

Ismael Alves Rodrigues Júnior

IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS E MACRÓFAGOS DE LESÕES  
DE PELE DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE  
HANSENÍASE SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING

Universidade Federal de Minas Gerais  
Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Belo Horizonte – MG

2016

Ismael Alves Rodrigues Júnior

IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS E MACRÓFAGOS DE LESÕES  
DE PELE DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE  
HANSENÍASE SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING

Tese apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Patologia  
da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do título  
de Doutor em Patologia – área  
de concentração em Patologia  
Médica.

Orientadora: Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

Belo Horizonte

2016

R696i Rodrigues Júnior, Ismael Alves.  
Imunofenotipagem de linfócitos e macrófagos de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase segundo a classificação de Ridley e Jopling [manuscrito]. / Ismael Alves Rodrigues Júnior. - - Belo Horizonte: 2016.  
181f.: il.  
Orientador (a): Rosa Maria Esteves Arantes.  
Área de concentração: Patologia.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Patologia. 3. Classificação. 4. Imunofenotipagem. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Arantes, Rosa Maria Esteves. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 335

*Às pessoas que, a despeito do diagnóstico recebido naqueles dias difíceis, prontamente aceitaram o convite para participar deste estudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À professora Rosa Maria Esteves Arantes, que me acolheu em seu laboratório e me fez parte de sua equipe, desde o primeiro dia, a despeito de todas as minhas limitações e inexperiência, exigindo em troca apenas a afirmação de vontade.*

*Aos colegas de ICB, com quem compartilhei ótimos momentos.*

*À equipe do NIPE, com quem tanto aprendi.*

*À equipe do Hospital Eduardo de Menezes, estagiários e residentes, fundamentais.*

*À equipe do IMES, pelo apoio e confiança em mim depositados.*

*A minha esposa Letícia, presente em cada etapa.*

## RESUMO

**Introdução:** Há diferentes formas de classificação da hanseníase. A classificação operacional da Organização Mundial da Saúde diferencia pacientes paucibacilares (com até cinco lesões de pele) e multibacilares (seis ou mais lesões). É preconizada pelo Ministério da Saúde e define o esquema terapêutico. A classificação de Ridley e Jopling diferencia os pacientes conforme sua apresentação clínica, histopatológica, baciloscópica e imunológica e é a classificação científica mais utilizada. Apesar da praticidade, diferentes autores apontaram falhas na classificação operacional, quando comparada à classificação de Ridley e Jopling, especialmente discrepâncias em relação à diferenciação dos pacientes em paucibacilares e multibacilares. Muitos pacientes considerados multibacilares por meio da classificação de Ridley e Jopling são erradamente classificados como paucibacilares por meio da classificação operacional. Com isto, pode-se incorrer em tempo insuficiente de tratamento, subestimativa de risco de sequelas associadas à doença e dificuldade para o controle epidemiológico da hanseníase, que é calcado, sobretudo, no tratamento precoce e adequado dos pacientes. Por outro lado, diferentes autores têm demonstrado que a classificação de Ridley e Jopling, apesar de mais completa, apresenta considerável discordância entre seus componentes clínico e histopatológico. **Objetivo:** Este trabalho teve por objetivo comparar diferentes formas de classificação da hanseníase e avaliar diferentes marcações imuno-histoquímicas de linfócitos e macrófagos nas lesões de pele de pacientes com diferentes formas da doença. Este estudo foi projetado considerando-se que a abordagem histopatológica associada à imunofenotipagem *in situ* de células inflamatórias nas lesões pode trazer avanços ao entendimento das bases racionais classificatórias da hanseníase. **Métodos:** Participaram deste estudo pacientes com o diagnóstico recente de hanseníase, atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Os pacientes foram submetidos a biópsia de pele de uma das lesões e o material foi processado, no Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, para colorações HE, Wade, Azul da Prússia e imuno-histoquímica (CD3, CD4, CD8, CD62L, CD68, CD14, CD16, CD163, L1). **Resultados:** Foram incluídos 53 pacientes, com as diferentes formas de hanseníase. A concordância entre a classificação operacional e a classificação utilizada no serviço de referência (classificação de Ridley e Jopling acrescida da recomendação de que a baciloscopia positiva, mesmo isoladamente, categoriza o paciente como multibacilar) foi moderada ( $\kappa=0,49$ ). A contagem do número de lesões superestimou o número de pacientes multibacilares (42,9% x 38,8%) e classificou como paucibacilares 26,3% dos pacientes considerados multibacilares pela classificação do serviço de referência. A concordância plena entre o componente clínico e o componente anatomopatológico da classificação de Ridley e Jopling ocorreu em apenas 46,9% dos casos. Na imunofenotipagem do infiltrado inflamatório das lesões de pele, a relação de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> marcação de células CD8<sup>+</sup> foi mais condizente com o clássico paradigma Th1xTh2 que cada uma das marcações para linfócitos isoladamente. A marcação para CD163 representou melhor a variação fenotípica dos macrófagos envolvidos com o processo inflamatório das diferentes formas de hanseníase do que as marcações para CD68, CD62L, CD14, CD16, L1 e ferro. **Conclusões:** a classificação operacional superestima o número de pacientes multibacilares, mas, mesmo assim, apresenta alta taxa de “falsos-paucibacilares”. A discordância entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling geralmente não altera o estado bacilar (pauci/multi) dos pacientes e parece advir de uma imprecisão dos critérios anatomopatológicos da chave utilizada para a classificação histopatológica. A marcação para macrófagos M2 CD163<sup>+</sup> é a que mais guardou relação com o paradigma Th1xTh2 no infiltrado inflamatório das lesões de diferentes formas de hanseníase, mas sua quantificação, isoladamente, não permite pormenorizar os pacientes de modo a acrescentar objetividade aos critérios histopatológicos de Ridley e Jopling.

## ABSTRACT

**Introduction:** There are different leprosy classification methods. World Health Organization's operational classification differentiates patients in paucibacillary (with up to five skin lesions) and multibacillary (six or more lesions). This classification is recommended by the Ministry of Health of Brazil and facilitates the choice of the drug regimen to be used. The Ridley and Jopling classification differentiates patients according to their clinical, histopathological, bacteriological and immunological presentation and is the most widely used scientific classification. Despite the undeniable practicality, different authors have pointed out flaws in the operational classification, compared to Ridley and Jopling classification, especially discrepancies regarding the differentiation of patients with paucibacillary and multibacillary leprosy. Many patients considered multibacillary by Ridley and Jopling classification are erroneously classified as paucibacillary by the operational classification. This mistake may result in inadequate treatment duration, underestimation of the sequelae risk associated with the disease and difficulty for the epidemiological control of leprosy, since it is especially underpinned in the early and proper treatment of patients. On the other hand, different authors have shown that the Ridley and Jopling classification, though more complete, presents considerable disagreement among its clinical and histological components. **Objective:** This study aimed to compare different leprosy classification methods and evaluate lymphocytes and macrophages immunohistochemistry in biopsies of different forms of leprosy. It was designed considering that the histopathological approach with *in situ* immunophenotyping of inflammatory cells in the lesions can bring advances in the understanding of the rational grounds of leprosy classification. **Methods:** The study included patients with newly diagnosed leprosy seen at the Eduardo de Menezes Hospital (Hospital Foundation of Minas Gerais State). Patients underwent skin biopsy and the material was processed in the Neuroimmunopathology laboratory of UFMG Institute of Biological Sciences for HE, Wade, Prussian blue and immunohistochemistry (CD3, CD4, CD8, CD62L, CD68, CD14, CD16, CD163, L1) staining. **Results:** 53 patients were included, with different forms of leprosy. The agreement between the operational classification and the classification used in the reference service (Ridley and Jopling classification plus the recommendation that the skin slit smear positivity, even alone, categorizes the patient as multibacillary) was moderate ( $\kappa = 0.49$ ). The operational classification overestimated the number of MB patients (42.9% vs. 38.8%) and classified as paucibacillary 26.3% of patients considered multibacillary the reference service classification. The full concordance between the clinical and pathological components of the Ridley and Jopling classification occurred in only 46.9% of cases. In the immunohistochemical study, the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells was more consistent with the classic paradigm Th1xTh2 than the CD3, CD4 or CD8 markings alone. The CD163 positivity represented better the phenotypic variation of macrophages involved in the inflammatory process of different forms of leprosy than the markings for CD68, CD62L, CD14, CD16, L1 and iron. **Conclusions:** The operational classification overestimates the number of MB patients, and it has a high rate of "false-paucibacillary" patients. The disagreement between the clinical and histopathological components of Ridley and Jopling classification generally does not change the patient bacillary state (pauci / multi) and appears to result from an inaccuracy of the pathological criteria of the key used for histopathological classification. M2 CD163<sup>+</sup> macrophages presented the better relationship with the Th1xTh2 paradigm in the lesions of different forms of leprosy, but its quantification, alone, does not detail the patients enough in order to add objectivity to the histopathological criteria of the Ridley and Jopling classification.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análise descritiva da amostra de quarenta e nove casos novos de hanseníase incluídos no estudo comparativo entre as diferentes formas de classificação de hanseníase	62
TABELA 2	Classificação de quarenta e nove casos novos de hanseníase atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil) em paucibacilares e multibacilares de acordo com as classificações operacional da OMS, de Madrid, por número de áreas corporais afetadas (NBAA), de Ridley e Jopling clínica, de Ridley e Jopling anatomopatológica e baciloscópica	64
TABELA 3	Concordância entre a classificação operacional da OMS e a classificação utilizada pela equipe do serviço de referência em hanseníase em quarenta e nove casos novos de hanseníase atendidos	65
TABELA 4	Concordância entre a classificação operacional da OMS e as demais formas de classificação da hanseníase estudadas em quarenta e nove casos novos atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil)	67
TABELA 5	Discordância entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling em quarenta e oito casos novos de hanseníase atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil)	69
TABELA 6	Correlação entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling em quarenta e nove casos novos de hanseníase atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil)	70
TABELA 7	Relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD4 e CD8 nas lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	77
TABELA 8	Relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD14 e CD16 nas lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	86



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Tabela do Ministério da Saúde com Indicadores operacionais e epidemiológicos de hanseníase de 2014	23
FIGURA 2	Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase no período de 2000 a 2014	25
FIGURA 3	Coefficiente de prevalência de hanseníase por município em 2013	26
FIGURA 4	Microfotografias de lâminas utilizadas para a classificação de Ridley e Jopling (HE) – TT/DT/IND	32
FIGURA 5	Microfotografias de lâminas utilizadas para a classificação de Ridley e Jopling (HE) – DV/VV	34
FIGURA 6	Resumo do conhecimento a respeito do perfil de citocinas envolvidas na resposta inflamatória das lesões cutâneas de hanseníase na década de 1990	40
FIGURA 7	Resumo do conhecimento a respeito do perfil de citocinas envolvidas na resposta inflamatória das lesões cutâneas de hanseníase na década de 1990	40
FIGURA 8	Os três grupos principais de macrófagos e as formas de indução de cada um	47
FIGURA 9	Quantificação da porcentagem de área marcada para depósitos de ferro	59
FIGURA 10	Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD68 e CD62L em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x)	87
FIGURA 11	Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD14 e CD16 em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x)	88
FIGURA 12	Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD163 em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x)	98
FIGURA 13	Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD163 e L1 e da marcação para ferro em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x)	100

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Porcentagem média de células marcadas para CD3 por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	71
GRÁFICO 2	Porcentagem média de células marcadas para CD3, por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	72
GRÁFICO 3	Porcentagem média de células marcadas para CD4 por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	73
GRÁFICO 4	Porcentagem média de células marcadas para CD4, por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	74
GRÁFICO 5	Porcentagem média de células marcadas para CD8 por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	75
GRÁFICO 6	Porcentagem média de células marcadas para CD8, por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	76
GRÁFICO 7	Porcentagem média de células marcadas para CD62L por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	78
GRÁFICO 8	Porcentagem média de células marcadas para CD62L, por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	79
GRÁFICO 9	Porcentagem média de células marcadas para CD68 por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	80
GRÁFICO 10	Porcentagem média de células marcadas para CD68, por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	81
GRÁFICO 11	Porcentagem média de células marcadas para CD14 por imunohistoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	82

GRÁFICO	12	Porcentagem média de células marcadas para CD14, por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	83
GRÁFICO	13	Porcentagem média de células marcadas para CD16 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	84
GRÁFICO	14	Porcentagem média de células marcadas para CD16, por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	85
GRÁFICO	15	Porcentagem média de células marcadas para CD3 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	90
GRÁFICO	16	Porcentagem média de células marcadas para CD4 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	91
GRÁFICO	17	Porcentagem média de células marcadas para CD8 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	92
GRÁFICO	18	Porcentagem média de células marcadas para CD62L por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	93
GRÁFICO	19	Porcentagem média de células marcadas para CD68 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	94
GRÁFICO	20	Porcentagem média de células marcadas para CD14 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	95
GRÁFICO	21	Porcentagem média de células marcadas para CD16 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada	96
GRÁFICO	22	Porcentagem média de células marcadas para CD163 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	101

GRÁFICO	23	Porcentagem média de células marcadas para CD163, por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	102
GRÁFICO	24	Porcentagem média de células marcadas para L1 por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	103
GRÁFICO	25	Porcentagem média de células marcadas para L1, por imuno-histoquímica <i>in situ</i> de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase	104
GRÁFICO	26	Porcentagem média de área marcada para ferro em lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase	105
GRÁFICO	27	Porcentagem média de área marcada para ferro em lesões de pele de pacientes com hanseníase, estratificada conforme as diferentes formas da doença	106
GRÁFICO	28	Comparação entre um caso com manifestação clínica da forma DT-macular e biópsia da forma IND e os casos típicos de forma IND e DT, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro	108
GRÁFICO	29	Comparação entre um caso com manifestação clínica típica da forma DT e biópsia da forma IND e os casos típicos de forma IND e DT, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro	109
GRÁFICO	30	Comparação entre um caso com manifestação clínica típica da forma IND e biópsia típica da forma DT e os casos típicos de forma IND e DT, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro	110
GRÁFICO	31	Comparação entre um caso com clínica da forma TT e biópsia da forma IND e os grupos de pacientes com formas TT e IND, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro	111
GRÁFICO	32	Comparação entre um caso com clínica da forma DD e biópsia da forma IND e os grupos de pacientes com formas VV/DV/DD e IND, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro	112

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Os três tipos principais de macrófagos	45
QUADRO 2	Os três tipos de monócitos humanos	48
QUADRO 3	Anticorpos primários utilizados para o estudo imuno-histoquímico	57

## ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	-	<i>Cluster of differentiation</i>
DD	-	Dimorfa-dimorfa
DP	-	Desvio-padrão
DT	-	Dimorfa-tuberculoide
DV	-	Dimorfa-virchowiana
ELISA	-	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
et al.	-	<i>et alia</i> ou <i>et alii</i>
GM-CSF	-	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Hb	-	hemoglobina
HE	-	Hematoxilina-Eosina
Hp	-	haptoglobina
ICB	-	Instituto de Ciências Biológicas
IDO	-	indoleamina 2,3 dioxigenase
IND	-	Indeterminada
INF	-	interferon
iNOS	-	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
LB	-	Linfócito B
LT	-	Linfócito T
M1	-	Macrófago tipo 1
M2	-	Macrófago tipo 2
MB	-	Multibacilar
MHC	-	<i>Major histocompatibility complex</i>
NIPE	-	Neuroimunopatologia Experimental
mín	-	Mínimo
máx	-	Máximo
NO	-	<i>Nitric oxide</i>
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PB	-	Paucibacilar
PBS	-	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	-	<i>Polimerase chain reaction</i>
PGP	-	<i>Protein gene product</i>

qPCR	-	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
TCR	-	<i>T-cell receptor</i>
Th	-	Linfócito T <i>helper</i>
TLR	-	<i>Toll like receptor</i>
TNF	-	<i>Tumor necrosis factor</i>
TQST	-	Teste quantitativo de sensibilidade térmica
T <sub>reg</sub>	-	Linfócito T regulador
T <sub>s</sub>	-	Linfócito T supressor
TT	-	Tuberculoide
UFMG	-	Universidade Federal de Minas Gerais
VV	-	Virchowiana
WHO	-	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
1.1	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	17
1.1.1	O PRIMEIRO TRABALHO.....	17
1.1.2	MOTIVAÇÃO PARA O ATUAL TRABALHO.....	19
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
2.1	<b>A DOENÇA</b> .....	22
2.2	<b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	22
2.3	<b>DIAGNÓSTICO</b> .....	26
2.4	<b>CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES</b> .....	27
2.5	<b>ASPECTOS CLÍNICOS E BACILOSCÓPICOS DAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE</b> .....	29
2.5.1	FORMA INDETERMINADA.....	29
2.5.2	FORMA TUBERCULOIDE .....	29
2.5.3	FORMA VIRCHOWIANA.....	30
2.5.4	FORMAS DIMORFAS .....	30
2.5.5	SURTOS REACIONAIS.....	30
2.6	<b>ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE</b> .....	31
2.6.1	FORMA INDETERMINADA .....	31
2.6.2	FORMA TUBERCULOIDE.....	31
2.6.3	FORMA DIMORFA-TUBERCULOIDE.....	31
2.6.4	FORMA DIMORFA-DIMORFA.....	33
2.6.5	FORMA DIMORFA-VIRCHOWIANA.....	33
2.6.6	FORMA VIRCHOWIANA.....	33
2.7	<b>A IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS</b> .....	35
2.7.1	ESTUDOS EM SANGUE PERIFÉRICO PRECEDERAM ESTUDOS <i>IN SITU</i> .....	36
2.7.2	A IMUNOFENOTIPAGEM LINFOCITÁRIA <i>IN SITU</i> NA DÉCADA DE 1980.....	37
2.7.3	A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA DÉCADA DE 1990.....	39
2.7.4	IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE NA DÉCADA DE 2000.....	41
2.7.5	O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E OS TRABALHOS NA DÉCADA 2010.....	42
2.8	<b>A IMUNOFENOTIPAGEM DE MACRÓFAGOS</b> .....	43



3	<b>OBJETIVOS</b>	53
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	53
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	53
4	<b>MÉTODOS</b>	54
4.1	<b>APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	54
4.2	<b>PACIENTES</b> .....	54
4.3	<b>DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE</b> .....	54
4.4	<b>BIÓPSIA DE PELE</b> .....	55
4.5	<b>PROCESSAMENTO DOS FRAGMENTOS DE PELE</b> .....	55
4.6	<b>ESTUDO MORFOLÓGICO</b> .....	55
4.7	<b>ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO</b> .....	56
4.8	<b>MARCAÇÃO PARA FERRO</b> .....	58
4.9	<b>MORFOMETRIA</b> .....	58
4.10	<b>CONTAGEM DE CÉLULAS E ESTIMATIVA DE ÁREA MARCADA</b> .....	58
4.11	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	59
4.11.1	<b>ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES</b> .....	59
4.11.2	<b>ANÁLISE DOS RESULTADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA</b> .....	60
5	<b>RESULTADOS</b>	62
5.1	<b>COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES</b> ...	62
5.2	<b>QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD3, CD4, CD8</b> .....	71
5.3	<b>QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD62L</b> ...	78
5.4	<b>QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD68, CD14, CD16</b> .....	80
5.5	<b>A MARCAÇÃO PARA CD62L, CD68, CD14 E CD16</b> .....	87
5.6	<b>COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DT MACULAR X FORMA DT X FORMA INDETERMINADA QUANTO ÀS MARCAÇÕES PARA CD3, CD4, CD8, CD62L, CD14 E CD16</b> .....	89
5.7	<b>MARCAÇÃO PARA CD163, L1, FERRO</b> .....	97
5.8	<b>QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO PARA CD163, L1, FERRO</b> ..	101
5.9	<b>A MARCAÇÃO CD163, L1, FERRO EM ALGUNS CASOS DISCORDANTES</b> .....	107
6	<b>DISCUSSÃO</b>	113
6.1	<b>COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES</b> ..	113
6.2	<b>QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD3, CD4, CD8</b> .....	117
6.3	<b>QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD62L</b> .....	118
6.4	<b>QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD68,</b>	

	<b>CD14, CD16.....</b>	119
6.5	<b>QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO PARA CD163, L1, FERRO..</b>	120
6.6	<b>A MARCAÇÃO CD163, L1, FERRO EM ALGUNS CASOS DISCORDANTES.....</b>	124
6.7	<b>A IMUNOFENOTIPAGEM DA FORMA INDETERMINADA.....</b>	124
6.8	<b>A IMUNOFENOTIPAGEM DO GRUPO DT-MACULAR.....</b>	125
7	<b>CONCLUSÕES</b>	127
7.1	<b>SOBRE A COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES .....</b>	127
7.2	<b>SOBRE A CONCORDÂNCIA ENTRE OS COMPONENTES CLÍNICO E ANATOMOPATOLÓGICO DA CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING.....</b>	127
7.3	<b>SOBRE A IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS.....</b>	128
7.4	<b>SOBRE A IMUNOFENOTIPAGEM DE MACRÓFAGOS .....</b>	128
8	<b>REFERÊNCIAS</b>	129
9	<b>ANEXOS</b>	138
9.1	<b>ARTIGO PUBLICADO.....</b>	139
9.2	<b>ARTIGO SUBMETIDO .....</b>	147
9.2.1	<b>RESPOSTA AOS REVISORES.....</b>	167
9.3	<b>APROVAÇÃO COEP-UFMG.....</b>	179
9.4	<b>FOLHA DE APROVAÇÃO .....</b>	181

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. JUSTIFICATIVA

### 1.1.1. O PRIMEIRO TRABALHO

Os estudos sobre hanseníase realizados no laboratório de Neuroimunopatologia Experimental (NIPE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) focaram, inicialmente, a correlação entre os resultados dos testes de sensibilidade térmica e a densidade de inervação nas lesões e na pele contralateral de pacientes com a doença. Partiu-se do conceito de que, nas lesões da hanseníase, a perda de sensibilidade tátil, mediada por fibras grossas mielinizadas tipo A-beta, é precedida pela perda de sensibilidade térmica, mediada por fibras finas mielinizadas tipo A-delta e finas não mielinizadas tipo C. Na prática, isso implica que o exame de sensibilidade térmica de uma lesão suspeita seja um critério fundamental para que se estabeleça mais precocemente o diagnóstico de hanseníase.

