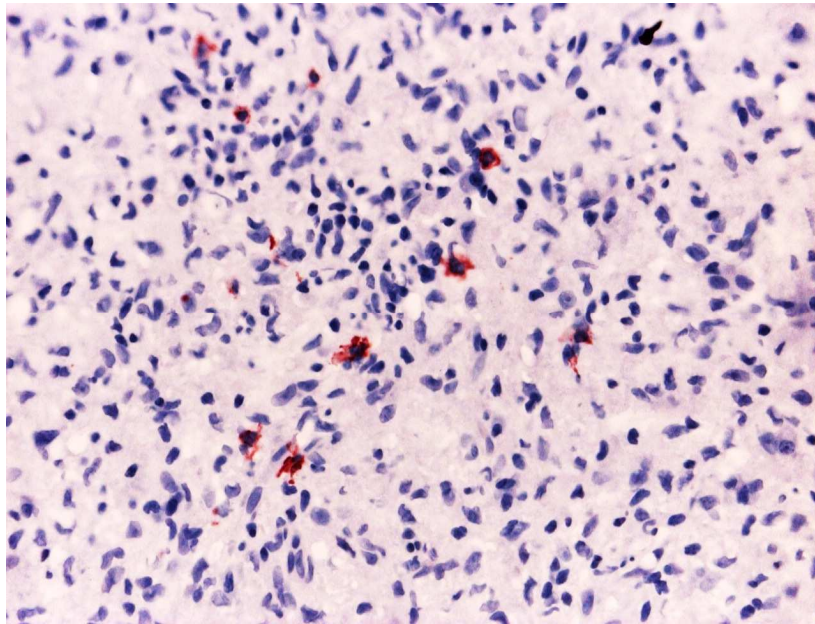
16.A- Lesão de paciente paucibacilar co-infectado



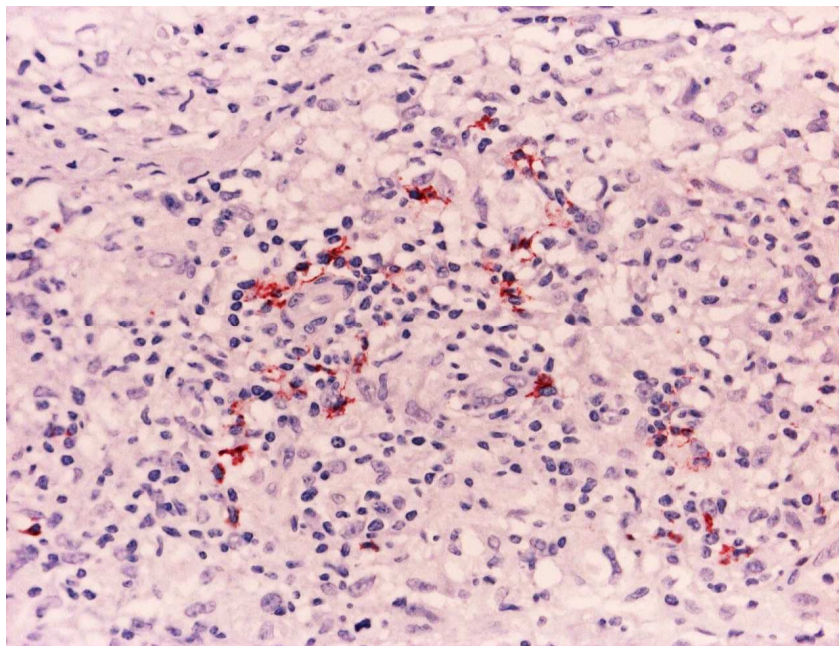
16.B- Lesão de paciente paucibacilar não co-infectado



16.C- Lesão de paciente multibacilar co-infectado



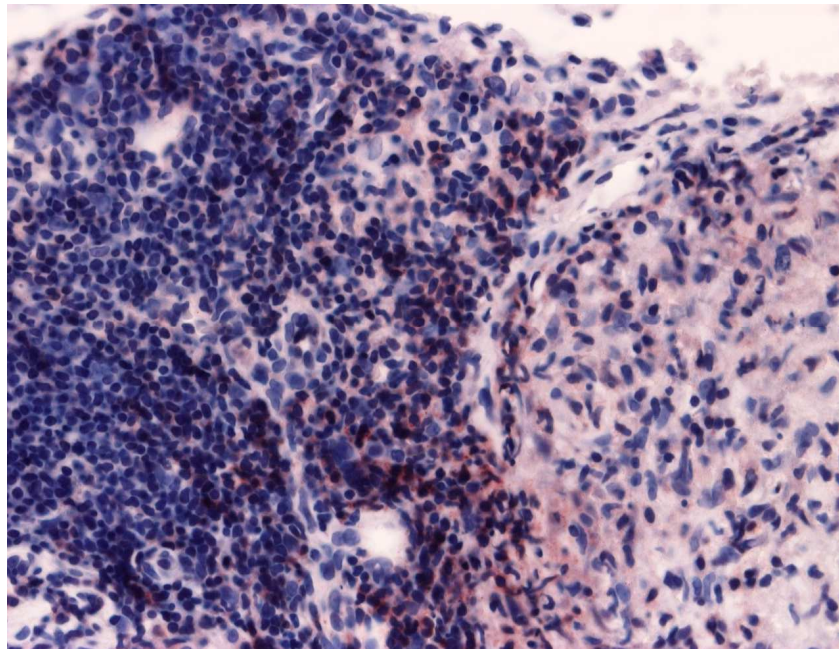
16.D- Lesão de paciente multibacilar não co-infectado



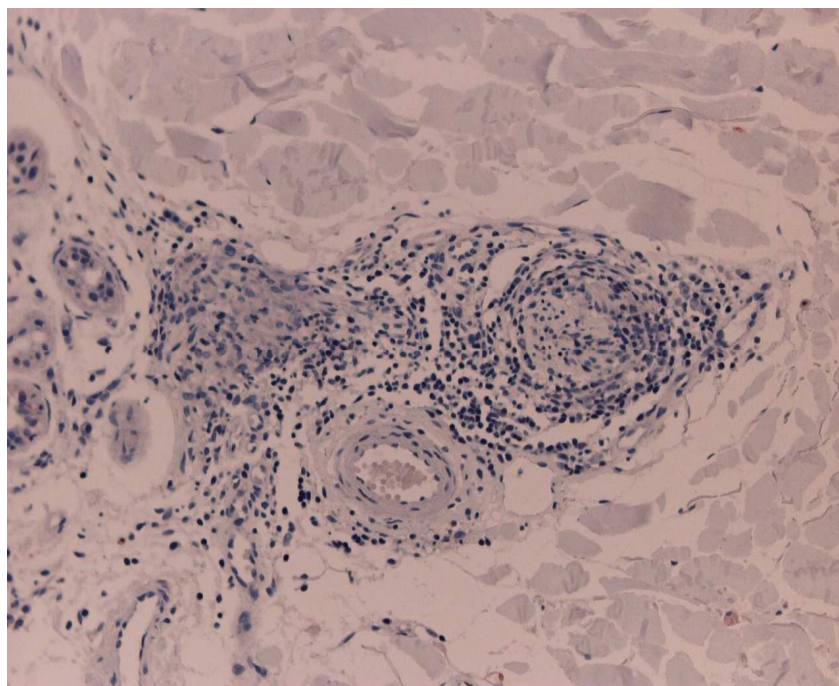
Legenda: 16.A e B- Imuno-histoquímica demonstrando a disposição de células CD20⁺ no grupo de pacientes paucibacilares (PB), ao redor do granuloma de células epitelióides, tanto no grupo co-infectado (Figura 16.A) quanto no não co-infectado (Figura 16.B); 16.C e 16.D- Menor marcação de positividade pela imuno-histoquímica de células CD20⁺, no grupo de pacientes multibacilares (MB) no infiltrado inflamatório, tanto no grupo co-infectado (Figura 16.C) quanto no não co-infectado, sendo maior nos primeiros (Figura 16.D).

Figura 17- Frequência de Células T CD4⁺ no grupo de pacientes paucibacilares e multibacilares co-infectados e não co-infectados com helmintos.

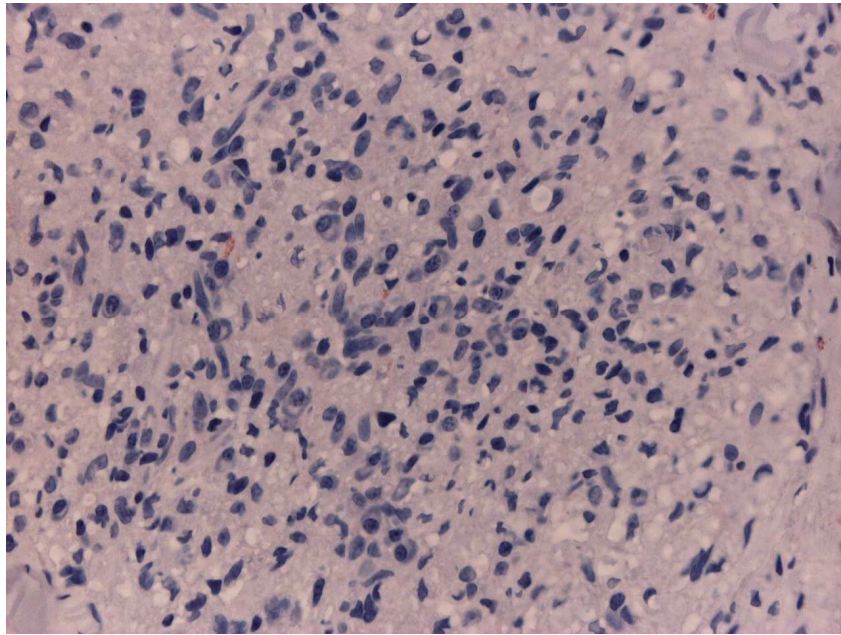
17.A- Lesão de paciente paucibacilar co-infectado



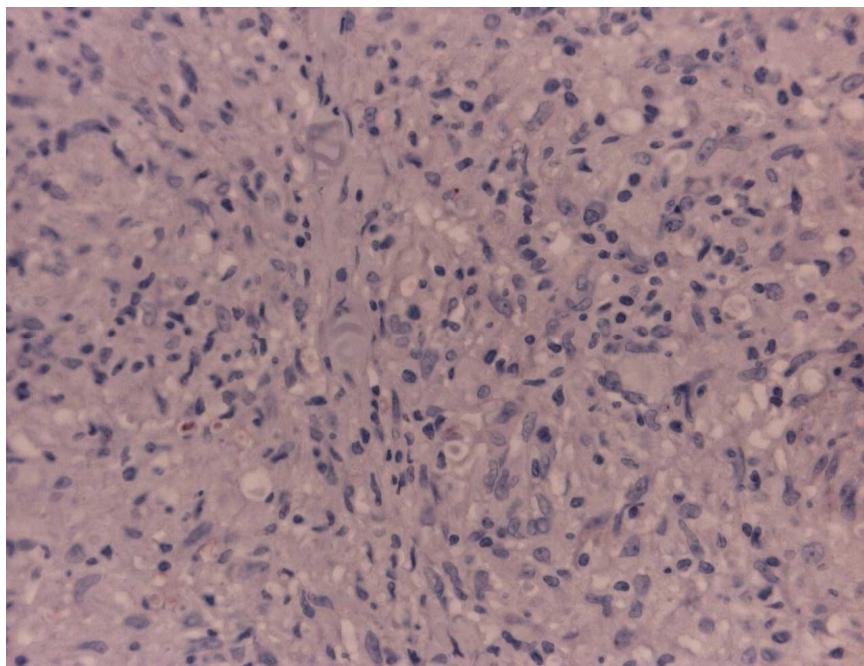
17.B- Lesão de paciente paucibacilar não co-infectado