Na dissertação de mestrado do autor desta tese, para a quantificação da sensibilidade térmica na pele de pacientes com hanseníase, foi empregado um moderno analisador termo-sensório para a realização do teste quantitativo de sensibilidade térmica (TQST). Paralelamente, foi realizado o estudo morfológico da inervação cutânea dos pacientes por meio de coloração imuno-histoquímica com anticorpo anti-PGP 9.5 (*protein gene product*), para evidenciação de terminações nervosas finas intraepidérmicas e dérmicas. Os poucos trabalhos até então disponíveis na literatura indexada, empregando o estudo morfológico de fibras nervosas finas cutâneas em pacientes com hanseníase, já haviam constatado uma diminuição da densidade das fibras finas dermo-epidérmicas nas lesões da doença e uma associação entre esta redução e o aumento dos limiares de detecção de calor e frio destes pacientes. Todavia, ainda não haviam sido especificados detalhes técnicos importantes sobre a metodologia empregada no TQST e somente haviam sido empregados métodos semi-quantitativos de avaliação de densidade de fibras nervosas cutâneas.

Dessa forma, na dissertação de mestrado, foi avaliada a correlação entre o grau de comprometimento da sensibilidade térmica avaliada por meio do TQST e o grau de diminuição da densidade de fibras nervosas finas na pele de pacientes com hanseníase. Vinte

e dois pacientes tiveram lesão e pele contralateral clinicamente normal avaliadas. Os resultados, publicados em dezembro de 2012, no final do primeiro ano de doutorado (Anexos, 9.1), demonstraram diferença significativa entre lesões e pele normal contralateral em relação aos limiares de detecção de frio, calor e dor induzida por frio e calor. A diferença absoluta média para estes limiares foi de, respectivamente, 9,2°C; 6,0°C; 5,5°C e 4,2°C. Como esperado, a marcação imuno-histoquímica das biópsias de lesões demonstrou uma importante rarefação de fibras intraepidérmicas e subepidérmicas em relação às biópsias de pele normal contralateral. Em média, a densidade de fibras subepidérmicas e intraepidérmicas mostrou redução de 79.5% ( $DP = 19,6$ ) e 80,8% ( $DP = 24,9$ ), respectivamente.

Foi observada boa correlação entre o déficit de fibras intraepidérmicas e o déficit de fibras subepidérmicas. Todavia, não foi possível detectar a existência de correlação entre as variáveis representativas de déficit de inervação cutânea e as variáveis representativas de déficit de sensibilidade térmica, uma vez que a rarefação de fibras finas cutâneas foi homoganeamente intensa em todos os pacientes, independente do grau de déficit sensitivo apresentado. Esperava-se poder delinear um modelo matemático de predição da densidade de fibras intraepidérmicas e subepidérmicas, tendo como base os resultados obtidos no TQST. Todavia, apesar de aparentemente óbvia, não foi possível detectar a existência de correlação entre as variáveis que representaram o déficit de inervação cutânea e as variáveis que representaram o déficit de sensibilidade térmica. De fato, a análise descritiva das variáveis já antecipava, por meio da observação cuidadosa de seus coeficientes de variação, que o grau de déficit sensitivo havia variado significativamente entre os participantes, enquanto a rarefação de fibras finas cutâneas havia sido homoganeamente intensa em todos eles.

Há diferentes hipóteses para explicar a ausência de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e as variáveis de quantificação de fibras neurais. Primeiramente, é possível que as variações detectadas nos limiares de sensibilidade térmica estudados estivessem relacionadas a variações da densidade de inervação de camadas da pele mais profundas que as camadas epiderme e derme papilar superficial estudadas. Todavia, a quantificação neural em regiões mais profundas da pele de biópsias de lesões de hanseníase mostrou-se inadequada em virtude da irregularidade da densidade do infiltrado inflamatório em derme média e profunda existente nestas lesões e a intensidade de marcações inespecíficas obtidas com a coloração imuno-histoquímica para PGP 9.5 na derme média e profunda de nossas biópsias. Em segundo lugar, é possível que a falta de correlação se deva a um

comprometimento funcional de terminações nervosas nas lesões cutâneas de hanseníase, mesmo diante da integridade anatômica imuno-histoquímica da inervação cutânea. Para investigar esta possibilidade, seria importante a análise ultraestrutural qualitativa de terminações nervosas finas intraepidérmicas e dérmicas superficiais, a investigação da expressão imuno-histoquímica de neurotransmissores envolvidos no controle da sensibilidade térmica e o estudo da expressão de citocinas inflamatórias. Esses fatores podem estar relacionados com o comprometimento funcional de terminações nervosas cutâneas. Ao longo do processo de recrutamento de voluntários para as pesquisas de mestrado e doutorado foi possível armazenar material proveniente de biópsias de pele de lesões de pacientes com hanseníase bem como de pele contralateral livre de lesões para que futuras pesquisas no laboratório NIPE abordem estas questões. Este banco de pele de pacientes com hanseníase está armazenado no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

De qualquer forma, a mesma rarefação intensa e homogênea de inervação, que matematicamente responde pela ausência de correlação entre as variáveis de sensibilidade térmica e de quantificação neural, valorizou a quantificação de fibras neurais finas cutâneas como um possível método diagnóstico para hanseníase. Sabe-se que os testes de sensibilidade térmica são dependentes da capacidade de os pacientes responderem corretamente às instruções do examinador, o que pode tornar difícil sua realização em crianças ou em pacientes com dificuldades cognitivas. Sabe-se, também, que o estudo anatomopatológico da lesão suspeita pode ter importância definidora para o diagnóstico, mas, isoladamente, nos casos paucibacilares, em que geralmente não há a visualização da micobactéria, este exame é considerado inespecífico. Tais dificuldades ainda não foram completamente corrigidas por outros exames, como por exemplo, a pesquisa do microrganismo causador por meio das técnicas de hibridização *in situ* e de reação em cadeia da polimerase (PCR), que têm demonstrado sensibilidade de 45,5% e 66,6%, respectivamente.

### 1.1.2. MOTIVAÇÃO PARA O ATUAL TRABALHO

O trabalho de dissertação de mestrado demonstrou também que a intensidade de rarefação de fibras neurais epidérmicas e dérmicas superficiais não variou conforme a forma de hanseníase apresentada pelos pacientes. Ou seja, não houve associação estatística entre o grau de desnervação e a classificação apresentada pelos pacientes. Da mesma forma, também não foi encontrada correlação entre o grau de perda de sensibilidade térmica e a classificação clínico-

patológica apresentada pelos pacientes. Esperava-se que as lesões cutâneas dos pacientes com hanseníase da forma tuberculoide, classicamente descritas como anestésicas, apresentassem desnervação epidérmica e dérmica superficial nitidamente mais intensa que as lesões da forma indeterminada, nas quais, de forma incipiente e discreta, apenas a sensibilidade térmica costuma estar afetada. Supondo-se que o padrão inflamatório granulomatoso de células epitelioides, típico da forma tuberculoide e representativo de uma ativação imunológica do tipo celular, estivesse associado a uma desnervação cutânea mais intensa, esperava-se poder descrever um comportamento da desnervação cutânea crescente, na seguinte sequência das formas da doença: indeterminada < virchowiana < dimorfa-virchowiana < dimorfa-dimorfa < dimorfa-tuberculoide < tuberculoide.

Aventou-se a hipótese de que a falta de correlação entre o grau de desnervação cutânea e as diferentes formas de hanseníase fosse devida a dificuldades inerentes ao método de classificação utilizado em nosso trabalho, a classificação de Ridley e Jopling. Algumas vezes, os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling são discordantes, e a classificação final do paciente exige bom senso por parte do médico. O objetivo fundamental prático de qualquer forma de classificação de hanseníase é diferenciar os pacientes em multibacilares e paucibacilares de modo a permitir que sejam tratados com o esquema de poliquimioterapia adequado. Esta estratégia previne recidivas e contribui para o controle epidemiológico, diminuindo a disseminação da doença. Dessa forma, quando os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling são discordantes, considera-se como sendo a forma apresentada pelo paciente aquele componente que se aproxima mais do polo anérgico-multibacilar do espectro de apresentações da hanseníase.

Em nossa amostragem, na dissertação de mestrado, alguns pacientes, por exemplo, eram classificados inicialmente, com base nos critérios clínicos da classificação de Ridley e Jopling, com uma das formas dimorfas do espectro, mas, posteriormente, suas biópsias revelavam, com base nos critérios histopatológicos do mesmo sistema de classificação, a forma indeterminada da hanseníase. Apesar desta discordância clínico-patológica, ao fim, estes pacientes foram classificados como apresentadores de uma das formas dimorfas, para critérios práticos de tratamento e para critérios de classificação científica.

Todavia, nestes casos discordantes apresentados como exemplo, o infiltrado inflamatório das biópsias era similar ao dos pacientes que definitivamente apresentavam a forma

indeterminada da doença e seu padrão de desnervação cutânea também mimetizava o padrão típico dos pacientes com a forma indeterminada, mesmo que, ao fim, se tratasse de pacientes da forma dimorfa. Foi levantada a hipótese de que a falta de correlação entre o grau de desnervação e a classificação final de cada caso pudesse estar relacionada a este tipo de discordância clínico-patológica existente na classificação de Ridley e Jopling. De qualquer forma nosso foco se dirigiu para estratégias de análise do nosso material que pudessem contribuir para um melhor entendimento das bases racionais das classificações utilizadas.

Nossos trabalhos avançaram, portanto, para estudos realizados sobre a concordância entre as diferentes formas de classificação de hanseníase, incluindo a classificação de Ridley e Jopling, a classificação de Madrid, a classificação baciloscópica, a classificação baseada no número de áreas corporais afetadas por lesões cutâneas e neurais e a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os resultados, submetidos a publicação (comprovante de submissão e resposta aos revisores: Anexos, 9.2), demonstram que há espaço para melhoria dos sistemas de classificação existentes, seja para fins práticos, quando da necessidade de definição do esquema terapêutico a ser utilizado, em áreas remotas ou sem assistência laboratorial, seja para fins científicos, quando da necessidade de se classificar adequadamente os pacientes, em consonância com os aspectos clínicos, baciloscópicos, histopatológicos e imunológicos, que geralmente se superpõem como verdadeiros estratos, guardando relação quase perfeita entre si, fazendo da hanseníase um modelo de doença único, que muito contribuiu para o desenvolvimento da imunologia e que, espera-se, muito ainda poderá se beneficiar dos avanços dessa última.

Enfim, aproveitando-se deste reconhecido modelo para estudo da inflamação, a segunda parte desta tese se aprofunda sobre os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos do infiltrado inflamatório das lesões de hanseníase. A imunofenotipagem de linfócitos e macrófagos, realizada em biópsias de pele de pacientes com as diferentes formas de hanseníase, permite compreender melhor a biologia dessas células durante o processo inflamatório crônico da pele. Além disso, já trazendo para a doença parte dos benefícios advindos do conhecimento que ela mesma ajudou a formar, a imunofenotipagem de linfócitos e, especialmente, macrófagos permite uma avaliação dos critérios histopatológicos da classificação de Ridley e Jopling à luz de novos marcadores celulares relacionados ao paradigma imunológico Th1xTh2, definidor do espectro hanseníase.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A DOENÇA

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, provocada pelo *Mycobacterium leprae*, de evolução crônica, insidiosa, que afeta particularmente a pele e os nervos periféricos. A doença tem alta infectividade, ou seja, infecta uma grande quantidade de pessoas, mas apresenta baixa patogenicidade, pois poucas das pessoas infectadas adoecem. Ainda não se sabe exatamente quais os fatores que levam a este comportamento epidemiológico, mas, de modo geral, sabe-se que a forma como o hospedeiro interage com o bacilo e produz sua resposta inflamatória está envolvida com perfis de resistência e suscetibilidade à doença. A lesão neural é a manifestação de maior morbidade, provoca deformidades físicas que podem evoluir para lesões incapacitantes e permanentes e responde pela importância histórica, social e econômica da doença. Apesar de a patogênese da neuropatia na hanseníase ainda não ter sido completamente elucidada, sabe-se que tanto a reação imunológica do doente quanto uma agressão direta pela micobactéria podem estar envolvidos.

A hanseníase é uma doença de notificação compulsória, tem cura e o tratamento é fornecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. A melhor estratégia para controle epidemiológico da doença é a poliquimioterapia padronizada. Para tanto, são fundamentais o diagnóstico precoce e a cura dos casos diagnosticados. Neste sentido, o exame das pessoas que constituem contatos dos pacientes índices é muito importante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

### 2.2. EPIDEMIOLOGIA

Conforme os dados disponíveis em fevereiro de 2016, no Brasil, em 2014, 25.738 pessoas estavam em tratamento para hanseníase, constituindo o “registro ativo” de pacientes com a doença. Em 2014, a taxa de prevalência foi de 1,27:10.000 habitantes e a taxa de casos novos de 15,32:100.000 habitantes. Foram diagnosticados 31.064 casos novos da doença (Figura 1).



**Registro ativo: número e percentual, Casos novos de Hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2014**

Estados / Regiões	Reg ativo	%Coef. Prev.	CN < 15 anos	Coef. < 15 anos <sup>1</sup>	Casos Novos Total	Coef. Geral <sup>2</sup>	MB	%MB	Feminino	%Fem	Avaliados	% Avaliados	Grau 2	% Grau 2	%Coef. Grau 2	Cont. Reg.	Cont. Exam	%Cont. Exam	Cura PB+MB	Total PB+MB	%Cura Coorte
<b>BRASIL</b>	<b>4.523</b>	<b>2,62</b>	<b>663</b>	<b>12,66</b>	<b>6.113</b>	<b>35,41</b>	<b>3.840</b>	<b>62,82</b>	<b>2.514</b>	<b>41,13</b>	<b>5.653</b>	<b>92,48</b>	<b>375</b>	<b>6,13</b>	<b>2,17</b>	<b>22.401</b>	<b>17.125</b>	<b>76,45</b>	<b>5.084</b>	<b>6.225</b>	<b>81,67</b>
<b>Região Norte</b>																					
Roraima	537	3,07	43	9,36	721	41,23	493	68,38	331	45,91	692	95,98	41	5,69	2,34	2.053	1.697	82,66	612	694	88,18
Acre	102	1,29	11	4,17	141	17,85	111	78,72	43	30,50	175	95,74	12	8,51	1,52	615	457	74,31	151	158	95,57
Amazonas	500	1,29	69	5,57	567	14,64	300	52,91	239	42,15	523	92,24	44	7,76	1,14	2.282	1.727	75,68	497	606	82,01
Roraima	65	1,31	7	4,34	83	16,70	52	62,65	30	36,14	61	73,49	7	8,43	1,41	502	293	58,37	94	133	70,68
Pará	2525	3,12	428	17,54	3.432	42,34	2.243	65,36	1.376	40,09	3.197	93,15	212	6,18	2,62	13.342	9.891	74,13	2.823	3.582	78,81
Amapá	116	1,54	10	3,99	123	16,38	71	57,72	49	39,84	119	96,75	5	4,07	0,67	449	388	86,41	116	142	81,69
Tocantins	678	4,53	95	22,43	1.046	69,88	570	54,49	446	42,64	885,3	92,6	54	5,16	3,61	3.158	2.672	84,61	791	910	86,92
<b>Região Nordeste</b>	<b>10.738</b>	<b>1,91</b>	<b>1.113</b>	<b>7,48</b>	<b>13.523</b>	<b>24,07</b>	<b>8.422</b>	<b>62,28</b>	<b>6.368</b>	<b>47,09</b>	<b>11.254</b>	<b>83,22</b>	<b>767</b>	<b>5,67</b>	<b>1,37</b>	<b>47.309</b>	<b>33.690</b>	<b>71,21</b>	<b>10.745</b>	<b>13.104</b>	<b>82,00</b>
Maranhão	2.919	4,26	361	16,73	3.632	53,02	2.584	71,15	1.617	44,52	3.014	82,98	215	5,92	3,14	13.117	8.655	65,98	2.970	3.585	82,85
Piauí	795	2,49	76	8,78	1.038	32,49	635	61,18	473	45,57	888	85,55	59	5,68	1,85	3.600	2.544	70,67	799	1.021	78,26
Ceará	1.754	1,98	131	5,73	2.027	22,92	1.241	61,22	913	45,04	1.551	76,52	106	5,23	1,20	7.805	5.441	69,71	1.721	2.010	85,62
Rio Grande do Norte	221	0,65	16	1,88	272	7,98	158	58,09	145	53,31	187	68,75	15	5,51	0,44	946	534	56,45	209	289	72,32
Paraíba	418	1,06	29	2,87	587	14,88	337	57,41	261	44,46	503	85,69	37	6,30	0,94	2.026	1.538	75,91	491	620	79,19
Pernambuco	2.145	2,31	261	10,97	2.583	27,84	1.442	55,83	1.314	50,87	2.301	89,08	123	4,76	1,33	8.713	7.035	80,74	2.053	2.476	82,92
Alagoas	206	0,62	25	2,61	341	10,27	174	51,03	178	52,20	281	82,40	14	4,11	0,42	1.332	927	69,59	314	389	80,72
Sergipe	271	1,22	26	4,41	416	18,74	204	49,04	204	49,04	348	83,65	29	6,97	1,31	1.677	1.495	89,15	347	398	87,19
Bahia	2.009	1,33	188	4,97	2.627	17,37	1.647	62,70	1.263	48,08	2.181	83,02	169	6,43	1,12	8.093	5.521	68,22	1.841	2.316	79,49
<b>Região Sudeste</b>	<b>3.596</b>	<b>0,42</b>	<b>186</b>	<b>1,03</b>	<b>4.510</b>	<b>5,30</b>	<b>2.868</b>	<b>63,59</b>	<b>2.049</b>	<b>45,43</b>	<b>4.191</b>	<b>92,93</b>	<b>472</b>	<b>10,47</b>	<b>0,55</b>	<b>15.110</b>	<b>13.012</b>	<b>86,12</b>	<b>4.052</b>	<b>4.525</b>	<b>89,55</b>
Minas Gerais	914	0,44	55	1,21	1.215	5,86	850	69,96	527	43,37	1.119	92,10	133	10,95	0,64	4.128	3.743	90,67	1.117	1.264	88,37
Espírito Santo	429	1,10	34	3,88	619	15,93	320	51,70	280	45,23	607	98,06	50	8,08	1,29	2.368	2.093	88,39	599	646	92,72
Rio de Janeiro	902	0,55	63	1,86	1.212	7,36	691	57,01	576	47,52	1.112	91,75	123	10,15	0,75	4.361	3.385	77,62	1.118	1.287	86,87
São Paulo	1.351	0,31	34	0,36	1.454	3,32	1.007	68,78	666	45,49	1.353	92,42	166	11,34	0,38	4.253	3.791	89,14	1.218	1.328	91,72
<b>Região Sul</b>	<b>907</b>	<b>0,31</b>	<b>18</b>	<b>0,29</b>	<b>1.035</b>	<b>3,57</b>	<b>805</b>	<b>77,78</b>	<b>439</b>	<b>42,42</b>	<b>949</b>	<b>91,69</b>	<b>99</b>	<b>9,57</b>	<b>0,34</b>	<b>3.529</b>	<b>3.237</b>	<b>91,73</b>	<b>1.049</b>	<b>1.201</b>	<b>87,34</b>
Paraná	682	0,62	11	0,45	744	6,71	586	78,76	325	43,68	701	94,22	64	8,60	0,58	2.559	2.435	95,15	784	874	89,70
Santa Catarina	111	0,17	4	0,28	151	2,24	110	72,85	57	37,75	133	88,08	16	10,60	0,24	651	572	87,86	178	198	89,90
Rio Grande do Sul	114	0,10	3	0,13	140	1,25	109	77,86	57	40,71	115	82,14	19	13,57	0,17	319	230	72,10	87	129	67,44
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>5.974</b>	<b>3,93</b>	<b>361</b>	<b>10,01</b>	<b>5.878</b>	<b>38,62</b>	<b>4.536</b>	<b>77,17</b>	<b>2.739</b>	<b>46,60</b>	<b>4.976</b>	<b>84,65</b>	<b>326</b>	<b>5,55</b>	<b>2,14</b>	<b>16.098</b>	<b>12.974</b>	<b>80,59</b>	<b>4.280</b>	<b>5.417</b>	<b>79,01</b>
Mato Grosso do Sul	1.035	3,95	57	8,76	1.063	40,58	863	81,19	552	51,93	826	77,70	65	6,11	2,48	2.271	1.972	86,83	649	779	83,31
Mato Grosso	3.285	10,19	196	24,05	2.645	82,03	2.040	77,13	1.258	47,56	2.097	79,28	132	4,99	4,09	7.164	5.550	77,47	1.808	2.436	74,22
Goiás	1.351	2,07	82	5,39	1.890	28,97	1.421	75,19	782	41,38	1.796	95,03	115	6,08	1,76	6.158	5.003	81,24	1.686	2.050	82,24
Distrito Federal	303	1,06	26	4,18	280	9,82	212	75,71	147	52,50	257	91,79	14	5,00	0,49	505	449	88,91	137	152	90,13

Fonte: Sinan(S)/S/MS

<sup>1</sup>Coeficiente por 100.000/habitantes em menores de 15 anos

<sup>2</sup>Coeficiente por 100.000/habitantes

Dados disponíveis em 18/08/2015

**Figura 1 – Tabela do Ministério da Saúde com Indicadores operacionais e epidemiológicos de Hanseníase de 2014.**

Fonte: Ministério da Saúde.

Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/27/Dados-2014---final.pdf>

Acesso em 20/01/2016

Uma queda na taxa de detecção de casos novos vem sendo detectada ao longo dos anos, comprovando a eficiência da poliquimioterapia para o controle epidemiológico da hanseníase. Da mesma forma, aponta para uma melhora da situação epidemiológica a queda dos índices de detecção da doença em menores de 15 anos de idade (Figura 2). Todavia, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste ainda demonstram indicadores desfavoráveis em relação às regiões Sul e Sudeste, atuando como áreas importantes para a manutenção da transmissão (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

No mundo, em 2013, 215.656 novos casos de hanseníase foram reportados a OMS. O país que reportou mais casos foi a Índia, com 126.913. Em segundo, veio o Brasil, com 31.044 casos e, em terceiro, a Indonésia, com 16.856 casos (WHO, 2014).

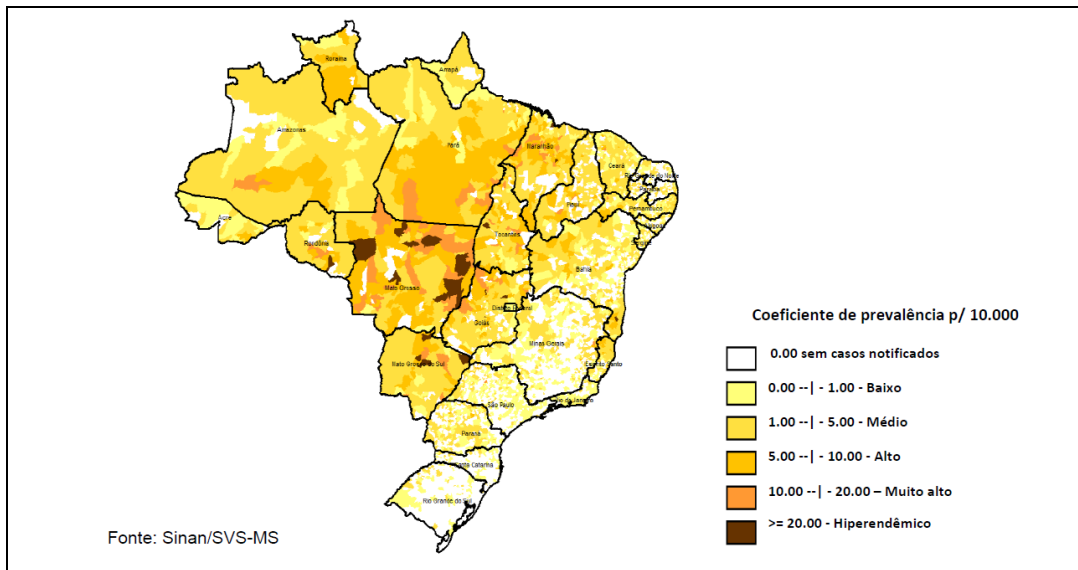
Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase Brasil 2000 - 2014												
Indicadores	Casos novos < 15 anos	Coefficiente de detecção < 15 anos	Casos novos geral	Coefficiente e detecção geral	Casos em registro ativo 31/12 de cada ano	Coefficiente e de prevalência	% de cura nas coortes	% de contatos examinados	% de avaliados quanto ao diagnóstico	Coefficient e GIF 2 por 100 habitantes	% de avaliados quanto ao GIF na cura	Unidades de saúde com pacientes em tratamento
Ano												
2000	3.378	6,72	43.196	25,44	79.933	4,71	83,0	60,9	83,2	1,52	57,8	3.327
2001	3.555	6,96	45.874	26,61	68.812	3,99	81,6	68,0	84,7	1,40	64,7	3.895
2002	3.862	7,47	49.438	28,33	75.624	4,33	75,8	52,7	84,2	1,47	63,1	4.640
2003	4.181	7,98	51.900	29,37	79.908	4,52	69,3	43,9	84,9	1,45	60,9	5.493
2004	4.075	7,68	50.565	28,24	30.693	1,71	67,3	45,5	84,8	1,46	60,4	5.847
2005	4.010	7,34	49.448	26,86	27.713	1,48	69,2	49,7	85,5	1,40	58,9	6.526
2006	3.444	6,22	43.642	23,37	26.338	1,41	85,5	43,8	86,6	1,30	60,6	6.988
2007	3.048	6,07	40.126	21,19	41.549	2,11	81,1	49,8	83,0	1,72*	55,1	7.323
2008	2.913	5,89	39.047	20,59	39.115	2,06	81,3	54,7	88,2	1,39	67,8	7.492
2009	2.669	5,43	37.610	19,64	38.179	1,99	82,1	59,8	89,3	1,27	71,8	8.015
2010	2.461	5,36	34.894	18,22	29.761	1,56	82,6	57,7	89,4	1,17	72,9	9.155
2011	2.420	5,22	33.955	17,65	29.690	1,54	82,7	59,8	89,5	1,13	72,9	9.445
2012	2.246	4,81	33.303	17,17	29.311	1,51	85,9	74,5	88,6	1,15	71,3	9.593
2013	2.439	5,03	31.044	15,44	28.445	1,42	84,0	75,1	88,1	0,99	69,9	8.944
2014	2.341	4,88	31.064	15,32	25.738	1,27	82,7	76,6	86,9	1,01	70,8	8.579

Fonte: Sinan/SVS-MS; Tabela elaborada pela CGHDE/DEVIT/SVS-MS  
Dados disponíveis em 18.06.2015

Legenda: GIF= Grau de Incapacidade Física  
\* Grau de incapacidade em 2007 influenciado pela mudança no Sistema de Informação.

**Figura 2** – Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase no período de 2000 a 2014.

Fonte: Ministério da Saúde.  
Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/29/S--rie-Hist--rica-Hansen--ase-2000---2014.pdf>  
Acesso em 20/01/2016



**Figura 3** – Coeficiente de prevalência de hanseníase por município em 2013.

Fonte: Ministério da Saúde.

Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/19/Informe-Campanha-2-2015-maio.pdf>

(Acesso em 20/01/2016)

### 2.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, embasado no exame dermatoneurológico de pacientes com lesões de pele suspeitas ou comprometimento de nervos periféricos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Conforme a portaria do Ministério da Saúde nº 3.125, de 7 de outubro de 2010, que aprova as *Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase*, considera-se caso de hanseníase o paciente que apresenta um ou mais dos seguintes sinais cardinais:

- Lesão (ões) e/ou área (s) da pele com alteração de sensibilidade.
- Acometimento de nervo(s) periférico(s), com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas.
- Baciloscopia positiva de esfregaço intradérmico.

## 2.4. CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES

Todo paciente diagnosticado com hanseníase deve ser classificado para que se defina o esquema terapêutico a que será submetido. Os casos multibacilares recebem a poliquimioterapia padronizada, com rifampicina, dapsona e clofazimina, por doze meses. Os casos paucibacilares recebem a poliquimioterapia padronizada, com rifampicina e dapsona, por seis meses.

A classificação preconizada pela OMS e utilizada no Brasil é a classificação operacional, que divide os pacientes em paucibacilares, quando apresentam até cinco lesões de pele, e em multibacilares, quando apresentam seis ou mais lesões de pele (WHO, 2012). O Ministério da Saúde recomenda que, sempre que possível, seja realizada a baciloscopia de esfregaço dérmico como forma de auxiliar a classificação dos pacientes. Quando positiva, independentemente do valor logarítmico semi-quantitativo avaliado, a baciloscopia classifica o paciente como multibacilar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A indicação da baciloscopia como forma de auxiliar a classificação dos pacientes é um tema controverso. Para a OMS a baciloscopia positiva é um dos critérios cardinais para o diagnóstico, mas não deve ser utilizada para a classificação dos pacientes. De fato, o ponto forte da classificação operacional da OMS é prescindir de locais para coleta de esfregaço dérmico e de laboratórios para a coloração e leitura das lâminas de baciloscopia, facilitando o trabalho de campo (WHO, 2004).

Apesar de a classificação operacional ser a preconizada para a definição terapêutica, ela não é a mais frequentemente utilizada em estudos científicos. As manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase guardam uma importante relação com o estado imunológico dos pacientes e compõem um espectro de apresentações patológicas complexo demais para ser representado em sua totalidade pela dicotomia da classificação operacional.

As diferentes apresentações clínicas da doença estão correlacionadas com padrões distintos de resposta imunológica e variam de uma forma localizada e não-contagiosa, caracterizada por vigorosa resposta imune celular, até uma forma difusa e contagiosa, caracterizada pela substituição de resposta imune celular específica por exuberante resposta humoral. Entre esses extremos, formas clínicas intermediárias traduzem um espectro de variações deste balanço

celular-humoral da resposta imunológica suscitada pela micobactéria, dependendo do hospedeiro em que se encontra. Classificar a hanseníase conforme estas nuances permite prognosticar melhor a evolução dos pacientes, avaliar seu potencial para disseminação da doença e padronizar a elaboração e divulgação de estudos científicos e epidemiológicos (LOCKWOOD et al., 2007). Com este intuito, diferentes classificações foram propostas ao longo dos anos.

A classificação de Madrid, apresentada no VI Congresso Internacional de Hanseníase de Madrid em 1953, leva em conta morfologia das lesões cutâneas, manifestações neurológicas e baciloscopia dérmica (FERNANDEZ, 1954). Esta classificação, de valor histórico, divide a doença em duas formas polares estáveis, tuberculoide e virchowiana, e duas formas instáveis, indeterminada e dimorfa, que podem evoluir para uma das formas polares na dependência da resposta imunológica do doente. A classificação de Madrid foi significativa, ainda que não fundamental, para as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) prevalentes até 2002 (WHO, 1998; LOCKWOOD et al., 2007).

A classificação de Ridley e Jopling, de 1966, estreita a correlação entre as manifestações clínico-patológicas e o estado da resposta imunológica dos doentes e visa à padronização das classificações para fins de pesquisa (RIDLEY, 1974; GOULART e GOULART, 2008). Marca duas formas polares estáveis, tuberculoide (TT) e virchowiana (VV), e subdivide as formas intermediárias, imunologicamente instáveis, em dimorfa-tuberculoide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV). A forma indeterminada (IND) é aquela por meio da qual a doença se inicia, sua fase precoce, em que a inflamação cutânea é discreta. A classificação de Ridley e Jopling leva em consideração os aspectos clínico-morfológicos das lesões, os achados histopatológicos da biópsia, o resultado da baciloscopia dérmica e o resultado da intradermoreação de Mitsuda.

Apesar de a classificação da OMS se mostrar um sucesso do ponto de vista operacional, diferentes trabalhos apontam suas falhas (PARDILLO et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2012; GUPTA et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Em um estudo realizado na Índia, com 100 pacientes, 31,6% dos considerados paucibacilares pela classificação operacional tinham baciloscopia positiva ou exame anatomopatológico característico de formas multibacilares e teriam sido insuficientemente tratados se classificados apenas conforme o número de lesões cutâneas (GUPTA et al., 2012).

Imperfeições não são exclusividade da classificação operacional baseada na contagem das lesões de pele. Os estudos sobre a classificação de Ridley e Jopling, por exemplo, demonstram grande variação de concordância entre os componentes clínico e histopatológico envolvidos no sistema (RIDLEY e JOPLING, 1966; SEHGAL et al., 1980; CREE et al., 1988; BHATIA et al., 1993; KAUR et al., 1993; MOORTHY et al., 2001; SHARMA et al., 2008; MATHUR et al., 2011; MANADHAR et al., 2013). Em um estudo realizado na Índia, envolvendo 303 pacientes multibacilares, os autores observaram que, dos 178 pacientes clinicamente classificados com a forma DT, 73 (41%) foram reclassificados com outras formas por meio do exame histopatológico, sendo que dois destes pacientes foram reclassificados com a forma VV e 32 com a forma IND (LOCKWOOD et al., 2012).

## **2.5. ASPECTOS CLÍNICOS E BACILOSCÓPICOS DAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE**

### **2.5.1. FORMA INDETERMINADA**

Nesta forma clínica, as lesões são máculas hipocrômicas com alteração de sensibilidade ou apenas áreas de hipoestesia na pele sem alterações à ectoscopia. As lesões são encontradas em pequeno número e frequentemente somente a sensibilidade térmica encontra-se alterada. Não há comprometimento de nervos periféricos. A baciloscopia dérmica é negativa. É considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase e, após período que varia de poucos meses a anos, ocorre evolução para cura, em até 75% dos casos, ou para outra forma clínica (ARAÚJO, 2003; AGRAWAL et al., 2005; WALKER e LOCKWOOD, 2007).

### **2.5.2. FORMA TUBERCULOIDE**

Nesta forma, há lesões de margens bem delimitadas, em número reduzido, anestésicas e de distribuição assimétrica. Geralmente tomam a forma de placas compactas ou formas anulares em que as bordas são papulosas e o centro eritematoso ou hipocrômico. O espessamento dos nervos periféricos é precoce e pode evoluir com dano neural precoce e grave. Geralmente os nervos afetados situam-se em regiões próximas às lesões. A baciloscopia é negativa. As formas TT e IND constituem as formas paucibacilares da hanseníase (MOSCHELLA, 2004; WALKER E LOCKWOOD, 2007).

### 2.5.3. FORMA VIRCHOWIANA

Esta forma multibacilar corresponde ao polo de baixa resistência, em que os pacientes apresentam imunidade celular deprimida para *M. leprae*. Acredita-se que possa evoluir da forma IND ou se apresentar como tal desde o início. Há infiltração progressiva e difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos e mesmo de outros órgãos como linfonodos, fígado e baço. Observam-se pápulas, nódulos e máculas. A pele torna-se brilhante, xerótica e pode adquirir tonalidade semelhante à do cobre. Há rarefação dos cílios e supercílios. O acometimento de nervos periféricos é lento, simétrico e progressivo e os pacientes não tratados sofrerão deficiências funcionais e sequelas tardias. A baciloscopia dérmica é fortemente positiva (ARAÚJO, 2003; MOSCHELLA, 2004).

### 2.5.4. FORMAS DIMORFAS

Representam as formas de instabilidade imunológica, o que se traduz em grande variação de manifestações clínicas. As lesões são numerosas e sua morfologia mescla aspectos das formas polares, TT e VV. Geralmente os pacientes apresentam placas eritematosas, máculas hipocrômicas de bordas ferruginosas, máculas eritematosas ou acastanhadas. As lesões anulares costumam apresentar delimitação interna nítida e delimitação externa imprecisa e são chamadas foveolares. A neuropatia é precoce, assimétrica e as incapacidades físicas decorrentes são comuns. A baciloscopia pode ser negativa ou positiva (MOSCHELLA, 2004; LOCKWOOD et al., 2007).

### 2.5.5. SURTOS REACIONAIS

Surtos reacionais são reações inflamatórias sofridas pelos doentes durante o curso crônico da hanseníase. Seu reconhecimento é muito importante para a estratégia de prevenção de incapacidades físicas pois, durante os surtos, a neurite periférica é mais comum. Podem assumir diferentes características. Os tipos mais importantes são reação reversa ou reação do tipo 1 e eritema nodoso da hanseníase ou reação do tipo 2. Podem ser desencadeados por infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, medicamentos, estresse físico ou psicológico. Podem anteceder o diagnóstico de hanseníase, surgir durante o tratamento ou mesmo após a alta do paciente. A reação do tipo 1, mais comum na forma dimorfa, é mediada por imunidade celular e se caracteriza por piora das lesões pré-existentes, que se tornam mais edemaciadas e



eritematosas. Podem surgir lesões novas à distância e neurites são frequentes, podendo até mesmo ser a única manifestação clínica. A reação do tipo 2, que ocorre nas formas VV e dimorfa, é mediada por imunidade humoral e desencadeada por deposição de imunocomplexos. É típico o eritema nodoso hansênico, caracterizado por nódulos eritematosos dolorosos localizados em qualquer região da pele. Pode haver neurite, orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, linfadenite, proteinúria e dano hepático.

## **2.6. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DAS DIFERENTES FORMAS DE HANSENÍASE**

### **2.6.1. FORMA INDETERMINADA**

Os casos de forma IND demonstram, ao estudo anatomopatológico com coloração hematoxilina-eosina (HE), infiltrado inflamatório linfohistiocítico superficial e profundo com sugestiva tríplice distribuição, ou seja, de localização perivascular, perianexial e perineural (Figura 4, A e B). Geralmente não são encontradas micobactérias ao estudo com coloração de Wade (RIDLEY, 1974).

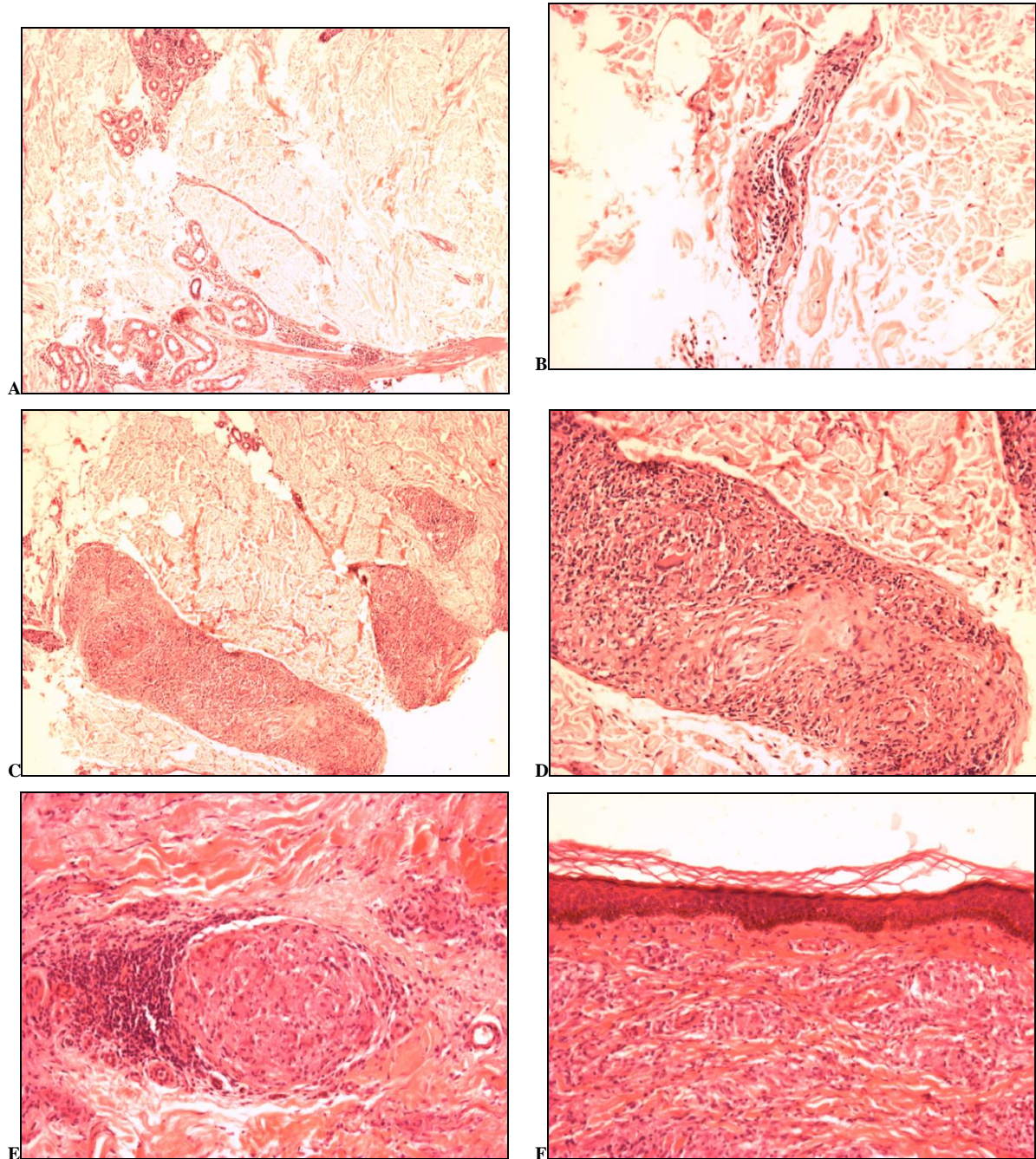
### **2.6.2. FORMA TUBERCULOIDE**

Os casos de forma TT apresentam infiltrado inflamatório composto por granulomas de células epitelioides, acompanhados de abundantes linfócitos. Nestes casos, podem estar presentes sinais de resposta imunológica celular hiperérgica: erosão epidérmica ou necrose caseosa de filete nervoso ou a combinação de presença de células gigantes e ausência de zona subepidérmica hipocelular (Figura 4, B e C). O índice baciloscópico histológico destes pacientes é zero (RIDLEY, 1974).

### **2.6.3. FORMA DIMORFA-TUBERCULOIDE**

As lesões dos pacientes classificados com forma DT também apresentam à microscopia um infiltrado inflamatório composto por granulomas de células epitelioides. Como regra, são vistos quantidade moderada de linfócitos e, por vezes, células gigantes (Figura 4, D e E). Todavia, estas lesões não apresentam, conjuntamente, estas duas últimas características e

ausência de zona subepidérmica hipocelular, uma vez que esta tríade de combinação direciona para a classificação TT (RIDLEY, 1974). O índice baciloscópico varia de zero a dois.