17.C- Lesão de paciente multibacilar co-infectado



17.D- Lesão de paciente multibacilar não co-infectado



Legenda: 17.A, B, C e D- Imuno-histoquímica evidenciando baixa frequência de células T CD4⁺ no infiltrado inflamatório nos grupos de pacientes paucibacilares (PB) - Figura 17.A e 17.B e nos pacientes multibacilares (MB), tanto co-infectados (Figura 17.C) quanto nos não co-infectados (Figura 17.D), com predomínio dessas células no interior do granuloma de células epitelióides no grupo paucibacilar.

6.0 - DISCUSSÃO

A hanseníase, ainda determinante de grande impacto econômico em vários países em desenvolvimento, em especial no Brasil, apesar de raramente determinar o óbito, é considerada deformante, incapacitante e estigmatizante. Comporta-se como uma doença espectral, cujas manifestações clínicas são influenciadas e determinadas pelo tipo de direcionamento dos mecanismos efetores da resposta imune do hospedeiro (SCOLLARD e col., 2006).

Os dados do estudo foram obtidos de forma retrospectiva, por busca ativa de prontuários e de material biológico de pacientes com diagnóstico confirmatório de hanseníase, por isso, foram encontradas inúmeras dificuldades, tais como: prontuários extraviados, registros incompletos e/ou insuficientes dos pacientes e falta de resultados de exames. Assim como, houve prejuízo pela ausência de disponibilização do bloco de parafina de lesão cutânea do paciente com o diagnóstico de hanseníase no setor de Patologia do Hospital, quer seja pela perda de material, ou impossibilidade de análise pela técnica de imuno-histoquímica, pela deterioração do bloco de parafina e/ou biópsia de pele muito superficial. Todos estes fatos determinaram a exclusão de grande parcela de pacientes e evidenciaram a importância de se melhorar o sistema de registro e armazenamento de prontuários e de material biológico, e a necessidade de informatização dos dados dos pacientes, a fim de se evitar perdas e prejuízos importantes, tanto para o paciente quanto para a equipe de assistência.

Dos 53 pacientes do estudo, a mediana de idade encontrada foi de 43 anos, sendo a faixa etária mais acometida entre 30 e 59 anos (43,3%), compatível com os dados do SINAN do Ministério da Saúde de 2009, que detectou como mais frequente a faixa etária entre 30 e 59 anos (52,4%) e corrobora os dados da literatura, como evidenciado nos estudos de Aquino e colaboradores (2003) e de Hinrichsen e

colaboradores (2004), que encontraram as faixas etárias de maior frequência da hanseníase entre 14 e 44 anos (63,3%) e 35 e 64 anos (39%), respectivamente. O longo período de incubação para a manifestação da doença determina o aparecimento da hanseníase em faixas etárias como as encontradas no estudo (TALHARI e col., 2006).

Houve ligeiro predomínio do sexo feminino em relação ao masculino, sendo que os dados representaram os pacientes de um estudo retrospectivo, com muitas exclusões, não refletindo a totalidade dos casos com hanseníase que procuram à assistência médica no Estado do Espírito Santo. No Brasil, 55,2% dos casos de hanseníase aparecem no sexo masculino e 44,8% no sexo feminino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Nos estudos de Bakker e colaboradores (2002) e de Lima e colaboradores (2010), não houve diferença significativa entre homens e mulheres, já Lana e colaboradores (2000) encontraram 55,3% de casos de hanseníase no sexo feminino.

Os casos paucibacilares predominaram no estudo, embora não refletissem os dados totais do período, devido às exclusões. No Espírito Santo, os casos paucibacilares têm sido mais frequentes, demonstrando a tendência ao diagnóstico mais precoce da doença, graças à maior divulgação sobre a hanseníase nos meios de comunicação ou devido às campanhas realizadas pelo Ministério da Saúde, Estado e Municípios e a busca ativa pelas equipes de saúde da família, caracterizando o declínio da doença. No Espírito Santo em 2009, os casos paucibacilares foram 56,5% e os multibacilares 43,4% do total dos casos de hanseníase (SINAN, 2009). Segundo o Boletim Epidemiológico da Organização Mundial de Saúde de setembro de 2011 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011), a porcentagem de casos multibacilares entre os novos casos de hanseníase no Brasil era de 40,88%, sendo muito variáveis as frequências entre os casos paucibacilares e os casos multibacilares nas diversas regiões brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portal Saúde/Gov.)

Dentre os pacientes paucibacilares, observou-se predomínio do sexo feminino e dentre os multibacilares o sexo masculino foi, com significância estatística, o mais acometido, corroborando com as notificações brasileiras, onde os hansenianos do sexo feminino com a forma indeterminada e tuberculóide representaram 56,4% e 55,4% respectivamente, e 60,3% dos pacientes com as formas dimorfa e 73% dos virchowianos eram do sexo masculino (SINAN, 2009).

Os estudos de Hinrichsen e colaboradores (2004) e Lima e colaboradores (2010) evidenciaram o predomínio dos casos multibacilares no sexo masculino e dos paucibacilares no feminino. Vásquez e colaboradores em 2008 realizaram um estudo descritivo em Coari (Amazonas) com análise dos casos de hanseníase no período de 1997 a 2006 e encontraram 226 casos, sendo 160 (70,8%) no sexo masculino e 144 (63,7%) eram multibacilares. Longo & Cunha (2006) num estudo entre 1994 e 2005 no Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul encontraram 192 casos de hanseníase, sendo 62,5% no sexo masculino, dos quais 101 eram multibacilares. Miranzi e colaboradores (2010) num estudo entre 2000 e 2006, no Município de Uberaba (Minas Gerais) de um total de 455 casos, encontraram 252 (55,4%) no sexo masculino e 69,1% tinham a hanseníase dimorfa. Já Campos e colaboradores (2005) num estudo em Sobral (Ceará) entre 1997 e 2003, onde foram notificados 1305 casos, 661 (50,3%) eram do sexo feminino, inclusive com aumento importante do coeficiente de detecção nas mulheres em 2003.

A razão para as formas mais graves serem mais frequentes entre os pacientes masculinos pode estar relacionada à maior susceptibilidade dos homens às infecções, uma vez que os andrógenos diminuem a competência imunológica, diferindo dos estrógenos que aumentam tanto a resposta imune celular quanto a humoral (KLEIN,

2000), além dos fatores comportamentais, que podem influenciar na demora a procura de assistência médica, determinando o diagnóstico tardio da doença.

Em relação ao diagnóstico clínico, constatou-se que a forma indeterminada não foi aventada em nenhum momento, e em três casos, o primeiro pensamento era de vasculite, granuloma anular e carcinoma basocelular, no entanto, eram de hanseníase virchowiana e tuberculóide, reforçando a importância do estudo histopatológico no auxílio do diagnóstico clínico, quando a lesão cutânea deixa dúvidas diagnósticas.

A concordância entre os diagnósticos clínicos e histopatológicos foi boa no estudo (*Kappa* igual a 0,61), sendo mais elevada nas formas tuberculóide e virchowiana, e menor para a forma clínica dimorfa-tuberculóide, imunologicamente instável. As formas polares determinam lesões mais características, facilitando o diagnóstico clínico, já as formas instáveis podem gerar muitas dúvidas no diagnóstico.

Deve ser lembrado que o estudo histopatológico se baseia em critérios patológicos de um pequeno fragmento de uma área da lesão cutânea, não refletindo o total da lesão, justificando as discordâncias clínico-histológicas. Bhatia e colaboradores (1993) encontraram concordância de 69% entre o diagnóstico clínico de hanseníase e os achados do exame histopatológico de fragmentos de pele, Kalla e colaboradores (2000) de 64,5% e Khan e colaboradores (2004) de 66%.

O tratamento com a poliquimioterapia não foi compatível nem com a classificação operacional e nem baseada nos critérios clínico-histopatológicos, havendo predomínio do emprego do tratamento multibacilar. As causas que provavelmente explicam a maioria dos pacientes terem recebido tratamento com a poliquimioterapia multibacilar são: a) receio de profissionais em tratar um caso paucibacilar com a PQT/PB e não haver cura medicamentosa; b) presença de mais de cinco lesões cutâneas em um paciente com características clínicas e histopatológicas de caso paucibacilar, que

baseado nos critérios diagnósticos de hanseníase do Ministério da Saúde (2000), deve ser tratado como multibacilar; c) baciloscopia positiva no raspado dérmico em um caso diagnosticado como paucibacilar pela histopatologia, direcionando o tratamento para multibacilar. Essas duas últimas justificativas não puderam ser averiguadas, por falta de registro tanto do número de lesões cutâneas quanto da baciloscopia de raspado dérmico em grande parte dos prontuários avaliados.

No estudo, apesar do pequeno número de pacientes (53) incluídos na análise dos dados, uma porcentagem considerada elevada (30,2%) apresentava ao exame parasitológico de fezes os helmintos intestinais. Isto evidenciou a precariedade das condições de saneamento básico e de higiene pessoal e a necessidade de melhoria das condições sócio-econômicas e medidas mais sérias no controle da qualidade dos alimentos e água nos restaurantes, bares, lanchonetes, escolas, etc. As infecções helmínticas são muito frequentes em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, devido a pouca ou nenhuma infra-estrutura sanitária, favorecendo a maior exposição e conseqüentemente, maior contaminação do solo, água e alimentos pelos ovos e larvas infectantes dos parasitas (PENNA e col., 1999; CHIEFFI e col., 2003).

Dentre os pacientes com positividade para os nematóides intestinais, o mais frequente helminto detectado foi o *Ascaris lumbricoides*, corroborando os dados da literatura, que demonstraram que esse nematóide está entre os helmintos intestinais mais prevalentes em seres humanos (STEPHENSON e col., 1990; FERREIRA e col., 1991, TRISTÃO-SÁ e col., 2001; DINIZ e col., 2001; CARVALHO e col., 2002).

O sexo masculino foi o mais acometido por helmintos, embora sem diferença estatística entre os grupos. Os dados de um levantamento parasitológico realizado no Estado de Minas Gerais por Carvalho e colaboradores (2002), demonstraram que dentre os 18,1% dos escolares parasitados, 52,6% eram do sexo masculino.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a presença de helmintos e a forma clínica da doença, talvez pelo limitado número de pacientes arrolados. Houve predomínio dos casos multibacilares nos pacientes co-infectados pelos helmintos, embora sem diferença entre os grupos, sugerindo a possível influência de verminoses intestinais no direcionamento da resposta imunológica e na determinação da forma clínica de hanseníase.

Diniz e colaboradores (2001) evidenciaram um aumento significativo na frequência de infecções helmínticas em pacientes com hanseníase multibacilar quando comparados aos paucibacilares e ao grupo controle (sem hanseníase). Hewitson e colaboradores (2009) descreveram a interferência dos helmintos intestinais no sistema imune do hospedeiro e Everts e colaboradores (2010) reforçaram o papel dos helmintos na indução da resposta imune Th2 e T reguladora.