**Figura 4:** Microfotografias de lâminas utilizadas para a classificação de Ridley e Jopling – TT/DT/IND (HE). A/B- Forma indeterminada: infiltrado linfohistiocítico de distribuição perianaxial, perivascular, perineural. C/D- Forma tuberculoide: infiltrado granulomatoso de células epitelioides com a presença de células gigantes e acometimento de um filete neural, com necrose caseosa. E/F- Forma dimorfa-tuberculoide: infiltrado granulomatoso semelhante ao da forma tuberculoide, mas que permite o discernimento de estreita zona hipocelular subepidérmica. A/C: aumento de 40x. B/D/E/F: aumento de 100x. **Fonte: imagens do NIPE.**

2.6.4. FORMA DIMORFA-DIMORFA

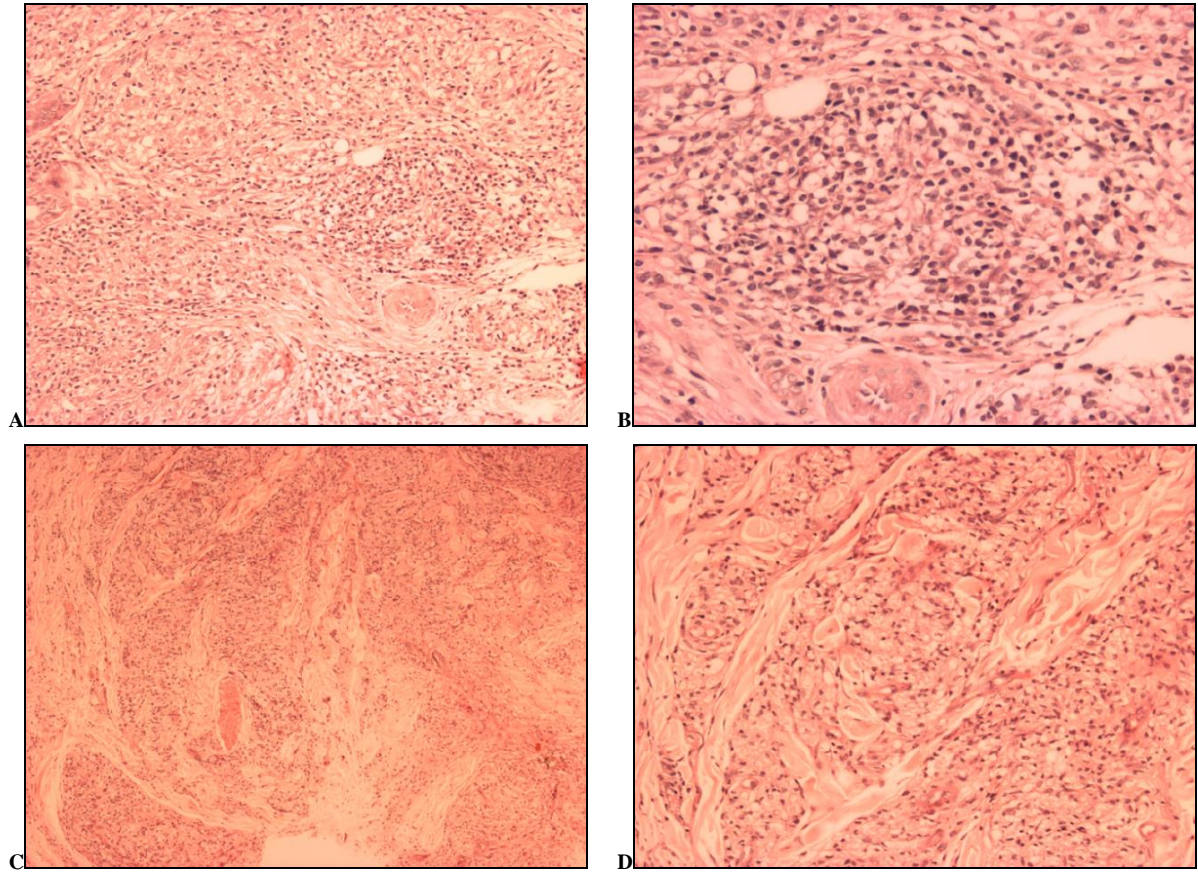
O diagnóstico histopatológico da forma DD requer o encontro de granulomas de células epitelioides, sem a presença de células gigantes multinucleadas e com a presença apenas discreta e escassa de linfócitos. O índice baciloscópico varia de 3 a 4,5 (RIDLEY, 1974).

#### 2.6.5. FORMA DIMORFA-VIRCHOWIANA

As lesões de forma DV demonstram infiltrado inflamatório predominantemente composto por macrófagos e zona subepidérmica hipocelular. Raros aglomerados de células epitelioides são vistos e o infiltrado linfocitário é abundante em alguns casos (Figura 5, A e B). O índice baciloscópico varia entre quatro e cinco (RIDLEY, 1974).

#### 2.6.6. FORMA VIRCHOWIANA

Os casos classificados como forma VV têm em comum infiltrado inflamatório composto por macrófagos espumosos, ausência de células epitelioides, raros linfócitos e clara zona subepidérmica hipocelular (Figura 5, C e D). O índice baciloscópico histológico destes pacientes é de seis (RIDLEY, 1974).



**Figura 5:** Microfotografias de lâminas utilizadas para a classificação de Ridley e Jopling – DV/VV (HE). A/B- Forma dimorfa-virchowiana: infiltrado predominantemente composto por macrófagos, rico em linfócitos. C/D- Forma virchowiana: infiltrado predominantemente composto por macrófagos espumosos e pobre em linfócitos. A/C: aumento de 40x. B/D: aumento de 100x. **Fonte:** imagens do NIPE.

## 2.7. A IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS

Os estudos em hanseníase contribuíram muito para o desenvolvimento da imunologia. Esta revisão da literatura a respeito do processo inflamatório associado à hanseníase permite acompanhar o desenvolvimento da própria imunologia e será detalhada nos próximos itens. De forma resumida, os estudos da década de 1960 foram marcados pelos testes de transformação linfocitária, como os utilizados por Ridley quando da elaboração da classificação de Ridley e Jopling. Os trabalhos da década de 1970 envolveram a diferenciação entre linfócitos B (LB) e T (LT) no sangue periférico dos doentes. Um dos motivos mais presentes entre os grupos de pesquisa era tentar explicar a anergia celular característica dos pacientes com a forma VV.

A década de 1980 foi marcada pelos estudos de imunofenotipagem das células inflamatórias *in situ* nas lesões de pele de hanseníase. Naquele momento, já se colocava como maior desafio a imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T, inicialmente, buscando-se a diferenciação entre os linfócitos T-*helper* e T-supressores. A grande inovação dos trabalhos daquela época foi a utilização de marcadores antigênicos específicos para as subpopulações linfocitárias. O uso de eritrócitos de cabra para a formação de rosetas eritrocitárias com os linfócitos e macrófagos saiu de cena e deu lugar à imuno-histoquímica com anticorpos específicos para o tipo celular desejado.

Ao conhecimento dos tipos celulares presentes nas lesões de pele de hanseníase, somaram-se, na década de 1990, as descobertas advindas do estudo das citocinas inflamatórias envolvidas na resposta imunológica à micobactéria. Estudos feitos na pele dos pacientes com hanseníase permitiram confirmar a existência, também no ser humano, do paradigma Th1 x Th2, postulado, poucos anos antes, com base em observações feitas em ratos. Este paradigma diz respeito à existência de dois dicotômicos perfis de citocinas e moldou a maneira de se interpretar a resposta imunológica a microrganismos intracelulares. Células T produtoras de IL-2 e INF-gama são denominadas Th1 e induzem a atividade microbicida de macrófagos, conferindo resistência à infecção. Por outro lado, células T produtoras de IL-4, IL-5 e IL-10 são denominadas Th2 e estimulam a resposta humoral, ao mesmo tempo em que suprimem a imunidade mediada por células (MOSMANN et al., 1986; MODLIN et al., 1994).

Na década de 2000, foram publicadas boas revisões sobre o conhecimento acumulado nos anos anteriores. Naquele momento, apesar de os trabalhos novos sobre linfócitos T diminuírem em quantidade, as pesquisas sobre a importância de outros tipos celulares ganharam força. São da década de 2000 os estudos sobre a importância dos LB e dos mastócitos nas lesões de pele da hanseníase. Aprofundou-se o conhecimento sobre as citocinas envolvidas e seus receptores.

Mais recentemente, na atual década de 2010, especial atenção tem sido dada a uma população específica de linfócitos T, os linfócitos T reguladores ( $T_{regs}$ ), importantes para regulação da auto-reatividade cutânea, do controle inflamatório em doenças inflamatórias crônicas e da imunossupressão em tipos específicos de leishmaniose tegumentar americana. Concomitantemente, especial atenção tem sido dada aos macrófagos presentes nas lesões cutâneas de hanseníase, seus subtipos e suas funções.

#### 2.7.1. ESTUDOS EM SANGUE PERIFÉRICO PRECEDERAM ESTUDOS *IN SITU*

Os primeiros trabalhos sobre imunofenotipagem de linfócitos em hanseníase focaram as diferenças numéricas entre as populações B e T no sangue periférico dos pacientes. Naquela época já se sabia que os linfonodos dos pacientes com a forma VV, examinados em necropsias, apresentavam substituição da região paracortical por histiócitos. Sabia-se, também, que o sangue periférico destes pacientes era rico em imunoglobulinas. A contagem de linfócitos era feita de acordo com a formação de rosetas eritrocitárias. Os LT formam rosetas com eritrócitos de ovelha. Os LB formam rosetas com eritrócitos humanos sensibilizados com a fração C3 do complemento ou com anticorpos.

Em 1973, Gajl-Peczalska et al. quantificaram os LB no sangue periférico de nove pacientes com a forma VV e encontraram aumento absoluto e relativo de LB, de 60 a 85%, em cinco dos pacientes. Os autores atribuíram o comprometimento da resposta imunológica celular associado à forma VV à substituição de LT por LB, consequente às alterações linfonodais relatadas anteriormente (GAJL-PECZALSKA et al., 1973). Em 1974, Mendes et al. obtiveram resultados diferentes ao estudar 36 pacientes com a forma VV e constatar que a quantificação relativa de ambas as populações B e T estava diminuída em comparação aos controles saudáveis (MENDES et al., 1974). Estes resultados foram corroborados por aqueles de Rea et al., que, em 1983, utilizando anticorpos monoclonais e citometria de fluxo,

encontraram linfopenia no sangue periférico de pacientes com a forma VV, bem como diminuição da contagem de LT e diminuição da relação entre LT *helper*/LT supressores (REA et al., 1983).

### 2.7.2. A IMUNOFENOTIPAGEM LINFOCITÁRIA *IN SITU* NA DÉCADA DE 1980

Em 1977, de forma pioneira, Ridley et al. utilizaram a técnica de formação de rosetas eritrocitárias para estudar o infiltrado inflamatório nas lesões de pele de hanseníase. Diferentemente dos trabalhos em sangue periférico, os autores não obtiveram boa marcação dos linfócitos com a técnica de rosetas eritrocitárias (RIDLEY et al., 1978). De fato, algumas das conclusões obtidas neste trabalho foram contraditas por estudos subsequentes realizados por outros grupos. A mais interessante delas era a que apontava para uma predominância de LB no infiltrado inflamatório da forma VV, antagônica a uma predominância de LT na forma TT. Sabe-se, desde os trabalhos de Gupta et al., em 1982, que os LT predominam sobre os LB no infiltrado inflamatório de qualquer uma das formas de hanseníase (GUPTA et al., 1982).

Na década de 1980 ainda se buscavam evidências morfológicas de que a imunidade celular era associada à forma TT enquanto a imunidade humoral era associada à forma VV da hanseníase. As pesquisas nesta direção foram capitaneadas pelo grupo estadunidense de Modlin et al.. Utilizando anticorpos monoclonais anti-Leu 3 (anti-CD4) e anti-Okt8 ou anti-Leu2 (anti-CD8), estes pesquisadores demonstraram, pela primeira vez, a existência do hoje consagrado padrão de distribuição espacial dos linfócitos T dentro dos granulomas típicos da hanseníase. Nas lesões da forma TT os LT CD4 estão distribuídos por todo o granuloma, enquanto os LT CD8 estão restritos ao seu manto linfocitário. Por outro lado, nas lesões da forma VV, o padrão de distribuição das subpopulações de linfócitos T é anárquico (MODLIN et al., 1982; MODLIN et al., 1983a).

Este padrão de distribuição espacial dos linfócitos T no granuloma epitelióide das formas DT e TT também foi observado na sarcoidose. O padrão anárquico da distribuição de células T no infiltrado inflamatório das formas VV e DV se assemelha mais ao que ocorre no rinoscleroma (MODLIN et al., 1983b).

Modlin et al. também demonstraram que, no eritema nodoso hansênico, cuja patogênese é classicamente associada à formação de imunocomplexos e à preponderância de imunidade

humoral, também ocorre um fortalecimento da resposta imune celular. Estes autores mostraram que, na pele de pacientes com hanseníase VV e eritema nodoso hansênico, há predomínio dos linfócitos T *helper* – CD4 – frente aos T supressores/citotóxicos – CD8. A relação Th/Ts nos pacientes com hanseníase VV e eritema nodoso é de 2,1; já nos pacientes com a forma VV sem eritema nodoso a relação é de 0,8 (REA et al., 1983).

A relação quantitativa entre LT CD4 e LT CD8, encontrada nas diferentes formas de hanseníase, variou pouco entre os diferentes grupos de pesquisa. Narayanan et al. relataram que, nas lesões da forma TT, 70% dos linfócitos são do tipo T. Destes, 61% são CD4 e 27% são CD8. Nas lesões da forma VV, de forma condizente com o esperado pela classificação de Ridley e Jopling, os autores relataram que os linfócitos quase não são detectados (NARAYANAN et al., 1986). Para o grupo de Modlin, as células T (CD3<sup>+</sup>) representam 61% de todas as células componentes do infiltrado inflamatório das formas TT/DT e 40% da forma DV/VV. Em 1987, eles calcularam uma relação CD4/CD8 de 1.7 nas formas TT/DT e 0,6 nas formas DV/VV (MODLIN et al., 1988).

Utilizando anticorpos monoclonais para diferenciar subpopulações de células T CD4 e subpopulações de células T CD8, Modlin et al. relataram uma relação Th/Ts de 10:1 a 14:1 nos casos da forma TT e de 1.1:1 a 1.4:1 nos casos da forma VV. Estes autores foram os primeiros a perceber que, interessantemente, a relação Th/Ts em sangue periférico era de cerca de 2:1 em ambos os grupos. Observando este aparente paradoxo, eles hipotetizaram que os LT *helper* devem sofrer uma seleção tipo *homing* para a pele ou, então, retenção ou proliferação seletivas na pele nos casos da forma TT. Ou seja, as células inflamatórias das lesões de pele de hanseníase passavam a ser vistas não apenas como um “filtrado” do sangue periférico, mas, sim, como populações próprias, que sofrem e exercem efeitos sobre as demais de modo único. Esta observação fortaleceu a necessidade de se estudar o processo inflamatório *in situ* (DEWEESE et al., 1987; MODLIN et al., 1988).

A imunofenotipagem de subpopulações de células T CD4 e subpopulações de células T CD8, permite diferenciar os linfócitos CD4 em *helpers* (2H4<sup>-</sup>/4B4<sup>+</sup>) e “indutoras/supressoras” (2H4<sup>+</sup>/4B4<sup>-</sup>) e os linfócitos CD8 em “supressores” (9.3<sup>-</sup>) e “citotóxicos” (9.3<sup>+</sup>). Modlin et al. demonstraram que as células CD4 “indutoras/supressoras” são raras e correspondem a 5% de todas as células do infiltrado inflamatório das formas TT ou VV. As células CD4 *helpers* correspondem a mais de 60% das células nas biópsias de forma TT e menos de 40% nas



biópsias de forma VV. Ou seja, uma marcação positiva para CD4 indica, muito provavelmente, a presença de um LT *helper*. Quanto às células CD8, os autores relataram ser do tipo citotóxico 16% de todos os linfócitos na forma VV e 38% na forma TT. Na forma TT cerca de 80% das células CD8 são do tipo citotóxico, enquanto na forma VV cerca de 70% das células CD8 são do tipo supressor (MODLIN et al., 1988).

Em 1987, Modlin et al. identificaram um antígeno de ativação em linfócitos T cuja expressão se relacionava com a forma de hanseníase manifesta pelo paciente. Os autores demonstraram que o antígeno Ta1 apresentava expressão aumentada nos linfócitos das lesões de forma TT em comparação às lesões de forma VV. Mais de 90% das células Ta1<sup>+</sup> são do tipo CD4. Até então, os marcadores de ativação linfocitária existentes (IL-2 e seu receptor) não haviam mostrado expressão diferente nas várias formas de hanseníase (SHEN et al., 1987). Sabe-se que o anticorpo anti-Ta1 é direcionado contra a molécula dipeptidil peptidase IV, também denominada CD26, um antígeno de superfície de linfócitos T CD4 ativados (BARTON et al., 1990).

### 2.7.3. A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA DÉCADA DE 1990

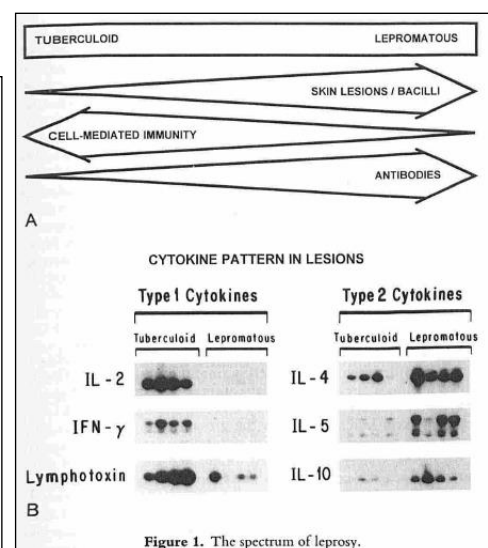
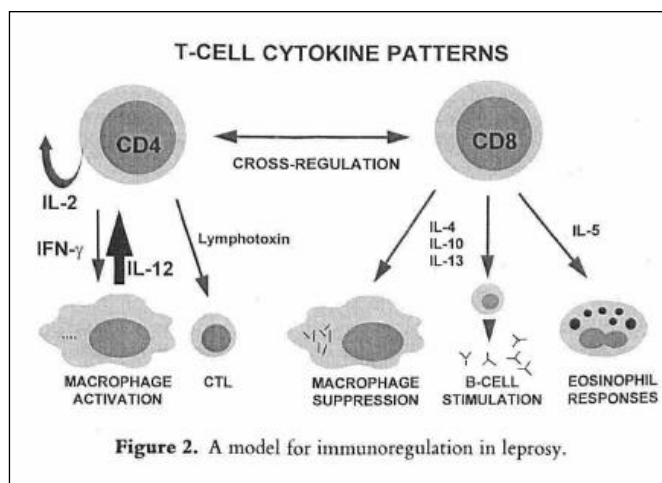
A década de 1990 foi marcada pelos estudos sobre as citocinas nas lesões de pele da hanseníase, estimulados pelo desenvolvimento da técnica PCR. Paralelamente, os trabalhos se aprofundavam na imunofenotipagem de linfócitos. Trabalhos iniciais com imunohistoquímica, na década anterior, demonstraram que a quantidade de células contendo IL-2, necessária à proliferação de LT, é maior nas lesões de pele da forma TT. Posteriormente, o mesmo foi demonstrado para INF-gama, IL-1-beta e TNF-alfa. Em 1989, a técnica de hibridização *in situ* possibilitou a demonstração de maiores quantidades de RNAm para INF-gama nas lesões da forma TT (SIELING e MODLIN, 1992).

Com a facilitação oferecida pela técnica de PCR, o padrão de citocinas nas diferentes formas de hanseníase pôde ser estudado mais a fundo. Foi demonstrada maior quantidade de RNAm de citocinas produzidas predominantemente por macrófagos (IL-1 beta, TNF-alfa, GM-CSF, IL-6) nas lesões de forma TT, bem como RNAm de linfocinas (IL-2, INF-gama, linfotoxina). Por outro lado, compondo o paradigma Th1xTh2, foi demonstrado que o RNAm de IL-4, IL-5, IL-10 é mais abundante nas lesões de formas VV (SIELING e MODLIN, 1992). Resultados

semelhantes foram encontrados por outros autores utilizando a técnica ELISA (MCCLEAN et al., 1994).

No campo da imunofenotipagem de linfócitos, especial atenção foi dada à diferenciação de LT conforme o tipo de receptor TCR expresso: alfa-beta ou gama-delta. Este receptor é importante para o reconhecimento antigênico pelas células T, em associação ao CD3. A maioria dos LT é do tipo alfa-beta. Uma pequena população periférica de LT tem TCR composto por cadeias gama-delta. Estes últimos são numerosos no tecido linfóide associado às mucosas e parecem estar envolvidos na primeira linha de defesa contra patógenos. Modlin et al. demonstraram que são mais frequentes em lesões de pele do teste de Mitsuda e em lesões de surto reacional tipo 1 (25-35% dos LT) do que em lesões cutâneas de outras formas da doença (5%) (MODLIN et al., 1989). Outros autores relataram que os LT gama-delta da hanseníase são mais frequentemente do tipo CD8 (MCCLEAN et al., 1994).

O papel fundamental da IL-12 produzida por macrófagos para o desenvolvimento da resposta celular eficiente da forma TT foi descrito na década de 1990. Foi demonstrado que a IL-12 induz a proliferação de LT responsivos a *M. leprae* levando à expansão de LT CD4 produtores de citocinas do polo Th1, mas não de LT CD8 produtores de citocinas do polo Th2 (FIGS. 6 e 7) (MODLIN, 1994).



**Figuras 6 e 7:** Resumo do conhecimento a respeito do perfil de citocinas envolvidas na resposta inflamatória das lesões cutâneas de hanseníase na década de 1990. Fonte: Modlin RL. Th1-Th2 paradigm – insights from leprosy. *Journal of Investigative Dermatology* 1994;102(6):828-32.

Estudando os linfócitos de pacientes com hanseníase foi descrita, pela primeira vez, em 1999, uma via alternativa de apresentação de antígenos. Até então, sabia-se que os LT CD4 reconheciam peptídeos expressos por meio de MHC de classe II e que LT CD8 reconheciam peptídeos expressos por meio de MHC de classe I. Sieling et al. descreveram uma terceira via, na qual LT CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> ou CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos *lipídicos* por meio da molécula CD1, característica de células apresentadoras de antígenos. Os autores demonstraram que células de Langerhans e células dendríticas CD1<sup>+</sup> são mais abundantes na forma TT (SIELING et al., 1999).

#### 2.7.4. IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE NA DÉCADA DE 2000

Em 2006, pela primeira vez, foram estudados, de forma sistemática, os LB nas lesões cutâneas de hanseníase. Iyer et al. demonstraram a presença de células B, de diferentes estágios de maturação, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD20, anti-CD79 e anti-CD138, nas lesões de forma VV e, em menor quantidade, nas lesões de forma DT. Também comprovaram que havia produção ativa de anticorpos específicos contra o *M. leprae* nas culturas de biópsias de pele, mesmo das lesões da forma DT (IYER et al., 2007). Estes achados parecem confirmar o conceito da imunologia segundo o qual a presença de anticorpos em quantidades corretas é importante para a formação dos granulomas epitelioides, mas, em quantidades excessivas, provoca comprometimento da imunidade celular. Neste trabalho, os autores também calcularam a relação CD4/CD8, obtendo valores semelhantes aos dos outros grupos de pesquisa. Nas formas VV e DV a relação foi de 0,6 a 0,3:1. Na forma DT a relação foi de 1,25 a 2,0:1.

Em 2008, Magalhães et al., com base em observações anteriores de seu grupo de pesquisa apontando para um aumento da quantidade de colágeno dérmico nas lesões de hanseníase VV, estudaram a participação dos mastócitos no infiltrado inflamatório das lesões de pele da hanseníase. Utilizado anticorpos anti-triptase e coloração imuno-histoquímica, estes autores demonstraram que a quantidade de mastócitos nas lesões das formas TT e DT é semelhante ao esperado para a pele normal (60-100 células / mm<sup>2</sup>). Nas lesões da forma VV encontraram um valor um pouco reduzido (50 células / mm<sup>2</sup> - DP 50). Todavia, os autores observaram que os mastócitos das lesões da forma VV são mais volumosos que os da forma TT e hipotetizaram que este maior volume significaria maior atividade dos mastócitos da forma VV (MAGALHAES et al., 2008).

Em 2008, Mendonça et al. realizaram marcação para receptores de quimiocinas CXCR4, CCR2 e CCR5 em linfócitos de sangue periférico de pacientes com hanseníase para quantificação por citometria de fluxo. A única marcação que se mostrou elevada nos pacientes em relação aos controles saudáveis foi a de células  $CD4^+CCR2^+$  (MENDONÇA et al., 2008).

#### 2.7.5. O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E OS TRABALHOS NA DÉCADA 2010

Na década atual, a composição e atividade do infiltrado inflamatório da hanseníase continua motivando laboratórios de todo o mundo. Continua a busca por um modelo experimental de hanseníase, além do modelo desenvolvido em tatus experimentalmente infectados e do modelo em pata de camundongo. Em 2011, Crawford et al. descreveram um modelo experimental em ratos, induzindo a formação de reação granulomatosa epitelióide com um antígeno não-mielínico proveniente de nervos periféricos humanos. Observando este modelo, os autores ressaltaram a presença de células plasmocitóides dendríticas, tidas como precursoras das células epitelióides. Apesar de já terem sido descritas em outras doenças granulomatosas, os autores ressaltaram que estas células, reconhecidas por características especiais na microscopia eletrônica, ainda não haviam sido descritas em hanseníase (CRAWFORD e HARDWICKE, 2011).

Em 2011, Massone et al. perfizeram as marcações imuno-histoquímicas já consagradas, para imunofenotipar o infiltrado inflamatório de pacientes co-infectados com hanseníase e HIV. Apesar do comprometimento imunológico associado à infecção por HIV, acredita-se que a apresentação clínica da hanseníase, em suas diferentes possíveis formas, se mantenha inalterada em comparação aos pacientes sem HIV, sem que haja uma tendência à preponderância das formas multibacilares. Ou seja, paradoxalmente, a imunidade celular dos pacientes HIV positivos está comprometida frente à tuberculose e preservada frente à hanseníase, sem que se tenha ainda uma explicação para esta questão.

Uma das observações mais importantes do trabalho destes autores foi o encontro de predominância absoluta de LT CD8 nas lesões dos pacientes co-infectados – cerca de 99,4% dos linfócitos das lesões eram  $CD8^+$  – independente da forma de hanseníase apresentada. Cerca de 75% dos LT CD8 eram do tipo citotóxico ( $TIA-1^+$ ). Não havia comprometimento da capacidade de formação de granulomas epitelióides nos pacientes co-infectados. Paralelamente, os autores demonstraram a presença de  $T_{regs} FOXP3^+$ , em porcentagem

semelhante à dos pacientes sem HIV (3 a 4% dos linfócitos). A marcação para LB foi positiva em 12 das 15 amostras (compostas, em sua maioria, por casos da forma DT). A pesquisa de células dendríticas plasmocitóides foi negativa em todas as amostras (o anticorpo utilizado foi anti-CD123) (MASSONE *et al.*, 2011).

Até hoje, há dúvidas sobre o papel dos T<sub>regs</sub> na hanseníase. Parente et al. estudaram, por meio de imuno-histoquímica, as biópsias de pele de 96 pacientes, representando todas as formas de hanseníase, incluindo surtos reacionais. Observaram que os T<sub>regs</sub> compunham cerca de 2,8% das células do infiltrado inflamatório e que estavam presentes nas amostras de todos os pacientes. Os autores só detectaram aumento de T<sub>regs</sub> nas biópsias de pele representativas de surtos reacionais tipo 1 (PARENTE et al., 2015).

A importância dos T<sub>regs</sub> nas lesões de hanseníase foi estudada mais a fundo por Saini et al. em 2014. Os autores tentaram relacioná-los à anergia específica ao *M.leprae* típica da forma VV. Foram realizados estudos de imuno-histoquímica, qPCR e citometria de fluxo em biópsias de pele e culturas de células mononucleares de sangue periférico de 56 pacientes com forma DT ou VV. Foi demonstrado aumento da positividade para FOXP3, TGF-beta e IL-10 nas biópsias e nas culturas de pacientes com forma VV. Os autores concluíram que as células CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, que secretam TGF-beta, são importantes para a anergia específica ao *M.leprae* apresentada pelos pacientes da forma VV (SAINI et al., 2014).

## 2.8. A IMUNOFENOTIPAGEM DE MACRÓFAGOS

Acredita-se que, frente a um antígeno, a diferenciação da célula CD4 *naive* em célula T *helper* (Th1) ou T efetora (Th2) seja fortemente influenciada pelo meio, especialmente pelas citocinas que o compõem. Sabe-se que a IL-12 é produzida por células dendríticas e macrófagos e é uma citocina fortemente indutora de células Th1, enquanto a IL-4 é fortemente indutora de células Th2 (SEDER et al., 1993; O'GARRA, 1998). O linfócito Th1 está envolvido com a formação de uma resposta imune celular e com a ativação de macrófagos e secreta IL-2 e INF-gama. O linfócito Th2 está envolvido com a formação de uma resposta imune humoral e secreta IL-4, IL5 e IL-13 (ABBAS et al., 1996).

Os TLR são receptores celulares envolvidos com a resposta inata e se ligam a microrganismos e antígenos. Sabe-se que estes receptores também estão envolvidos com a regulação da

imunidade adaptativa, especialmente com a indução de uma resposta do tipo Th1. Os TLR dos macrófagos são necessários para sua ativação e consequente produção de citocinas quando do início de uma resposta imune inata (SCHNARE et al., 2001).

Em 2002, Anderson e Mosser demonstraram que o TLR é fundamental para a ativação dos macrófagos e a consequente produção de IL-12, citocina imprescindível à indução de uma resposta Th1. Estes pesquisadores demonstraram que a ligação de imunocomplexos ao receptor *Fc* dos macrófagos muda completamente sua resposta ao reconhecer antígenos por meio do TLR. Os macrófagos com receptores *Fc* ligados a imunocomplexos passam a produzir mais IL-10 e menos IL-12 e a induzir, assim, uma resposta Th2. Os autores foram os primeiros a denominar este novo fenótipo de macrófago ativado de “macrófago tipo 2”, em alusão a sua capacidade de induzir a resposta imunológica do tipo Th2 (ANDERSON e MOSSER, 2002). O reconhecimento da importância dos TLR ressaltou o papel dos macrófagos na definição do paradigma Th1xTh2 e apontou novas possíveis explicações para a anergia celular associada à forma VV da hanseníase, há muito tempo estudada.

Um dos primeiros grupos de pesquisadores a atribuir aos macrófagos um papel principal no mecanismo da anergia celular observada na forma VV foi o de Bird et al., em 1979. Os autores observaram que a cultura de macrófagos de pacientes com a forma VV, quando exposta ao *M.leprae*, produz um fator solúvel capaz de inibir os testes de transformação linfocitária de pacientes saudáveis (BIRD et al., 1980).

Em 1982, Gupta et al. observaram que os macrófagos do infiltrado inflamatório das lesões das formas TT e VV não diferiam quanto à formação de rosetas eritrocitárias indicadoras da presença de receptores para *Fc* e para o fator C3 do complemento. Todavia, os pesquisadores perceberam que os macrófagos da periferia dos granulomas formavam mais rosetas eritrocitárias e marcavam menos para esterase, por meio de imuno-histoquímica, que os macrófagos do centro dos granulomas. Eles propuseram que os macrófagos estariam perdendo receptores à medida que maturavam em direção ao centro do granuloma e passavam a expressar maior ativação que as células da periferia (GUPTA et al., 1982).

Com o macrófago tipo 2 descrito por Mosser et al., em 2002, os macrófagos puderam ser classificados em três tipos principais: o macrófago classicamente ativado, o macrófago tipo 2 e o macrófago alternativamente ativado (Quadro 1) (MOSSER, 2003). Este último foi descrito

em 1992, por Stein et al., e é resultante do estímulo com IL-4. Não apresenta a atividade microbicida do macrófago classicamente ativado, produz componentes da matriz extracelular e é importante para o reparo tecidual (STEIN et al., 1992).

	<b>Clássico</b>	<b>Alternativo</b>	<b>Tipo 2</b>
<b>Ativação</b>	INF-gama, TNF	IL-4	Ligação TLR Imunocomplexos
<b>Citocinas secretadas</b>	IL-12, TNF	IL-10	IL-10
<b>Marcadores</b>	↑ MHCII ↑ CD86 ↓ Receptor de manose	↑ Receptor de manose ↑ CD23 CD163 ↓ CD14	↑ MHCII ↑ CD86 (sem marcadores específicos)
<b>Moléculas microbicidas</b>	NO, O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	-

**Quadro 1** – Os três tipos principais de macrófagos.

Fonte: Mosser DM. *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol. 2003;73(2):209-12. PubMed PMID: 12554797

Quase quinze anos após a descrição dos três tipos principais de macrófagos, ainda não há consenso na literatura e é comum o encontro de referências a apenas dois polos: macrófagos M1, ou classicamente ativados, e macrófagos M2, ou alternativamente ativados. Um dos problemas dessa forma de classificação é que as novas populações de macrófagos que vem sendo descritas estão sendo alocadas, todas, no grupo M2 (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Em 2008, Mosser e Edwards publicaram uma revisão na qual propuseram a divisão das populações de macrófagos em três grupos, conforme suas funções homeostáticas: defesa, reparo tecidual e regulação imunológica. De forma interessante, os autores compararam estes três grupos a três cores básicas da luz, que permitem, no espectro de comprimentos de onda existentes entre elas, a alocação de uma variedade de outras populações de macrófagos com nuances espectrais próprias (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Naquela revisão, foi detalhado como os três grupos básicos surgem e como se diferenciam em suas funções. Todos eles podem ser induzidos a partir de estímulos associados à resposta

imunológica adaptativa ou inata. Os macrófagos classicamente ativados (grupo de defesa) exibem caracteristicamente atividade microbicida. Podem ser ativados, de forma inata, por IFN-gama secretado por células *natural killer* ou por TNF secretado por células apresentadoras de antígenos. De outra forma, podem ser induzidos, durante a resposta adaptativa, por IFN-gama secretado por células Th1. Neste sentido, os macrófagos classicamente ativados são uma expressão da imunidade mediada por células. Os macrófagos de reparo tecidual (até então denominados “alternativamente ativados”) podem ser induzidos pela IL-4, secretada durante a resposta inata, por basófilos ou mastócitos, ou durante a resposta adaptativa, por células Th2. Por sua vez, os macrófagos regulatórios estão associados à supressão da resposta imunológica e podem ser induzidos, durante a resposta inata, pela ligação de imunocomplexos, ligantes do receptor de proteína G, glicocorticoides, células apoptóticas ou prostaglandinas. Durante a resposta adaptativa, a IL-10 secretada por T<sub>regs</sub> é capaz de estimular a diferenciação deste grupo (Figura 8).

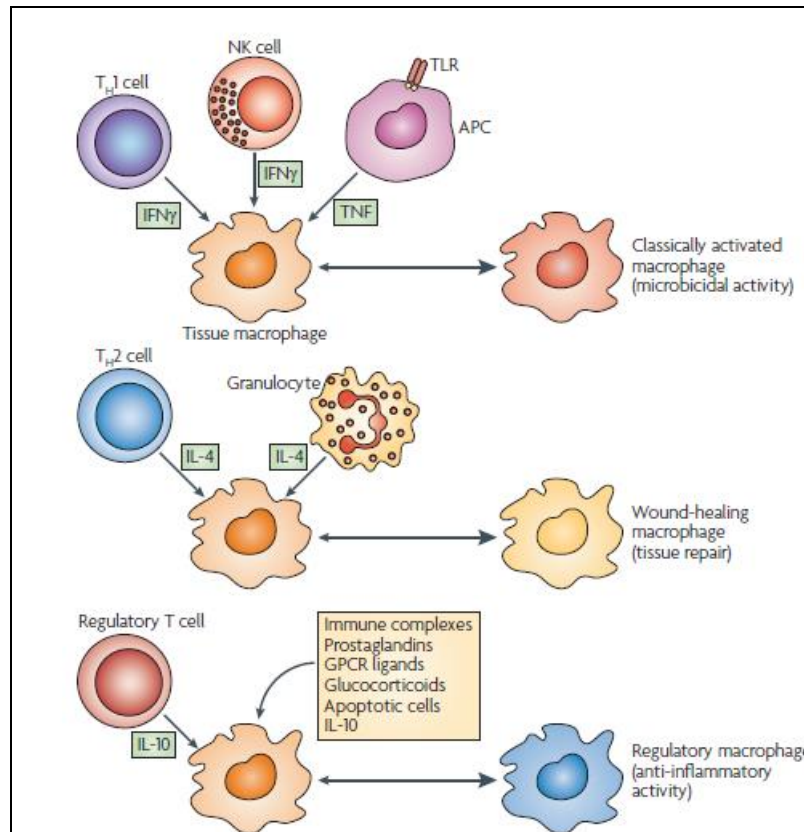
A maior parte dos novos fenótipos descritos no espectro de diferenciação dos macrófagos faz parte do grupo de macrófagos regulatórios. A principal diferença entre as várias populações desse grupo reside na forma como as células são induzidas experimentalmente. A maior semelhança, de fato sua característica mais marcante, é a capacidade de todas estas populações secretarem IL-10. Aumenta o número de trabalhos demonstrando como diferentes agentes infecciosos induzem a diferenciação dos macrófagos em macrófagos regulatórios. Mosser e Edwards apontaram a importância de se tentar definir marcadores específicos para as diferentes populações desse grupo, envolvidas, cada uma, com diferentes doenças.

Os macrófagos de reparo tecidual (alternativamente ativados) também foram relacionados à susceptibilidade à infecção por microrganismos intracelulares. Condições associadas ao predomínio da resposta imunológica do tipo Th2, que estimula a diferenciação dos macrófagos em macrófagos de reparo tecidual, favorecem o crescimento intracelular destes microrganismos (HARRIS et al., 2007; MÜLLER et al., 2007).

Mosser e Edwards ressaltaram que a imunofenotipagem de macrófagos é mais difícil que a de linfócitos, porque os primeiros exibem importante plasticidade fenotípica. Uma população de macrófagos pode ser induzida à diferenciação em uma nova população com função completamente diferente, mas pode reter os marcadores fenotípicos da população original. Os autores concluíram sua revisão reiterando a importância de se procurar definir os marcadores



específicos para cada uma das populações de macrófagos envolvida nas diferentes doenças, de modo a permitir, no futuro, a manipulação, depleção ou indução de populações alvo para o tratamento dessas condições (MOSSER e EDWARDS, 2008).



**Figura 8** – Os três grupos principais de macrófagos e as formas de indução de cada um. Fonte: Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448. PubMed PMID: 19029990; PubMed Central PMCID: PMC2724991

Os monócitos em sangue periférico também são dotados de plasticidade fenotípica e se adaptam a um estado quiescente no sangue periférico ou se diferenciam em fenótipo fagocítico, inflamatório ou anti-inflamatório dependendo dos estímulos a que são submetidos. Os subtipos de monócitos circulantes em camundongos já foram mais estudados que os subtipos humanos, mas há certa analogia entre eles. Nos camundongos, a população de monócitos se divide entre clássicos e não-clássicos, aproximadamente meio a meio. Nos humanos, 90% dos monócitos circulantes são do tipo clássico (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Em 2010 foi proposta uma nomenclatura consensual para os monócitos humanos de acordo com seus marcadores antigênicos e suas funções, sumarizada no quadro 2 (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

Subtipos	Marcadores de superfície	Receptores de quimiocinas	Função
<b>Clássico</b>	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	CCR2 <sup>high</sup> CX3CR1 <sup>low</sup>	Fagocitose
<b>Intermediário</b>	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	CCR2 <sup>mid</sup> CX3CR1 <sup>high</sup> CCR5 <sup>+</sup>	Pró-inflamatória
<b>Não-clássico</b>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>high</sup>	Patrulhamento

**Quadro 2** – Os três tipos de monócitos humanos.

Fonte: Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al.

Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. PubMed PMID: 20628149

O CD14 é um antígeno de superfície expresso em grande quantidade em monócitos e macrófagos. É considerado um marcador para estas células. O CD16 (Leu-11) é um receptor para a fração *Fc* das imunoglobulinas. Os monócitos que expressam CD16 são considerados um subtipo inflamatório e estão associados a aterosclerose e doença coronariana, além de apresentarem, em culturas, um perfil de citocinas inflamatório (PASSLICK et al., 1989).

O subtipo clássico tem alta atividade microbicida e fagocítica e secreta maior quantidade de radicais de óxido nítrico e IL-10. Durante a inflamação o monócito clássico migra para o sítio inflamado e se diferencia em macrófagos classicamente ativados, apresenta antígenos, ativa linfócitos T e realiza proteólise (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). O subtipo clássico expressa alta quantidade de CD62L (L-selectina), uma proteína de adesão associada à migração do sítio inflamatório para o linfonodo. É possível que, desta forma, este subtipo tenha capacidade de se diferenciar em células apresentadoras de antígenos (YANG et al., 2014).

Os subtipos intermediário e não-clássico secretam citocinas de perfil inflamatório (TNF-alfa e IL-1-beta). O subtipo intermediário tem menor atividade de peroxidase que o subtipo clássico, porém maior capacidade de secreção de TNF-alfa e IL-1-beta. O subtipo intermediário de monócitos está associado a diferentes doenças inflamatórias crônicas como

aterosclerose, doença coronariana, artrite reumatóide e doença de Crohn. O subtipo não-clássico tem a função de patrulhar a parede dos vasos sanguíneos. Durante a inflamação, o subtipo não-clássico está associado à cicatrização, fibrose tecidual e angiogênese (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

Novos diferentes fenótipos de macrófagos já foram objeto de estudo em hanseníase. Em 2004, Sunderkötter et al. demonstraram haver maior expressão de MRP (*myeloid-related proteins*) dos tipos 8 e 14 em lesões de pacientes com a forma VV (SUNDERKÖTTER et al., 2004). Este mesmo grupo já havia demonstrado que este fenótipo de macrófagos MRP-8<sup>+</sup> e MRP-9<sup>+</sup> é o predominante no infiltrado inflamatório de camundongos suscetíveis à infecção experimental com *Leishmania major*, estando associado a maiores cargas parasitárias, disseminação da infecção e um *papel inflamatório* associado ao recrutamento de novas células inflamatórias para o sítio da infecção (STEINBRINK et al., 2000).

A MRP-8 também é conhecida como S100A8 ou calgranulina A e a MRP-9 também é conhecida como S100A9 ou calgranulina B. Estas são as cadeias pesada e leve componentes da proteína L1 ou calprotectina. A L1 é uma proteína ligante de cálcio, da família S100, muito abundante no citoplasma de neutrófilos e macrófagos. Sua função intracelular ainda está sendo investigada, mas já há considerável conhecimento sobre suas funções extracelulares. O complexo MRP-8/MRP-9 é secretado por neutrófilos e macrófagos e está relacionado à ativação macrofágica que ocorre na sepse (VOGL et al., 2007). A dosagem sérica deste complexo guarda relação com a atividade da fibrose cística, artrite reumatoide e doença de Crohn (BARTHE et al., 1991; HAMMER et al., 1995; TIBBLE et al., 2000).

Sunderkötter et al. também demonstraram que ocorre elevação dos níveis séricos do complexo MRP-8/MRP-9 durante o surto reacional tipo eritema nodoso (SUNDERKÖTTER et al., 2004). Tendo em vista que o eritema nodoso hansênico geralmente é expresso como uma paniculite lobular associada a vasculite leucocitoclástica (SARITA et al., 2013), os achados da equipe de Sunderkötter vão de encontro às afirmações de Pouliot et al., que ressaltaram que o complexo MRP-8/MRP-9 aumenta a adesão endotelial de neutrófilos e monócitos, promovendo a inflamação (POULIOT et al., 2008).