O estudo, apesar do número limitado de pacientes que puderam ser submetidos ao exame imuno-histoquímico, demonstrou, embora sem significância estatística, predomínio de células T CD8⁺ no infiltrado inflamatório de todos os grupos de pacientes analisados (pacientes paucibacilares co-infectados ou não pelos helmintos e pacientes multibacilares co-infectados ou não pelos helmintos), o que sugere a importância dessas células na formação e organização da resposta imunológica contra o *Mycobacterium leprae*.

Estes achados discordam dos dados obtidos por Gonzalez e colaboradores (1999), que demonstraram que no grupo virchowiano as células mais conspícuas foram os macrófagos, seguidos pelos linfócitos, sendo a subpopulação T CD8⁺ mais frequente que a T CD4⁺; no grupo dimorfo-tuberculóide as células T eram predominantes, com as CD4⁺ discretamente mais frequentes que as CD8⁺, seguidas dos macrófagos; e no grupo tuberculóide as células T também predominavam, mas com a maior proporção das T

CD4⁺; porém corroboraram o estudo imuno-histoquímico conduzido por Massone e colaboradores (2011) com a finalidade de investigar a interação entre o *Mycobacterium leprae* e a infecção pelo HIV, que evidenciaram predomínio de células T CD8⁺ em pacientes com hanseníase co-infectados com HIV, na frequência de 99,4% no infiltrado inflamatório.

Das células T CD8⁺ do infiltrado linfocítico das lesões cutâneas dos pacientes estudados, a maioria apresentava o marcador de citotoxicidade (TIA-1), não diferindo dentre todos os grupos de pacientes analisados, semelhante aos achados de Massone e colaboradores (2011), que identificaram a presença desse marcador em mais de 75% das células T CD8⁺.

Em relação à frequência de células T CD4⁺ do infiltrado linfocítico dos pacientes do estudo, houve ligeiro predomínio no grupo paucibacilar em relação ao multibacilar, assim como descrito nos estudos de Gonzalez e colaboradores (1999) e Iyer e colaboradores (2007).

Iyer e colaboradores (2007) detectaram 70 a 80% de células T no infiltrado celular de pacientes borderleine-tuberculóides, com maior proporção de CD4⁺, enquanto que nos pacientes borderleine-virchowianos e virchowianos a concentração de células T foi moderada, sendo a relação CD4: CD8 de 0,6:1-0,3:1, respectivamente.

Demonstrou-se, com significância estatística, predomínio do marcador FOXP3 nas lesões dos hansenianos paucibacilares não co-infectados em relação aos multibacilares não co-infectados, sugerindo, provavelmente a importância dessas células no controle do foco inflamatório, sobretudo, nos casos em que a resposta imune celular tende a estar exacerbada (TAFLIN e col., 2009).

Massone e colaboradores (2009) evidenciaram que células FOXP3⁺ se distribuem dentro e ao redor dos granulomas nas formas clínicas TT e BT,

diferenciando das formas BL e LL, que se dispõem difusamente no infiltrado celular. Esses autores notaram que a distribuição dessas células não estava relacionada com estruturas granulomatosas ou localização especial, não evidenciando diferenças estatísticas na expressão de FOXP3⁺ entre os grupos TT, BT, BL e LL, enquanto que significativo aumento foi observado naqueles pacientes em reação reversa.

Houve predomínio de células CD20⁺ nos hansenianos paucibacilares em relação aos multibacilares e entre os pacientes multibacilares houve maior distribuição de células com o marcador CD20⁺ nos co-infectados com vermes, sugerindo que a co-infecção é capaz de interferir no sistema imunológico, desviando-o para o polo humoral (Th2).

A possível justificativa para o predomínio de células CD20⁺ no grupo de pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares é a importância crucial dessas células no controle da resposta imune do hospedeiro, na tentativa de reduzir o dano tecidual resultante da resposta vigorosa ao *M. leprae* e para a contenção bacteriana na formação e desenvolvimento do granuloma (IYER e col., 2007).

No estudo de Iyer e colaboradores (2007), células CD20⁺ predominaram nos grupos em que há exacerbação do sistema imune para Th2, como nos borderline-virchowianos e nos virchowianos, enquanto que nos dimorfo-tuberculóides a presença dessa célula foi esporádica.

Níveis indetectáveis de CD138⁺ (marcador de plasmócitos) foram observados no infiltrado celular de todos os hansenianos, tanto nos co-infectados, como nos sem infecção pelos helmintos, assim como, entre os casos paucibacilares e multibacilares sem helmintos intestinais e co-infectados, discordando do estudo conduzido por Iyer e colaboradores (2007), que evidenciaram através da análise imuno-histoquímica de lesões cutâneas de hansenianos, moderada positividade de células CD79 e CD138 no

infiltrado celular dos pacientes dimorfo-virchowianos e nos virchowianos, enquanto que nos dimorfo-tuberculóides a positividade ou a negatividade foi esporádica e sem significância estatística.

Portanto, nossos achados sugerem, apesar do número limitado de pacientes, que a realização de rotina de exames parasitológicos de fezes e o tratamento anti-helmíntico, quando necessário, nos pacientes com hanseníase, portadores de helmintos, possam contribuir para uma melhor evolução da doença, além de poder interferir na cadeia epidemiológica de transmissão do *Mycobacterium leprae*.

7.0 – CONCLUSÃO

O estudo, apesar do número limitado de pacientes arrolados, evidenciou o predomínio de pacientes paucibacilares no sexo feminino e multibacilares no sexo masculino, com significância estatística.

Houve elevada porcentagem de pacientes com hanseníase co-infectados com helmintos intestinais, com maior destaque para o *Ascaris lumbricoides*, sugerindo a precariedade ainda existente das condições de saneamento básico e de educação sanitária, com a necessidade de maior conscientização de higiene e de melhoria nas condições sócio-econômicas da população e de infra-estrutura das cidades.