O grupo de Pouliot demonstrou, ainda, que a L1 é uma potente indutora da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos murinos. Estes autores demonstraram que, com o estímulo de L1,

os macrófagos aumentam sua expressão de INOS (*inducible NO synthase*) (POULIOT et al., 2008). Ou seja, paradoxalmente, apesar de os macrófagos murinos “in vitro” responderem com aumento de seu potencial microbicida (aumento da produção de NO) ao estímulo com L1, os macrófagos que expressam mais L1 em seu citoplasma são mais suscetíveis à infecção por *L.major* (STEINBRINK et al., 2000) e *M.leprae* (SUNDERKÖTTER et al., 2004).

Neste sentido, deve-se ressaltar que a atividade de INOS é regulada por diferentes vias. As lesões de pele dos pacientes com a forma VV apresentam maior deposição de ferro intracelular que as dos pacientes com a forma DT (MOURA et al., 2012). Weiss et al. estudaram o efeito do ferro intracelular sobre a atividade da INOS em culturas de macrófagos murinos e relataram que os depósitos intracelulares de ferro atuam de forma inibitória sobre a INOS e sobre a transcrição de seu RNAm. Demonstraram, também, que a depleção do ferro intracelular, por meio de um quelante de ferro, aumenta a atividade da enzima (WEISS et al., 1994).

Além de seu papel imunológico, os macrófagos possuem importância fundamental para a homeostase dos níveis de ferro teciduais. A maior parte do ferro necessário à eritropoiese provém da reciclagem realizada pelos macrófagos sobre as hemácias. Frente a processos inflamatórios, o sistema reticuloendotelial apresenta a capacidade de reter ferro, privando os microrganismos agressores deste elemento fundamental a sua multiplicação. Os conhecimentos sobre a polarização macrofágica vem sendo ampliados à medida em que mais se descobre sobre o controle fino da homeostase do ferro. De fato, as particularidades do manejo celular de ferro podem ser consideradas uma assinatura metabólica de ativação macrofágica, diferenciando as populações M1 e M2 (GAETANO et al., 2010).

Os macrófagos M2 apresentam níveis mais baixos de H-ferritina, uma proteína de armazenamento de ferro, e níveis mais elevados de CD163, um receptor para o complexo haptoglobina-hemoglobina relacionado à absorção celular de ferro. Ou seja, o macrófago M2 absorve ferro avidamente, mas não o armazena. Esta população de macrófagos apresenta, ainda, alta quantidade de ferroportina, uma proteína exportadora do ferro extracelular. A ferroportina capacita o macrófago M2 a transferir ferro para o tecido em reparo, oferecendo-o às células parenquimatosas e fibroblastos e favorecendo a regeneração tecidual. Por outro lado, a ferroportina do macrófago M2 pode transferir ferro para células tumorais, favorecendo o crescimento dos cânceres. Os macrófagos M1 apresentam níveis mais baixos de ferroportina

e níveis mais elevados de H-ferritina. Este fenótipo favorece a retenção de ferro, priva o microambiente deste elemento e fortalece o papel bacteriostático associado a esta população de macrófagos (GAETANO et al., 2010).

O CD163 é um receptor glicoproteico expresso na membrana plasmática de cerca de 15-30% nos monócitos circulantes e de virtualmente todos os macrófagos (ASLEH e LEVY, 2005). Trata-se de uma molécula membro da família de classe B de receptores scavenger ricos em cisteína (*cystein-rich scavenger receptor - CRSR*). Primeiramente, o CD163 foi descrito como um receptor endocítico para o complexo hemoglobina-haptoglobina, relacionado à eliminação da hemoglobina livre presente no sangue em pequenas quantidades no estado fisiológico e aumentada nos estados patológicos que cursam com hemólise. Cerca de 90% destes complexos são endocitados por hepatócitos por meio de um receptor transmembranar pouco caracterizado (FABRIEK et al., 2009). Uma das principais funções da proteína haptoglobina (Hp) é formar um complexo proteico com a hemoglobina (Hb) e prevenir o estresse oxidativo da Hb livre sobre os tecidos. Está comprovado que o polimorfismo do gene de Hp está associado ao risco de doença cardiovascular em pacientes com diabetes mellitus (ASLEH et al., 2003; PURUSHOTHAMAN et al., 2012).

Nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase da forma VV a expressão de CD163 é maior que nas lesões de pacientes com hanseníase da forma DT e a positividade imuno-histoquímica para CD163 correlaciona-se à positividade para IDO (indoleamina 2,3 dioxigenase) (MOURA et al., 2012). IDO é uma enzima imunomodulatória, produzida por macrófagos alternativamente ativados, envolvida no catabolismo de triptofano. A depleção do triptofano no microambiente celular dificulta o desenvolvimento de agentes microbianos e seus catabólitos promovem a diminuição da atividade das células T. Células tumorais expressam IDO, que facilita sua evasão ao controle que o sistema imunológico faz sobre o desenvolvimento do câncer (SALES et al., 2011). Moura et al. também demonstraram que a expressão de RNAm de CD163 é maior nas lesões da forma VV que nas lesões da forma DT e está correlacionada a um aumento de expressão de RNAm de IL-10. Estes autores cultivaram células provenientes de lesões de hanseníase da forma VV e confirmaram, por microscopia confocal e citometria de fluxo, que a maioria destas células são macrófagos (CD68<sup>+</sup>) com fenótipo CD163<sup>+</sup>.

Seus resultados demonstraram ainda que a coloração por azul da Prússia de Perl é fortemente positiva em biópsias de lesões de pacientes com hanseníase VV e evidencia os depósitos de ferro intracelulares nas células espumosas e carregadas de bacilos. A coloração não evidencia nenhum acúmulo de ferro nas células epitelioides dos granulomas bem formados e somente pequenos acúmulos de ferro nos macrófagos vagamente diferenciados das lesões da forma DT. Os autores especularam que a expressão de CD163 por macrófagos espumosos funcione como uma via de suprimento de ferro para a replicação da micobactéria (MOURA et al., 2012).

Enfim, a complexidade da hanseníase como doença espectral, que desafia os agentes do sistema público de saúde, já desde o momento do diagnóstico e classificação dos pacientes para permitir a escolha do tratamento adequado, guarda íntima relação com a complexidade da biologia de linfócitos e macrófagos, os principais tipos celulares componentes do infiltrado inflamatório das lesões de pele desta doença. Neste trabalho, pretendemos explorar as características histopatológicas e imuno-histoquímicas deste infiltrado inflamatório, focando características imunofenotípicas destes dois tipos celulares, em lesões de pele de pacientes com as diferentes formas de hanseníase do espectro de classificação. Esperamos complementar o conhecimento a respeito da biologia de linfócitos e macrófagos durante o processo inflamatório crônico da pele por meio da avaliação de marcadores para CD3, CD4, CD8, CD68, CD14, CD16, CD62L, CD163, L1 e coloração para depósitos de ferro. Paralelamente, esperamos complementar o conhecimento a respeito da classificação da hanseníase, reinterpretando a classificação de Ridley e Jopling à luz destes marcadores relacionados ao paradigma imunológico Th1xTh2.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório linfocítico e histiocítico e a quantificação de depósitos de ferro em lesões de pele de pacientes com hanseníase, relacionando-as à classificação de Ridley e Jopling.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as diferentes formas de classificação de hanseníase.
- Comparar os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling.
- Avaliar as causas de discordância entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling.
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos linfócitos do infiltrado inflamatório de lesões de pele de pacientes com hanseníase.
- Relacionar a expressão imuno-histoquímica dos linfócitos do infiltrado inflamatório das lesões de pele à classificação de Ridley e Jopling.
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos macrófagos do infiltrado inflamatório de lesões de pele de pacientes com hanseníase.
- Relacionar a expressão imuno-histoquímica dos macrófagos do infiltrado inflamatório das lesões de pele à classificação de Ridley e Jopling.
- Avaliar se a expressão imuno-histoquímica linfohistiocitária contribui para a melhoria da concordância entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling.
- Avaliar o acúmulo de ferro em lesões de pele de pacientes com hanseníase.
- Relacionar o acúmulo de ferro em lesões de pele à classificação de Ridley e Jopling.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Antes de seu início, este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFMG sob o parecer de número 71309.

### 4.2. PACIENTES

Os pacientes participantes deste estudo foram selecionados entre os pacientes com diagnóstico de hanseníase atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. O convite para participação foi feito no mesmo dia do diagnóstico ou até trinta dias após o início do tratamento. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborado em conformidade com as determinações da resolução 196/96 (itens IV e V) do Conselho Nacional de Saúde.

Para inclusão no estudo era necessário que o participante tivesse diagnóstico de hanseníase estabelecido e estivesse em tratamento por, no máximo, trinta dias. Foram incluídos pacientes com as diferentes formas de hanseníase do espectro de classificação de Ridley e Jopling. Foram excluídos pacientes com lesões muito pequenas, em que cicatrizes de biópsias prévias para elucidação diagnóstica, comprometiam a área a ser submetida a biópsia para o estudo.

### 4.3. DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE

O diagnóstico de hanseníase dos pacientes convidados a participar do estudo foi feito pelos dermatologistas do ambulatório de dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes. O estabelecimento do diagnóstico de hanseníase foi baseado em: exame clínico da pele; teste de sensibilidade tátil das lesões com filamentos de algodão e monofilamentos de Semmes-Weinstein; teste de sensibilidade térmica com estimulador termo-sensório; teste de sensibilidade à dor com agulhas; palpação de nervos periféricos e teste de sensibilidade tátil em mãos e pés com monofilamentos de Semmes-Weinstein; baciloscopia de raspado dérmico; exame histopatológico; teste da histamina.



Após a inclusão, os pacientes no estudo ainda foram acompanhados, ao longo dos primeiros seis meses de tratamento, por meio de seus prontuários eletrônicos, para a confirmação de melhora das lesões de pele com a poliquimioterapia para hanseníase. Todos os pacientes participantes deste estudo apresentaram melhora das lesões cutâneas, confirmando o diagnóstico da doença.

#### **4.4. BIÓPSIA DE PELE**

Todos os pacientes participantes foram submetidos à biópsia de pele sobre as lesões, realizada pelo autor desta tese, na sala de cirurgia dermatológica do mesmo ambulatório. A biópsia foi realizada sob antissepsia rigorosa e anestesia local com infiltração de lidocaína na concentração de 2%. Foram feitos os curativos adequados antes da liberação do paciente. Os pontos foram retirados após um período de sete a quatorze dias, no próprio ambulatório. Os fragmentos foram encaminhados ao Laboratório NIPE do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em frascos com solução tamponada de formol concentrado a 10%.

#### **4.5. PROCESSAMENTO DOS FRAGMENTOS DE PELE**

As amostras de pele foram fixadas em solução tamponada de formol concentrado a 10% por um período de dois a sete dias. Cada fragmento cilíndrico de pele foi seccionado longitudinalmente em duas metades antes de ser processado rotineiramente e emblocado em parafina. De cada bloco, foram feitos cortes histológicos sequenciais de 4 µm. Em cada lâmina foram colocados dois cortes histológicos. As lâminas coradas por meio dos métodos HE e Wade (coloração para bacilos álcool-ácido resistentes) para a classificação histopatológica dos casos. Outras lâminas foram destinadas a coloração imuno-histoquímica e para a coloração para depósitos de ferro.

#### **4.6. ESTUDO MORFOLÓGICO**

Para a classificação histopatológica dos casos de hanseníase, foram seguidos os algoritmos descritos para classificação histológica de Ridley e Jopling (RIDLEY, 1974).

#### 4.7. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

As lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por doze horas para derretimento da parafina. Foram desparafinizadas em soluções de xylol (vinte minutos em cada uma de três soluções), reidratadas em soluções de álcool etílico em concentrações decrescentes (cinco minutos em cada uma de três soluções com álcool absoluto e soluções a 90%, 80% e 70%) e mergulhadas por três períodos de cinco minutos em solução de salina fosfatada 0,01M (PBS – como abreviação para *phosphate buffered saline*).

A reativação antigênica foi realizada em banho Maria a 97°C por 20 minutos. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizado por imersão dos cortes em solução de metanol e peróxido de hidrogênio 30 volumes na concentração de 5% durante dez minutos, seguida de três banhos de cinco minutos em PBS. Para bloqueio da formação de ligações inespecíficas foi realizada imersão dos cortes em leite em pó por trinta minutos seguida de lavagem em água corrente (cinco passagens) e, posteriormente, incubação em solução de soroalbumina e PBS na concentração de 2% durante trinta minutos.

Após os bloqueios, os cortes foram incubados com os anticorpos primários (Quadro 3) em câmara úmida, à temperatura de 4°C. Ao fim de dezesseis horas de incubação, os cortes foram lavados em três banhos de cinco minutos em PBS e incubados com imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo (Novolink DAB Polymer – Leica Biosystems – Newcastle/Inglaterra) por trinta minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas em três banhos de cinco minutos em PBS, as lâminas foram tratadas com o conjugado estreptavidina-peroxidase pré-diluído (Novolink DAB Polymer – Leica Biosystems – Newcastle/Inglaterra) durante trinta minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente.

A ligação foi revelada com imersão das lâminas em solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio 30 volumes diluídos em PBS, por cinco minutos, seguida de interrupção da reação em solução PBS. Após lavagem com mais três banhos de cinco minutos em PBS, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, lavados, desidratados, diafanizados e as lamínulas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha).

<b>Alvo</b>	<b>Especificações</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluições</b>
<b>Anti-CD3</b>	Policlonal de coelho	Abcam	1:100
<b>Anti-CD4</b>	Monoclonal de camundongo	Abcam	1:100
<b>Anti-CD8</b>	Monoclonal de camundongo	Santa Cruz	1:250
<b>Anti-CD68</b>	Policlonal de coelho	Santa Cruz	1:200
<b>Anti-CD14</b>	Policlonal de coelho	Santa Cruz	1:400
<b>Anti-CD16</b>	Monoclonal de camundongo	Vector Laboratories	1:100
<b>Anti-CD163</b>	Monoclonal de camundongo	Leica	1:100
<b>Anti-L1</b>	Monoclonal de camundongo	Serotec	1:200
<b>Anti-CD62 L</b>	Policlonal de coelho	Santa Cruz	1:750

**Quadro 3:** Anticorpos primários utilizados para o estudo imuno-histoquímico.

#### **4.8. MARCAÇÃO PARA FERRO**

As lâminas foram desparafinadas, hidratadas, lavadas e coradas. A técnica de Azul da Prússia consistiu em um mergulho de 5 minutos em ferrocianeto de potássio (10%); em seguida, um mergulho de 20 minutos em solução 1:1 de ferrocianeto de potássio (10%) e ácido clorídrico (10%); enfim, contracoloração com eosina. As lâminas foram então desidratadas e montadas com Entellan (Merck, Alemanha).

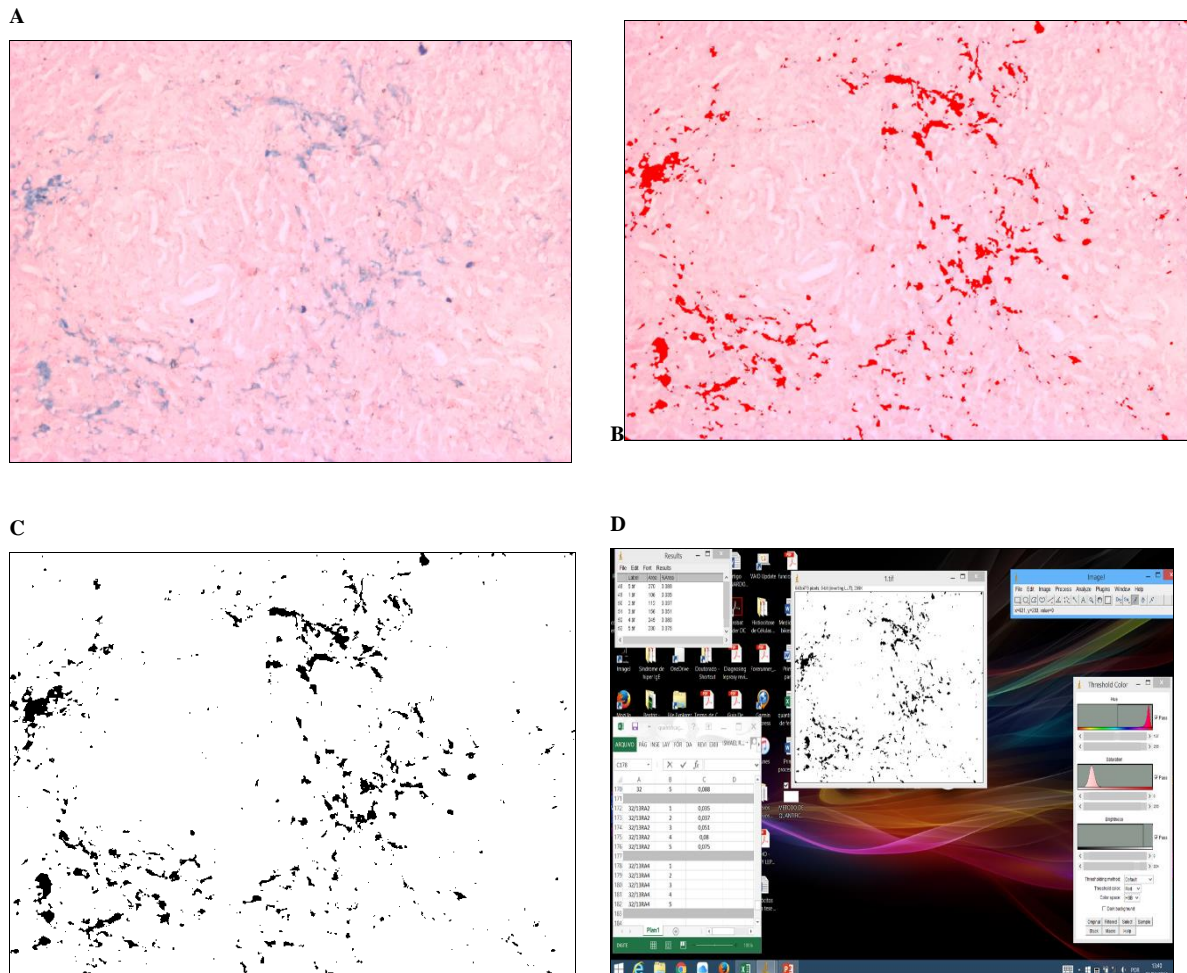
#### **4.9. MORFOMETRIA**

As imagens foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Japão) e capturadas por vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Probcf (Media Cybernetics, Estados Unidos) para sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos). Para análise das imagens digitalizadas foi utilizado o programa de domínio público ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA).

#### **4.10. CONTAGEM DE CÉLULAS E ESTIMATIVA DE ÁREA MARCADA**

A contagem de células marcadas por imuno-histoquímica foi realizada por meio das imagens digitais obtidas e foi expressa como porcentagem de células marcadas em relação ao número total de células no infiltrado inflamatório das lesões. Para a contagem, todos os campos contendo infiltrado inflamatório foram fotografados em aumento de 400x e todas as células inflamatórias foram contadas manualmente.

A estimativa da área marcada pela coloração para depósitos de ferro foi realizada de forma automática por meio do analisador de imagens. De forma resumida, é criada uma imagem binária em preto e branco, na qual a coloração preta representa os depósitos de ferro e a coloração branca as áreas não marcadas. O cálculo da porcentagem de área ocupada pelos depósitos é feito de forma automática (Figura 9).



**Figura 9:** Quantificação da porcentagem de área marcada para depósitos de ferro. A- Microfotografia original obtida em aumento de 200x: a coloração azul indica os depósitos de ferro. B- Seleção da cor azul pelos pesquisadores e conversão automática de todas as áreas representadas por píxeis azuis (mostradas em vermelho). C- Criação da imagem binária a ser analisada. D- Organização espacial das janelas abertas para facilitação do processo.

## 4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.11.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES

Para a análise comparativa entre as diferentes formas de classificação, a classificação da OMS foi contraposta às classificações de Madrid, Ridley e Jopling clínica, Ridley e Jopling anatomopatológica, à classificação conforme o número de segmentos corporais afetados por lesões cutâneas ou déficit neurológico, à classificação baciloscópica e à classificação final utilizada no serviço de referência. Esta última leva em consideração a classificação de Ridley e Jopling e a positividade da baciloscopia no esfregaço de pele. A classificação do serviço de

referência também foi comparada às demais e serviu como padrão para o cálculo de sensibilidade e especificidade das demais classificações para a definição do estado multibacilar dos pacientes da amostra.

Na classificação de Madrid foram considerados multibacilares os pacientes com as formas dimorfa e VV. Na classificação de Ridley e Jopling foram considerados multibacilares os pacientes com as formas DD, DV e VV. Na classificação conforme o número de segmentos corporais afetados foram consideradas duas definições de paciente multibacilar: acometimento de dois ou mais segmentos ou de três ou mais segmentos corporais. A divisão da superfície corporal em nove segmentos foi a mesma utilizada em estudos prévios de outros autores (Van brakel et al., 1992; GUPTA et al., 2012). Na classificação baciloscópica, foram considerados multibacilares os pacientes com baciloscopia positiva em qualquer um dos sítios examinados. Para a baciloscopia de esfregaço dérmico foram amostrados quatro sítios: uma das lesões, o cotovelo contralateral e ambos os lobos das orelhas.

Para avaliar a concordância entre duas classificações foram elaboradas tabelas 2x2 e calculados coeficiente kappa e porcentagens de casos em que houve concordância entre as classificações em relação ao número total de casos. Os dados foram analisados por meio de software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 (SPSS, Estados Unidos).

Na avaliação de discordância entre os componentes clínico e anatomopatológico da classificação de Ridley e Jopling foram considerados de discordância mínima os casos em que as classificações clínica e anatomopatológica diferiram, mas não alteraram o estado paucibacilar ou multibacilar do paciente. Foram considerados casos de discordância significativa aqueles em que as classificações clínica e anatomopatológica diferiram de forma a alterar o estado paucibacilar ou multibacilar do paciente. Os exames anatomopatológicos que demonstraram alterações inespecíficas foram considerados diagnósticos de forma IND de modo a permitir a análise da discordância.

#### 4.11.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A contagem de células marcadas em imuno-histoquímica foi expressa em porcentagem em relação ao número total de células. A contagem de área marcada para depósitos de ferro foi expressa em porcentagem de área marcada em relação à área fotografada total. A comparação

entre os grupos de pacientes com diferentes formas de hanseníase foi realizada por meio do Teste Kruskal-Wallis, para um nível de significância de 0,05. Para os cálculos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES

Para a comparação entre as diferentes classificações de hanseníase foram incluídos quarenta e nove casos novos da doença. Em dezessete pacientes (34,7%) o tratamento estava em vigência há no mínimo um e no máximo trinta dias. Vinte e um pacientes (42,9%) apresentavam seis ou mais lesões de pele. Dezesseis pacientes (32,7%) apresentaram baciloscopia positiva (Tabela 1).

**Tabela 1**

**Descrição da amostra de quarenta e nove casos novos de hanseníase incluídos no estudo comparativo entre as diferentes formas de classificação de hanseníase**

Variável	n	(%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	27	(55.1)
Feminino	22	(44.9)
<b>Idade (anos)</b>		
< 15	2	(4.0)
15-30	12	(24.5)
31-45	10	(20.4)
46-60	13	(26.6)
61-75	12	(24.5)
<b>Número de lesões cutâneas</b>		
≤ 5	28	(57.1)
> 5	21	(42.9)
<b>Número de nervos acometidos</b>		
≤ 1	41	(83.7)
> 1	8	(16.3)
<b>Baciloscopia</b>		
0	32	(65.3)
≥ 1	16	(32.7)

Fonte: Dados da pesquisa.



A classificação dos pacientes em paucibacilar e multibacilar (Tabela 2) evidencia que, exceto pela classificação de Madrid e pela classificação conforme acometimento de dois ou mais segmentos corporais, a maioria da amostra foi constituída por pacientes paucibacilares, sendo que a classificação clínica de Ridley e Jopling foi a que resultou em maior número de pacientes paucibacilares (77,5%). Pode-se notar que, quando comparadas à classificação operacional, a classificação de Madrid e a classificação conforme número de segmentos corporais acometidos resultaram em porcentagens maiores de pacientes multibacilares. Por outro lado, as classificações de Ridley e Jopling e baciloscópica resultaram em porcentagens maiores de pacientes paucibacilares.

Os diferentes sistemas de classificação foram comparados ao utilizado no serviço de referência quanto a suas características intrínsecas para a definição do estado multibacilar de um paciente. Neste sentido, as classificações de Ridley e Jopling clínica e anatomopatológica e a classificação baciloscópica demonstraram especificidade de 100% para a definição do estado multibacilar, pois compõem o sistema de classificação do serviço. Quando qualquer uma delas resulta em classificação multibacilar a classificação final do serviço é multibacilar. Por outro lado, os crescentes valores de sensibilidade demonstram que a baciloscopia melhorou a sensibilidade de detecção de casos multibacilares da classificação clínica de Ridley e Jopling e que a classificação anatomopatológica de Ridley e Jopling melhorou ainda mais a sensibilidade obtida com a baciloscopia (Tabela 2).

**Tabela 2**

**Classificação de quarenta e nove casos novos de hanseníase atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil) em paucibacilares e multibacilares de acordo com as classificações operacional da OMS, de Madrid, por número de áreas corporais afetadas (NBAA), de Ridley e Jopling clínica, de Ridley e Jopling anatomopatológica e baciloscópica.**

Classificação	Paucibacilar		Multibacilar		Sensibilidade para MB <sup>3</sup>	Especificidade para MB <sup>3</sup>	Kappa <sup>3</sup>
	n	(%)	n	(%)			
Madrid	16	(32,6)	33	(67,3)	100%	53%	0,47
NBAA (duas ou mais áreas)	13	(26,5)	36	(73,5)	100%	43%	0,37
NBAA (três ou mais áreas)	25	(51)	24	(49)	84%	73%	0,55
Operacional	28	(57,1)	21	(42,9)	74%	77%	0,49
Ridley e Jopling (clínica)	38	(77,5)	11	(22,4)	57%	100%	0,63
Ridley e Jopling (anatomopatológica) <sup>1</sup>	26	(53)	14	(28,6)	89%	100%	0,91
Baciloscópica <sup>2</sup>	32	(65,3)	16	(32,7)	84%	100%	0,87

Fonte: Dados da pesquisa.

Notas: 1- Nesta tabela não foram incluídos na classificação de Ridley e Jopling anatomopatológica os nove casos inespecíficos ao exame anatomopatológico. 2- Um dos casos não contou com o registro do resultado da baciloscopia de esfregaço de pele. 3- Os valores de sensibilidade e especificidade e o coeficiente kappa foram calculados tomando como padrão a classificação utilizada no serviço de referência, que considera tanto a classificação de Ridley e Jopling quanto a positividade da baciloscopia em esfregaço de pele.

Quando comparadas à classificação do serviço de referência, as classificações clínicas de Madrid e conforme o número de segmentos corporais afetados, especialmente dois ou mais segmentos, demonstraram baixa especificidade para o diagnóstico multibacilar. Muitos dos pacientes considerados multibacilares por estes três sistemas de classificação foram classificados pelo serviço de referência como paucibacilares. Dentre estes três sistemas clínicos de classificação, a melhor concordância com a classificação final do serviço de referência foi obtida pela classificação conforme o número de segmentos corporais afetados que considera multibacilar o paciente com pelo menos três segmentos afetados (kappa: 0,55). Sua concordância foi melhor que a obtida pela classificação operacional da OMS (kappa: 0,49).

A concordância entre a classificação final utilizada pelo serviço de referência e a classificação operacional da OMS foi de 75,5% (Tabela 3). A primeira resultou em dezenove pacientes multibacilares (38,8%) enquanto a última resultou em vinte e um (42,9%). Um terço dos pacientes considerados multibacilares pela classificação operacional foi considerado paucibacilar pela classificação final do serviço de referência. Por outro lado, dos vinte e oito pacientes considerados paucibacilares conforme a classificação de acordo o número de lesões da pele, cinco (17,8%) foram considerados multibacilares pela classificação utilizada no centro de referência.

**Tabela 3**

**Concordância entre a classificação operacional da OMS e a classificação utilizada pela equipe do serviço de referência em hanseníase em quarenta e nove casos novos de hanseníase atendidos.**

		Classificação do serviço		
		Multibacilar	Paucibacilar	Total
Classificação operacional da OMS	Multibacilar	14 (28,6%)	7 (14,3%)	21 (42,9%)
	Paucibacilar	5 (10,2%)	23 (46,9%)	28 (57,1%)
	Total	19 (38,8%)	30 (61,2%)	49 (100%)

Fonte: Dados da pesquisa. Concordância: 75,5%. Kappa: 0,494.

A tabela 4 expressa a comparação entre a classificação operacional da OMS e os demais sistemas de classificação. A melhor concordância com a classificação operacional foi obtida pela classificação conforme o número de segmentos corporais afetados - três ou mais segmentos (93,8%; kappa: 0,88). A discordância se deu em apenas três casos considerados paucibacilares pela classificação da OMS. A pior concordância foi com a classificação conforme o número de segmentos corporais afetados - dois ou mais segmentos (69,4%; kappa: 0,43). Toda a discordância se deu em torno de quinze casos, considerados paucibacilares pela classificação operacional da OMS.

Ainda analisando os dados representados na tabela 4, pode-se perceber que a concordância da classificação clínica de Ridley e Jopling, da classificação anatomopatológica de Ridley e Jopling e da classificação baciloscópica com a classificação operacional são semelhantes, respectivamente 71,4% (kappa: 0,38), 71,4% (kappa: 0,40) e 72,9% (kappa: 0,43). O comportamento das classificações anatomopatológica de Ridley e Jopling e baciloscópica foi muito parecido, tendo diferido apenas pelo fato de um dos casos não ter contado com o registro do resultado da baciloscopia de esfregaço de pele. Um quarto dos pacientes com baciloscopia positiva teriam sido classificados como paucibacilares de acordo com a contagem de lesões de pele. O mesmo teria acontecido com 29,4% dos pacientes com biópsias características de formas multibacilares.

Tabela 4

Concordância entre a classificação operacional da OMS e as demais formas de classificação da hanseníase estudadas em quarenta e nove casos novos atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil).

		Baciloscopia*		Madrid		Ridley e Jopling (clínica)	
		Multibacilar	Paucibacilar	Multibacilar	Paucibacilar	Multibacilar	Paucibacilar
Classificação operacional da OMS	Multibacilar	12 (25%)	9 (18,7%)	21 (42,8%)	0 (0%)	9 (18,4%)	12 (24,5%)
	Paucibacilar	4 (8,3%)	23 (47,9%)	12 (24,5%)	16 (32,6%)	2 (4,0%)	26 (53,0%)
		Concordância: 72,9% Kappa: 0,43		Concordância: 77% Kappa: 0,53		Concordância: 71,4% Kappa: 0,38	

		NBAA (duas ou mais)		NBAA (três ou mais)		Ridley e Jopling (anatomopatológica)	
		Multibacilar	Paucibacilar	Multibacilar	Paucibacilar	Multibacilar	Paucibacilar
Classificação operacional da OMS	Multibacilar	21 (42,8%)	0 (0%)	21 (42,8%)	0 (0%)	12 (24,5%)	9 (18,3%)
	Paucibacilar	15 (30,6%)	13 (26,5%)	3 (6,1%)	25 (51%)	5 (10,2%)	23 (46,9%)
		Concordância: 69,4% Kappa: 0,43		Concordância: 93,8% Kappa: 0,88		Concordância: 71,4% Kappa: 0,40	

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: \*Baciloscopia positiva, independente do valor logarítmico, foi classificada como multibacilar. Dos quarenta e nove participantes, um não contou com o registro do resultado da baciloscopia de esfregaço de pele.

NBAA (“number of body areas affected”: número de áreas corporais afetadas)

Apesar de, em termos absolutos, a concordância entre os dois componentes da classificação de Ridley e Jopling com a classificação operacional ter sido exatamente a mesma (71,4%), algumas diferenças importantes sobressaem. Dos dezessete pacientes considerados multibacilares pelo exame anatomopatológico, a contagem de lesões detectou apenas doze (70,6%). Enquanto isso, dos onze pacientes considerados multibacilares pela classificação clínica de Ridley e Jopling, nove puderam ser detectados pela contagem de lesões de pele (81,8%).

A concordância perfeita entre a classificação clínica e a classificação anatomopatológica de Ridley e Jopling se deu em 23 casos (46,9%). A melhor concordância foi para a forma VV (85,7%), seguida pela forma IND (72,7%). Os diagnósticos clínico e anatomopatológico foram concordantes em apenas 28,6% dos casos de forma TT e 14,3% dos casos de forma DV (Tabela 5). A discordância entre o laudo anatomopatológico e a impressão clínica foi leve em outros vinte casos, ou seja, em 40,8% da amostra, diferiram, mas se mantiveram justapostos no espectro TT-DT-DD-DV-VV. Nesta situação, encontramos cinco dos sete casos clinicamente considerados da forma TT. Todos os cinco foram reclassificados como sendo da forma DT pelo anatomopatológico (Tabela 6).

Ainda de acordo com a tabela de discordância (Tabela 5), observamos que, dos cinco casos considerados inespecíficos pelo exame anatomopatológico, mas classificados por nós como indeterminados para efeito de cálculo da concordância, quatro (80%) apresentaram discordância leve com a hipótese clínica, ou seja, não tiveram o estado paucibacilar da classificação clínica alterado, uma vez que todos os quatro haviam sido apontados clinicamente como sendo de forma DT. Em apenas um, dos cinco casos inespecíficos, a discordância com a classificação clínica foi significativa. Neste, a classificação clínica de Ridley e Jopling apontou a forma DD e o caso foi considerado multibacilar pelos critérios clínicos.

Afora este caso, a discordância significativa se repetiu apenas em casos classificados como de forma DV pelo exame anatomopatológico. Dos sete casos, cinco (71,4%) haviam sido considerados como de forma DT pela classificação clínica (Tabela 6). Destes cinco casos discordantes, quatro apresentavam baciloscopia positiva no esfregaço de pele.

**Tabela 5**

**Discordância entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling em quarenta e oito casos novos de hanseníase atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil).**

<b>Classificação histopatológica de Ridley e Jopling</b>	<b>n</b>	<b>Concordância plena</b>	<b>Discordância leve</b>	<b>Discordância significativa</b>
<b>Indeterminada</b>	11	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0
<b>Tuberculoide</b>	7	2 (28,6%)	5 (71,4%)	0
<b>Dimorfa-tuberculoide</b>	12	6 (50%)	6 (50%)	0
<b>Dimorfa-dimorfa</b>	0	-	-	-
<b>Dimorfa-virchowiana</b>	7	1 (14,3%)	1 (14,3%)	5 (71,4%)
<b>Virchowiana</b>	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0
<b>Inespecífica</b>	5	0	4 (80%)	1 (20%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Houve seis casos em que a discordância se deu entre a classificação clínica DT e a classificação anatomopatológica IND ou inespecífica. Destes, quatro apresentavam clinicamente múltiplas máculas hipocrômicas e um apresentava lesões em placa muito pouco elevadas. Houve dois casos em que a classificação clínica foi IND e a anatomopatológica DT. Ambos os pacientes apresentavam apenas uma lesão macular hipocrômica e baciloscopia de esfregaço cutâneo negativa. Houve três casos clinicamente considerados de forma TT e reclassificados para forma DT ao exame anatomopatológico. Dois deles apresentavam uma única placa eritematosa e o terceiro apresenta duas placas eritematosas localizadas em segmentos corporais diferentes. Houve cinco casos em que a forma clínica DT foi reclassificada para TT conforme o resultado da biópsia. Dois destes apresentavam múltiplas placas eritematosas (seis e oito) e quatro apresentavam menos de seis lesões, porém eram placas eritematosas dispersas em três ou mais segmentos corporais.

**Tabela 6**

**Correlação entre os componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling em quarenta e nove casos novos de hanseníase atendidos em um centro de referência do Estado de Minas Gerais (Brasil).**

		Classificação Histopatológica de Ridley e Jopling (n)							total
		TT	DT	DD	DV	VV	Indeterminada	Inespecífica	
Classificação clínica de Ridley e Jopling (n)	TT	2	3	0	0	0	1	0	6
	DT	5	6	0	5	0	2	4	22
	DD	0	1	0	1	0	0	1	3
	DV	0	0	0	1	1	0	0	2
	VV	0	0	0	0	6	0	0	6
	Indeterminada	0	2	0	0	0	8	0	10
	<b>total</b>	7	12	0	7	7	11	5	49

Fonte: Dados da pesquisa.

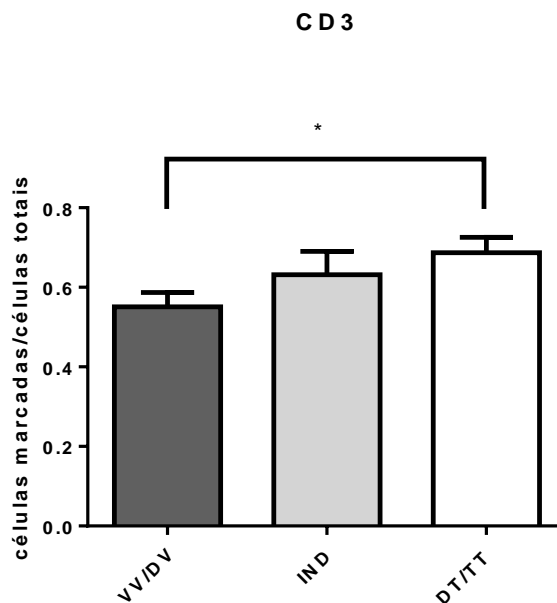


## 5.2. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD3, CD4, CD8

No momento da quantificação de células marcadas para CD3, CD4, CD8, CD68, CD62L, CD14 e CD16 haviam sido incluídos 27 casos (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5).

Para a quantificação de células CD3<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 4.154,5 (mín: 3.010; máx: 4.972); DV = 2.148,8 (mín: 1.649; máx: 3.502); DT = 2.438,6 (mín: 836; máx: 8.188); TT = 4226.2 (mín: 1.853; máx: 6.834); IND = 1.277 (mín: 801; máx: 1.670).

A porcentagem média de células marcadas para CD3 foi maior ( $p = 0,04$ ) no grupo das formas DT/TT do que nos grupos das formas VV/DV e IND, respectivamente, 68,7%; 55,1%; 63,2% (Gráfico 1).

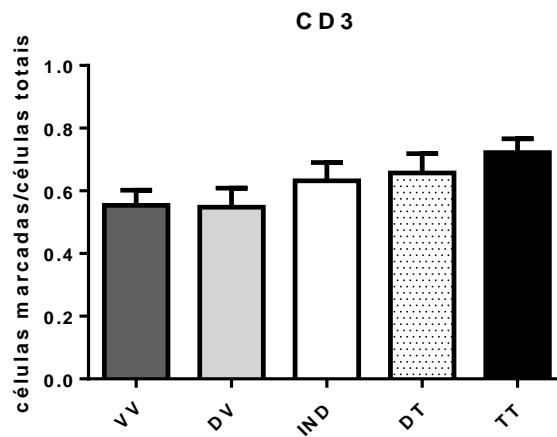


**Gráfico 1** - Porcentagem média de células marcadas para CD3 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas: n = 27 (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV/DV = 55,1%, IND = 63,2%, DT/TT = 68,7%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,04$ .

Com a separação das formas DV e VV e das formas DT e TT não foi possível detectar diferença significativa entre os grupos quanto à marcação para CD3, apesar de o gráfico evidenciar uma tendência ao aumento das células CD3<sup>+</sup>, à medida que se aproxima do polo TT (VV=55,4%, DV=54,7%, IND=63,2%, DT=65,7%, TT=72,1%) (Gráfico 2).



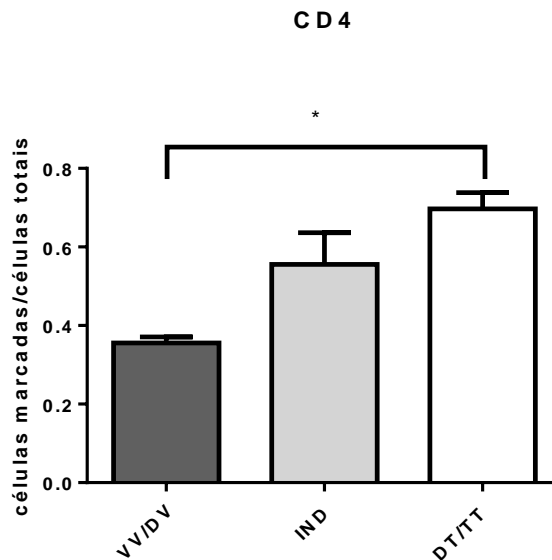
**Gráfico 2** - Porcentagem média de células marcadas para CD3, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas: n = 27 (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV=55,4%, DV=54,7%, IND=63,2%, DT=65,7%, TT=72,1%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,13$ .

Para a quantificação de células CD4<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 2.167,6 (mín: 1.413; máx: 3.496); DV = 2.354,5 (mín: 1.531; máx: 4.561); IND = 1.366,1 (mín: 868; máx: 1.720); DT = 1.897,5 (mín: 982; máx: 4.344); TT = 3.201,1 (mín: 1.548; máx: 4.676).

A percentagem média de células marcadas para CD4 foi menor ( $p = 0,0002$ ) no grupo das formas VV/DV do que nos grupos das formas IND e DT/TT (respectivamente, 35,5%; 55,6%; 69,7%) (Gráfico 3).

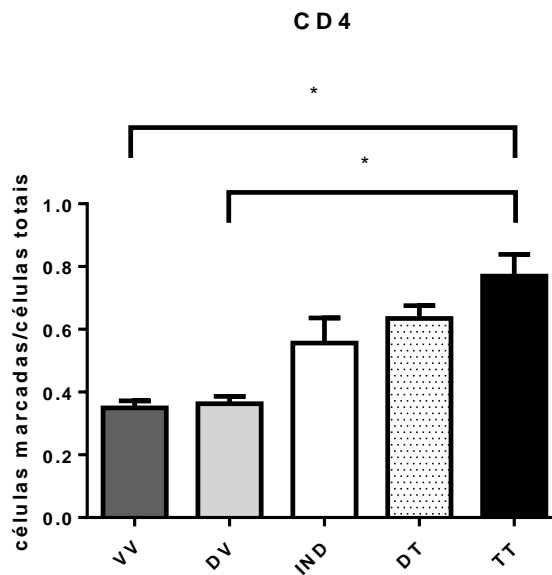


**Gráfico 3** - Percentagem média de células marcadas para CD4 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Percentagem de células marcadas: VV/DV = 35,5%, IND = 55,6%, DT/TT = 69,7%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,0002$ .

Com a separação das formas DV e VV e das formas DT e TT foi possível demonstrar que a diferença na porcentagem média de células CD4<sup>+</sup> ( $p = 0,001$ ) ocorreu entre os grupos VV x TT e entre os grupos DV x TT (VV=35,0%, DV=36,2%, IND=55,6%, DT=63,4%, TT=77%) (Gráfico 4).