Além disso, observou-se ligeiro predomínio de exames parasitológicos de fezes positivo para helmintos no sexo masculino e dos casos multibacilares da hanseníase no grupo de pacientes co-infectados com vermes, embora sem significância estatística.

O estudo imuno-histoquímico através dos marcadores CD4⁺, CD8⁺, TIA-1⁺, FOXP3⁺, CD138⁺ e CD20⁺ nas lesões clínicas da hanseníase constatou que não somente as células T helper desempenham papel importante na formação do granuloma e no infiltrado inflamatório contra o *Mycobacterium leprae*, como também outras células, tais como as reguladoras e as da linhagem B.

Portanto, dados obtidos na condução do estudo sugeriram que as infecções pelos helmintos intestinais determinam alterações no sistema imunológico, porém estudos prospectivos, com maior número de casos, se fazem necessários para que se possa conhecer ainda mais sobre o impacto das infecções helmínticas nas situações de co-infecção, como na hanseníase.

8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abulafia J, Vignale RA. Leprosy: accessory immune system as effector of infectious, metabolic and immunobiologic reactions. *International Journal of Dermatology*. 2001;40:673-87.

Almeida, A.M. Concentração sérica de citocinas no espectro das formas clínicas da hanseníase. Ribeirão Preto, 1996. 86p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Andrade VLG, Sabroza PC, Araújo JG. A descentralização das atividades e a delegação das responsabilidades pela eliminação da hanseníase ao nível municipal. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. 2000;8:47-51.

Aquino DMC, Caldas AJM, Silva AAM, Costa JML. Profile of leprosy patients in a hyperendemic area of Amazonian Maranhão, Brazil. *Revista Brasileira Medicina Tropical*. 2003;36:57-64.

Bathia AS, Katoch K, Narayanan RB, Ramu G, Mukherju A, Lavania RK. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. *International Journal Leprosy Other Mycobacterial Disease*. 1993;61:433-38.

Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, et al. Epidemiology of leprosy on five isolated islands in the Flores Sea, Indonesia. *Tropical Medicine International Health*. 2002;7:780-7.

Bentwich Z, Weisman Z, Moroz C, Bar-Yehuda S, Kalinkovich A. Immune dysregulation in Ethiopian immigrants to Israel: relevance to helminth infections? *Clinical & Experimental Immunology*. 1996;103:239-43.

Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z, Borkov G, Beyers N. Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? *Immunology Today*. 1999;20:485-87.

Bologna JL, Jorizzon JL, Rapini RP e col. *Dermatologia*. Rio de Janeiro. Brasil. Tradução da 2ª edição. 2011;1107-13pp.

Borkow G, Leng Q, Weisman Z, Stein M, Galai N, Kalinkovich A, Bentwich Z. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;106:1053-60.

Campos SSL, Ramos JRAN, Kerr-Pontes LRS, Heukelbach J. Epidemiologia da hanseníase no Município de Sobral, Estado do Ceará-Brasil, no Período de 1997 a 2003. *Hansenologia Internationalis*. 2005; 30:167-73.

Carvalho OS, Guerra HL, Campos YR, Caldeira RL, Massara CL. Prevalência de helmintos intestinais em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*. 2002;35:597-600.

Chieffi PP, Neto VA. Vermes, verminoses e a Saúde Pública. *Ciência e Cultura*. 2003;55:41-3.

Congress, Madrid. Classification. Technical Resolutions. VIth International Congress Leprol. Madrid. International Journal of Leprosy. 1953;21:504-16.

Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2003;111:995-1000.

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

Diniz LM, Zandonade E, Dietze R, Pereira FEL, Rodrigues RR. Short report: Do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary Leprosy? The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001;65:852-54.

Diniz LM, Magalhães EFL, Pereira FEL, Rodrigues RR. Presence of intestinal helminths decreases T helper type 1 responses in tuberculoid leprosy patients and may increase the risk for multi-bacillary leprosy. British Society for Immunology Clinical & Experimental Immunology. 2010;161:142-50.

D. Van der Kley E, Latz JF, Browers YC, Kruize M, Schmitz EA, Kurt-Jones T, Espevit EC et al. A novel host-parasite lipid cross-talk Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like-receptor 2 and affects immune polarization. The Journal of Biological Chemistry. 2002;48122-29.

Everts BE, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M. Helminths and dendritic cells: Sensing and regulating via pattern recognizing receptors, Th2 and Treg responses. *European Journal of Immunology*. 2010;40:1525-37.

Ferreira CS, Ferreira MV, Nogueira MR. Prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides* em amostra populacional urbana (São Paulo, SP). *Cadernos de Saúde Pública*. 1991;7:82-9.

Fleury RN. Recidivas em hanseníase. *Hansenologia Internationales*. 2006;31:5-6.

Foss NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1999;74:113-9.

Gallo MEN, Júnior LANR, Albuquerque ECA, Nery JAC, Salles AM. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames basiloscópicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2003;78:415-24.

Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Oliveira RC. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunology*. 2002;24:499-509.

Gimenez MF, Gigli I, Tausk FA. Differential expression of Langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. *British Journal of Dermatology*. 1989;121:19-26.

Gonzalez ACO, Silva TC, Barbosa Jr. AA, Sadigursky M. Immunohistologic appraisal of infiltrating cells in skin biopsies from young patients clinically suspected of having various forms of leprosy. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1999;74:365-71.

Goulard IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical. 2002;35:365-75.

Haldar B, Mundle M, Bhadra UK, Saha B. Role of paucibacillary leprosy in the transmission of disease. Indian Journal of Leprosy. 2001;73:11- 5.

Harvell JD, Nowfar-Rad M, Sundram U. An immunohistochemical study of CD4, CD8, TIA-1 and CD56 subsets in inflammatory skin disease. Journal of Cutaneous Patology. 2003;30:108-113.

Helmbly H. Helminths and our immune system: Friend or foe? Parasitology International 2009;58:121-7.

Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminths immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. Molecular and Biochemical Parasitology. 2009;167:1-11.

Hinrichsen SL, Pinheiro MRS, Jucá MB, Rolim H, Danda GJN, Danda DMR. Aspectos epidemiológicos da hanseníase na cidade de Recife, PE em 2002. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2004;79:413-21.

Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S, et al. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. Molecular Cell. 2005;19:475-84.

Iyer AM, Mohanty KK, Van Egmond D, Katoch K, Faber WR, e col. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. *Human Pathology*. 2007;38:1065-73.

Kalla G, Salodkar A, Kachhawa D. Clinical and histopathological correlation in leprosy. *International Journal Leprosy Other Mycobacterial Disease*. 2000;68:184-5.

Khan A, Koranne RV, Bajoy P, Ravi B. Clinico-histopathological correlation of skin and nerve in leprosy. *Journal Dermatology*. 2004;31:632-6.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Koby*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed. 2008, 344-7, 609-22pp.

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. 1. Report of lepromatoid leprosy in an experimental infected armadillo. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriae Diseases*. 1971;39:693-702.

Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 2000;24:627-38.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S et al. Activation and regulation of toll like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Medicine*. 2003;9:525-32.

Lana FCF, Lima RF, Araujo MG et al. Situação epidemiológica da hanseníase no município de Belo Horizonte/ MG- Período 92/97. Hansen International. 2000;25:121-32.

Leininger JR, Donham KJ, Meyers WM. Leprosy in a chimpanzee. Post mortem lesions. International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriae Diseases. 1980;48:414-21.

Lima HMN, Sauaia N, Costa VRL, Neto GTC, Figueiredo PMS. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase atendidos em Centro de Saúde em São Luis, MA. Revista Brasileira de Clínica Médica. 2010;8:323-7.

Longo JOM, Cunha RV. Perfil clínico-epidemiológico dos casos de hanseníase atendidos no hospital universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, de janeiro de 1994 a julho de 2005. Hansen International. 2006;31:9-14.

Ludwig MK, Frei F, Alvares Filho A, Ribeiro-Paes JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical. 1999;32:547-55.

Machado PRL, Carvalho L, Araujo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. Anais Brasileiros Dermatologia. 2004;79:647-64.

Maeda SM, Rotta O, Michalany NS, Camargo ZP, Sunderkotter C, Tomimori-Yamashita J. Comparison between anti-PGL-1 serology and Mitsuda reaction: clinical reading, microscopic finds and immunohistochemical analysis. Leprosy Review. 2003;74:263-74.

Massone C, Nunzi E, Rodrigues RR, Talhari C, Talhari S, Schettini APM, Parente JNT, Brunasso AMG, Puntoni M, Clapasson A, Noto S, Cerroni L. T Regulatory Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells in Hansen Disease: A New Insight Into Pathogenesis? The American Journal of Dermatopathology. 2010;32:251-6.

Massone C, Talhari C, Talhari S, Brunasso AMG, Campbell TM, Curcic L, Rodrigues RR. Immunophenotype of skin lymphocytic infiltrate in patients co-infected with *Mycobacterium leprae* and Human Immunodeficiency Virus: a scenario dependent on CD8 and CD20 cells. British Journal of Dermatology. 2011;165:321-8.

Miceli MC, Parnes JR. Role of CD8 in T cell activation and differentiation. Advances in Immunology. 1993;53:59-122.

Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área técnica de Dermatologia Sanitária. Legislação sobre o controle da hanseníase no Brasil. Brasília, p.48, 2000.

Ministério da Saúde. Diário Oficial da União. Ano CXLVI 59, Portaria 125/SVS-SAS, Brasília, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de procedimentos técnicos para baciloscopia em hanseníase, Brasília, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2010, 51pp.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Bolso. Doenças infecciosas e parasitárias. Brasília, 2010.

Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos Notificáveis/ SVS-MS. Dados disponíveis na internet: [HTTP// portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf).

Miranzi SSC, Pereira LHM, Nunes AA. Perfil epidemiológico da hanseníase em um município brasileiro, no período de 2000 a 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43:62-7.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1983;8:182-89.

Montresor A, Engels D, Savioli L, et al. Soil-Transmitted Helminthic Infections:Updating the Global Picture. Disease Control Priorities Project. Working Paper No.12; July 2003 World Health Organization, CH-1211 Geneva 27, Switzerland.

Moreau E, Chauvin. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;1-9.

Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *British Journal of Dermatology*. 2007;157:273-83.

Mulcahy G, Neill SO, Donnelly S, Dalton JP. Helminths at mucosal barriers- interaction with the immune system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;853-68.

Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7.ed. Porto Alegre: Artmed. 2010, 30-34 e 133-136pp.

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. 2008;33:293-300.

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. 2009;33:333-40.

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. Leprosy update. 2011;36:389-400. Dados disponíveis na internet: [HTTP//WWW.who.int/en](http://WWW.who.int/en)

Penna GO, Teixeira MG, Pereira SM. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle*. 1ª ed. Brasília. Brasil. 1999, 218pp.

Prost A, Nebout M, Rougemont A. Lepromatous leprosy and onchocerciasis. *British Medical Journal*. 1979;1:589-90.

Quaresma JAS, Oliveira MFAO, Guimarães ACR, Brito EB, Brito RB, Pagliari C e al. CD1 a and Factor XIIIa Immunohistochemistry in Leprosy: A Possible Role of Cells in

Pathogenesis of *Mycobacterium leprae* Infection. The American Journal of Dermatopathology. 2009;31:527-31.

Rabello FE. A clinico-epidemiological classification of the forms of leprosy. International Journal of Leprosy. 1937;6:343-56.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 507-688.

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

Ribeiro-Rodrigues R, Hirsch CS, Boom WH, et al. A role for CD4⁺CD25⁺T-cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. 2006;144:25-34.

Rojas-Espinosa O, Jimnez-Zamudio L, Arce-Paredes P. Sequential activation of cellular and humoral immunity in leprosy: considerations based on recent findings. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 1994;36:213-19.

Santra A, Bhattacharya T, Chowdhury A, Ghosh A, Ghosh N, Chatterjee BP, Mazumder DNG. Serodiagnosis of ascariasis with specific IgG4 antibody and its use in an epidemiological study. Transactions of the Royal of the Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001;95:289-92.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clinical Microbiology Reviews. 2006;338-81.

Secretaria de Estado da Saúde. Programa Estadual de Controle da Hanseníase. Hanseníase - dados epidemiológicos 2008. Espírito Santo: Superintendência de Planejamento Epidemiologia e Informação.

Shimoji Y, NGV, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proceedings of National Academy of Sciences. 1999;96:9857-62.

Silva CG, Santos HA. Ocorrência de parasitoses intestinais da área de abrangência do Centro de Saúde Cícero Idelfonso da Regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. Revista de Biologia e Ciências da Terra. 2001; 1: 1-11.

Silva MT, Souza VM, Bragognoli G, Pereira TG, Malagueño E. Atopic dermatitis and ascariasis in children aged 2 to 10 years. Jornal de Pediatria (Rio J). 2010;86:53-8.

Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic Helminth Infections Protect Against Allergic Disease by Active Regulatory Processes. Current Allergy and Asthma Reports. 2010;10:3-12.

Spiegel A, Tall A, Raphenon G, Trape JF, Druilhe P. Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and *Plasmodium falciparum* malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene. 2003;97:198-9.

Stephenson L, Latham M, Kinoti S, Brigham I. Improvements in physical fitness of Kenyan schoolboy infected with hookworm, *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* following a single dose of albendazole. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1990; 84:277-82.

Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaisar MMM e col. Polyparasitism and its impact on the immune system. International Journal for Parasitology. 2010;1171-76.

Taflin C, Miyara M, Nochy D e col. FoxP3 regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. American Journal of Pathology. 2009;174:497-508.

Talhari S, Neves RG, Penna GO, Oliveira MLVDR. Hanseníase. Dermatologia Tropical: Hanseníase. Manaus. Brasil. 4^a edição. 2006; 216pp.

Tomimori-Yamashita J, Maeda SM, Jabur R, Rotta O. Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. Anais Brasileiros de Dermatologia. 1996;71:343-49.

Tristão-Sá R, Ribeiro-Rodrigues R, Johnson LT, Pereira FE, Dietze R. Intestinal nematodes and pulmonary tuberculosis. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2001;35:533-5.

Ura S, Barreto JA. Papel da biópsia cutânea no diagnóstico de hanseníase. Hansenologia Internationalis. 2004;29:141-4.

Van Den Biggelaar AHJ, Van Ree R, Rodrigues LC. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*. 2000;356:1723-7.

Vásquez FG, Parente RCP, Pedrosa VL. Hanseníase em Coari: aspectos epidemiológicos da doença na região do médio Solimões no Estado do Amazonas. *Caderno de Saúde Coletiva*. 2008; 16 (2): 193-204.

Verhagen CE, Van der P, Kraan TCTM, Buffing AAM, Chand MA, Faber WR, Aarden LA, Das PK. Type 1 and type 2- like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-Responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN- γ / TNF- α and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. *The Journal of Immunology*. 1998; 160: 2380-7.

Wang LJ, Cao Y, Ning-Shi H. Helminth infections and intestinal inflammation. *World Journal Gastroenterology*. 2008;7:5125-32.

World Health Organization. WHO Action Programme for the Elimination of Leprosy. A guide to eliminating leprosy as a public health problem. Geneva. World Health Organization, 1995.

World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO Technical Report Series nr. 675, Geneva, 1982.

World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy. WHO Technical Report Series nr. 874, Geneva, 1998.

APÊNDICE 1

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 06 de maio de 2011.

De: Prof. Dr. Adauto Emmerich Oliveira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Rodrigo Ribeiro Rodrigues
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado:
"Características imunohistoquímicas das lesões de Hanseníase em
pacientes com nematóides intestinais".

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. 042/11 intitulado: "**Características imunohistoquímicas das lesões de Hanseníase em pacientes com nematóides intestinais**", cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Extra Ordinária realizada em 04 de maio de 2011.

Lembramos que, cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,


Coordenador do
Comitê de Ética em Pesquisa
CEPI/UFES

Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7504

APÊNDICE 2

Ficha de Anotação dos dados dos pacientes do estudo

- 1- Identificação
- 2- Registro prontuário SAME
- 3- Registro exame anátomo-patológico
- 4- Sexo F() M()
- 5- Idade
- 6- Forma clínica () I () TT () BT () BD () BV () VV () Outros diagnósticos
- 7- Diagnóstico Histopatológico () I () TT () BT () BD () BV () VV
- 8- IB
- 9- Classificação operacional () Paucibacilar () Multibacilar
- 10- Tratamento realizado () PQT/PB () PQT/MB () ROM
- 11- Comorbidades
 - **DM** S() N() **HAS** S() N() **HIV** S() N()
 - **LNH** S() N() **Outras**.....
- 12- EPF
 - Realizado S() N()
 - Não realizado S() N()
 - Resultado do EPF:
 - ⇒ **Helmintos**: () *Ascaris lumbricoides* () *Strongyloides stercoralis*
() *Ancilostomídeos* () *Enterobius vermicularis*
() *Schistosoma mansoni* () *Trichuris trichiura*
 - ⇒ **Protozoários** S() N()
 - ⇒ **Negativo**
- 13- Exame Anátomo-patológico
 - () Realizado
 - () Não realizado
 - () Bloco encontrado
 - () Bloco não encontrado ou indisponível para análise imuno-histoquímica