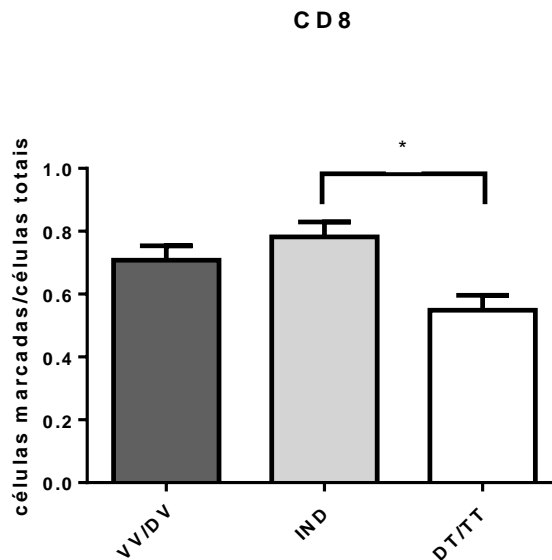
**Gráfico 4** - Porcentagem média de células marcadas para CD4, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV=35,0%, DV=36,2%, IND=55,6%, DT=63,4%, TT=77%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,001$ .

Para a quantificação de células CD8<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 1.427,2 (mín: 1.050; máx: 3.496); DV = 2.738,7 (mín: 1.650; máx: 4.814); IND = 1.255,8 (mín: 806; máx: 1.619); DT = 2.155,5 (mín: 909; máx: 6.265); TT = 2.896,8 (mín: 1.380; máx: 6.791).

A percentagem de células marcadas para CD8 foi menor no grupo das formas DT/TT do que nos grupos das formas VV/DV e IND, respectivamente, 54,8%; 70,8%; 78,2% ( $p = 0,01$ ) (Gráfico 5).

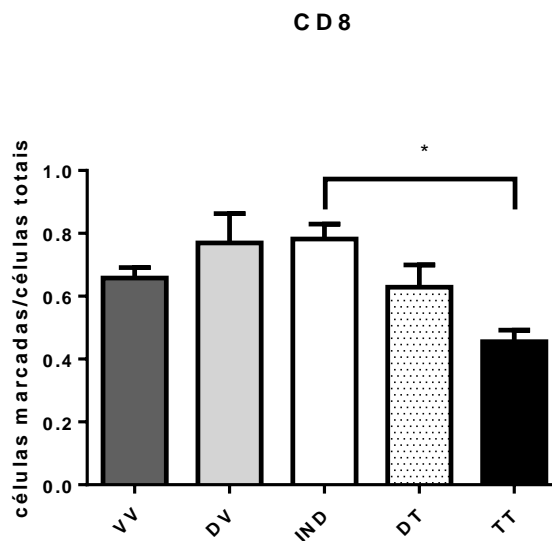


**Gráfico 5** - Percentagem média de células marcadas para CD8 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas: n = 27 (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Percentagem de células marcadas: VV/DV = 70,8%, IND = 78,2%, DT/TT = 54,8%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,01$ .

Com a separação das formas DV e VV e das formas DT e TT pôde-se evidenciar que a diferença ( $p = 0,01$ ) ocorreu entre a forma TT (menor média de marcação para CD8 – 45,5%) e a forma IND (maiores médias de marcação para CD8 – 78,2%) (Gráfico 6).



**Gráfico 6** - Porcentagem média de células marcadas para CD8, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV=65,8%, DV=77%, IND=78,2%, DT=62,8%, TT=45,5%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,01$ .

Os quocientes entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD4 e para CD8 (relação CD4/CD8) foram maiores à medida que se aproximaram do polo TT e menores à medida que se aproximaram do polo virchowiano. As formas VV e DV foram aquelas em que a predominância da marcação para CD8 foi maior (Tabela 7).

**Tabela 7**

**Relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD4 e CD8 nas lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.**

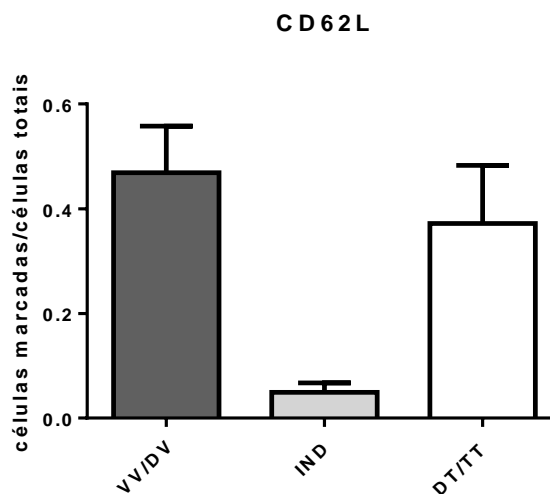
<b>Grupo</b>	<b>VV/DV</b>	<b>IND</b>	<b>DT/TT</b>	<b>VV</b>	<b>DV</b>	<b>DT</b>	<b>TT</b>
<b>CD4/CD8</b>	0,5	0,7	1,3	0,5	0,5	1,0	1,7

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide), VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

### 5.3. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD62L

Para a quantificação de células CD62L<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 2.580,1 (mín: 1.824; máx: 3.244); DV = 2.412,3 (mín: 1.326; máx: 6.437); IND = 1.299,4 (mín: 821; máx: 1.669); DT = 2.376,3 (mín: 1.000; máx: 6.888); TT = 3.440,8 (mín: 1.592; máx: 6.099).

A porcentagem média de células marcadas para CD62L para os grupos VV/DV, IND e DT/TT foi, respectivamente, 46,9%, 4,9% e 37,2% ( $p = 0,18$ ) (Gráfico 7).



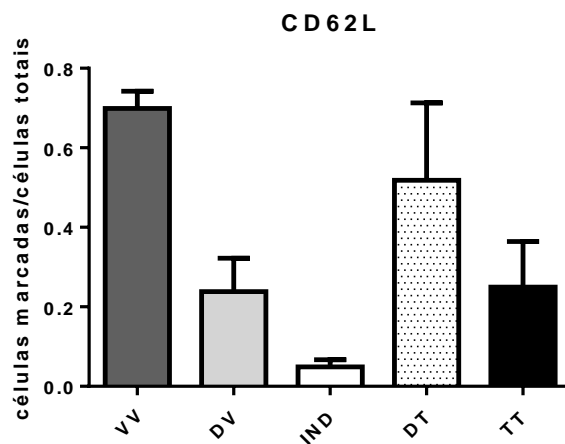
**Gráfico 7** - Porcentagem média de células marcadas para CD62L por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas: n = 27 (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV/DV = 46,9%, IND = 4,9%, DT/TT = 37,2%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,18$ .



A porcentagem de células marcadas para CD62L nas biópsias das diferentes formas de hanseníase foi: VV=69,9%, DV=23,8%, IND=4,9%, DT=51,8%, TT=24,9% ( $p = 0,003$ ). A separação das formas VV e DV e das formas DT e TT ressaltou a diferença das porcentagens de células CD62L<sup>+</sup> entre os grupos polares VV e TT (Gráfico 8).



**Gráfico 8** - Porcentagem média de células marcadas para CD62L, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

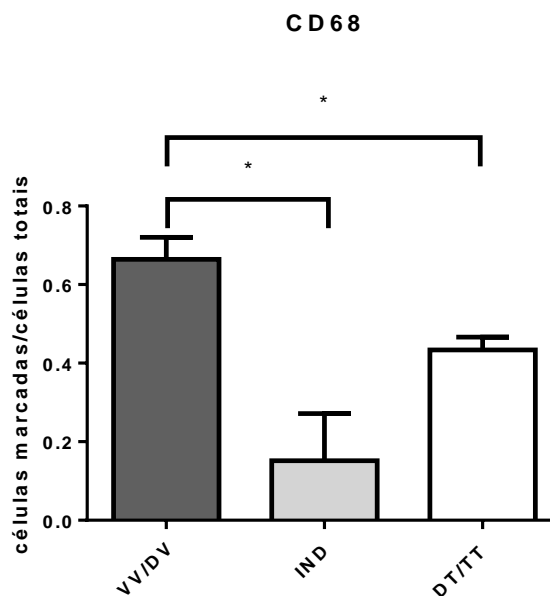
Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV=69,9%, DV=23,8%, IND=4,9%, DT=51,8%, TT=24,9%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,003$ .

#### 5.4. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD68, CD14, CD16

Para a quantificação de células CD68<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 5.416,6 (mín: 4.504; máx: 6.623); DV = 3.073,6 (mín: 1.654; máx: 4.856); IND = 1.337,7 (mín: 803; máx: 1.626); DT = 2.475,9 (mín: 836; máx: 5.242); TT = 5.655,9 (mín: 3.249; máx: 7.915).

Houve diferença significativa ( $p = 0,003$ ) entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD68 entre os grupos das formas VV/DV X IND X DT/TT, respectivamente, 66,4%; 15,2%; 43,4% (Gráfico 9).

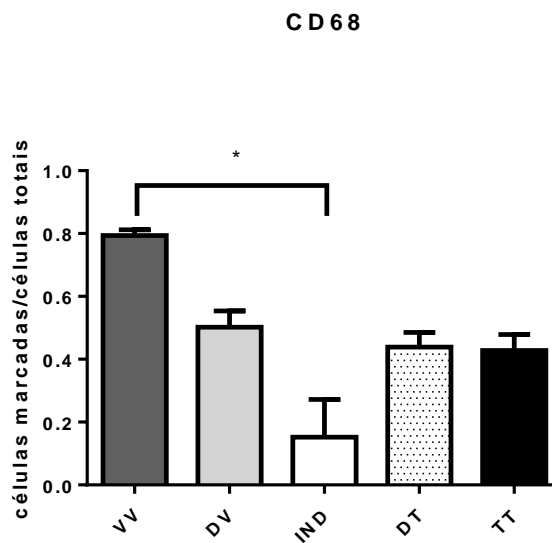


**Gráfico 9** - Porcentagem média de células marcadas para CD68 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV/DV = 66,4%, IND = 15,2%, DT/TT = 43,4%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,003$ .

Com a separação das formas DV e VV e das formas DT e TT foi possível detectar que a percentagem de células marcadas para CD68 foi mais intensa nas biópsias da forma VV do que nas biópsias de forma IND ( $p = 0,005$ ). Todavia, não houve diferença significativa entre os grupos das formas DV, DT e TT (VV=79,4%, DV=50,2%, IND=15,2%, DT=43,8%, TT=42,8%) (Gráfico 10).



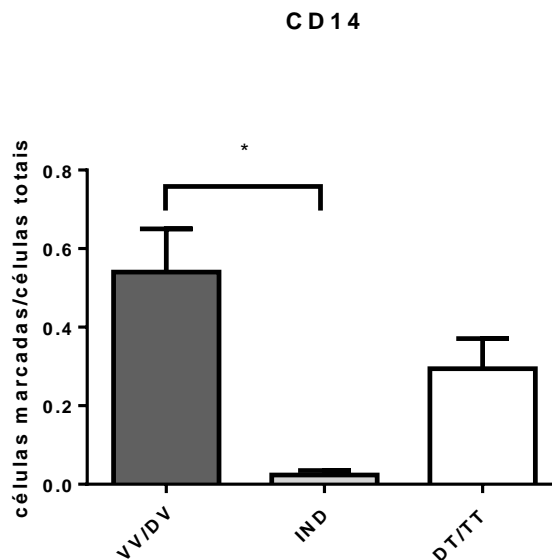
**Gráfico 10** - Percentagem média de células marcadas para CD68, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Percentagem de células marcadas: VV=79,4%, DV=50,2%, IND=15,2%, DT=43,8%, TT=42,8%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,005$ .

Para a quantificação de células CD14<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 4.239,2 (mín: 3.708; máx: 5.218); DV = 3.408,5 (mín: 1.632; máx: 7.548); IND = 1.422,8 (mín: 699; máx: 2.004); DT = 2.458,2 (mín: 808; máx: 6.984); TT = 3.468,1 (mín: 1.972; máx: 4.341).

Houve diferença significativa entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD14 entre os grupos das formas VV/DV X IND X DT/TT, respectivamente, 54,0%; 2,4%; 29,4% ( $p = 0,003$ ). A diferença ocorreu entre o grupo das formas VV/DV e o grupo da forma IND (Gráfico 11).

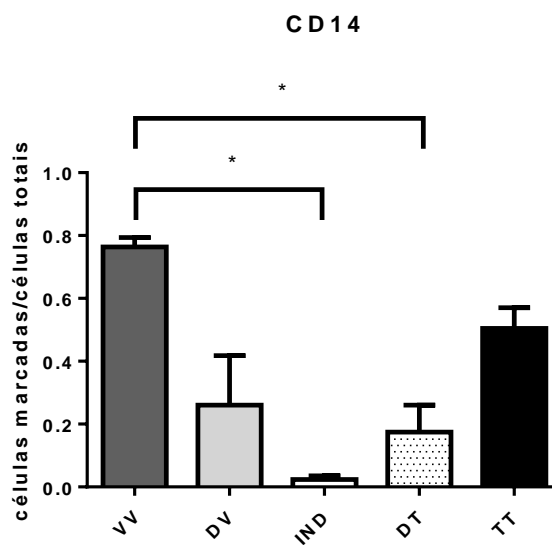


**Gráfico 11** - Porcentagem média de células marcadas para CD14 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV/DV = 54,0%, IND = 2,4%, DT/TT = 29,4%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,003$ .

Com a separação das formas DV e VV e das formas DT e TT foi possível detectar que a percentagem de células marcadas para CD14 foi maior nas biópsias da forma VV do que nas biópsias das formas IND e DT ( $p = 0,001$ ). A percentagem média de células marcadas nas diferentes formas foi: VV=76,4%, DV=26,0%, IND=2,4%, DT=17,4%, TT=50,5% (Gráfico 12).



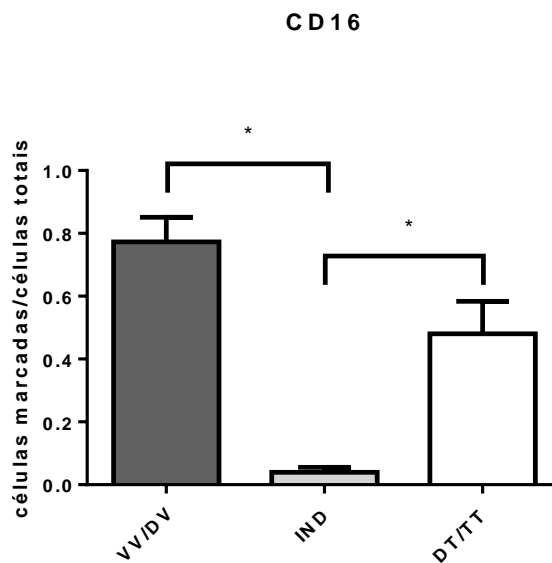
**Gráfico 12** - Porcentagem média de células marcadas para CD14, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas:  $n = 27$  (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV=76,4%, DV=26,0%, IND=2,4%, DT=17,4%, TT=50,5%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,001$ .

Para a quantificação de células CD16<sup>+</sup>, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), conforme as diferentes formas, foi: VV = 4.335,1 (mín: 3.447; máx: 5.200); DV = 2.636,7 (mín: 1.492; máx: 5.176); IND = 1.462,9 (mín: 612; máx: 2.269); DT = 2.107,5 (mín: 676; máx: 5.306); TT = 2.908,7 (mín: 1.329; máx: 6.555).

De forma muito semelhante ao observado na marcação para CD14, houve diferença significativa entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD16 entre os grupos das formas VV/DV X IND X DT/TT, respectivamente, 77,3%; 4,0%; 48,0% ( $p = 0,001$ ). A diferença significativa ocorreu entre o grupo das formas VV/DV e o grupo da forma IND e também entre o grupo das formas DT/TT e o grupo da forma IND (Gráfico 13).

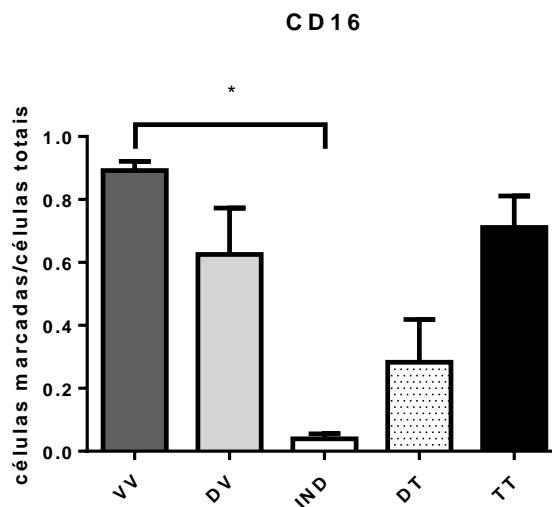


**Gráfico 13** - Porcentagem média de células marcadas para CD16 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).

Notas: n = 27 (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV/DV = 77,3%, IND = 4,0%, DT/TT = 48,0%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,001$ .

A porcentagem de células marcadas para CD16 nas biópsias das diferentes formas de hanseníase foi: VV=89,2%, DV=62,5%, IND=4,0%, DT=28,3%, TT=71,2%. A porcentagem de células marcadas para CD16 aumentou, em relação à marcação para CD14, em todas as formas de hanseníase. O aumento foi mais expressivo na forma DV do que para as demais: VV=aumento de 16%; DV=aumento de 140%; IND=aumento de 66,7%; DT=aumento de 62,6%; TT=aumento de 40,9% (Gráfico 14).



**Gráfico 14** - Porcentagem média de células marcadas para CD16, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide).

Notas: n = 27 (TT=6, DT=7, DV=4, VV=5, IND=5). Porcentagem de células marcadas: VV=89,2%, DV=62,5%, IND=4,0%, DT=28,3%, TT=71,2%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,001$ .

A relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD14 e para CD16 (CD14/CD16) variou pouco entre os diferentes grupos estudados (Tabela 8).

**Tabela 8**

**Relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD14 e CD16 nas lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.**

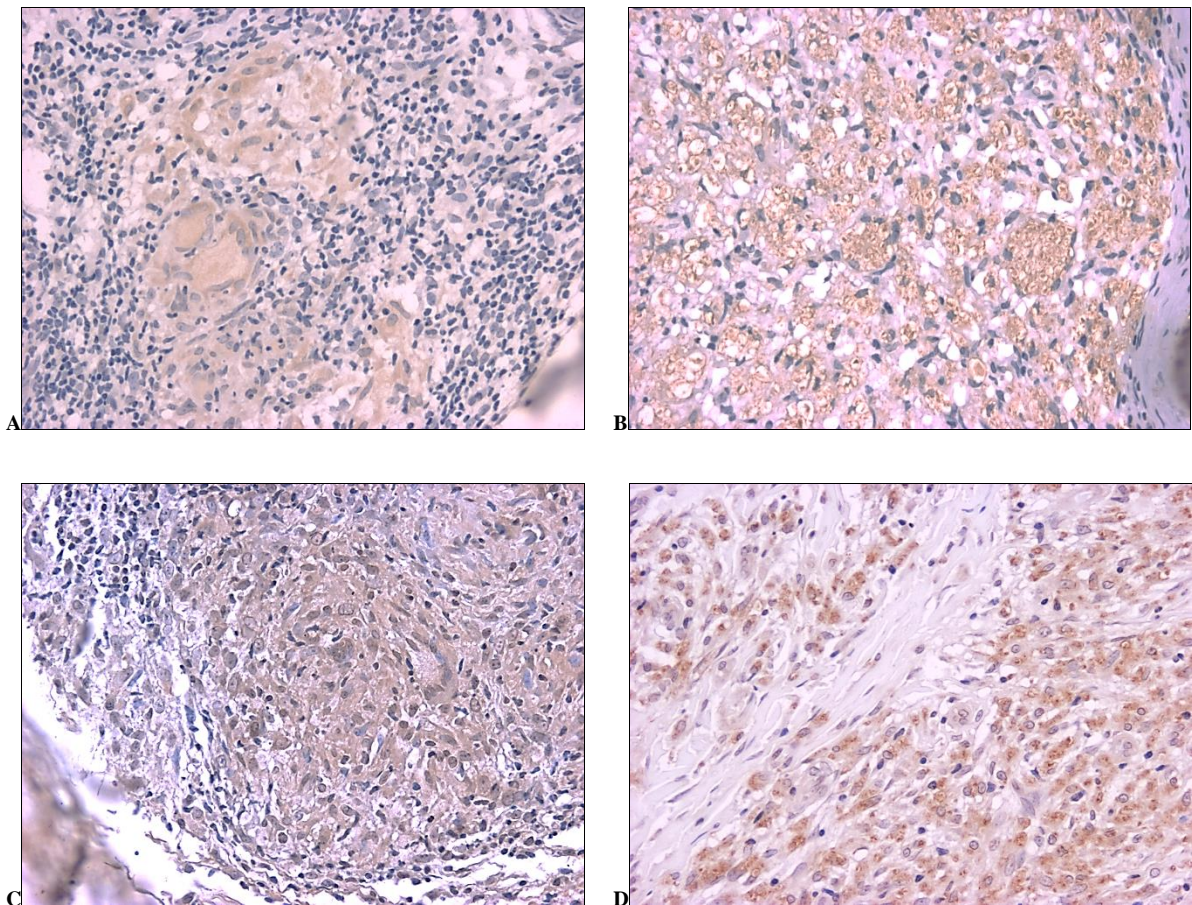
<b>Grupo</b>	<b>VV/DV</b>	<b>IND</b>	<b>DT/TT</b>	<b>VV</b>	<b>DV</b>	<b>DT</b>	<b>TT</b>
<b>CD14/CD16</b>	0,7	0,6	0,6	0,8	0,4	0,6	0,7

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), IND (forma indeterminada), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide), VV/DV (formas virchowiana e dimorfa-virchowiana), DT/TT (formas dimorfa-tuberculoide e tuberculoide).



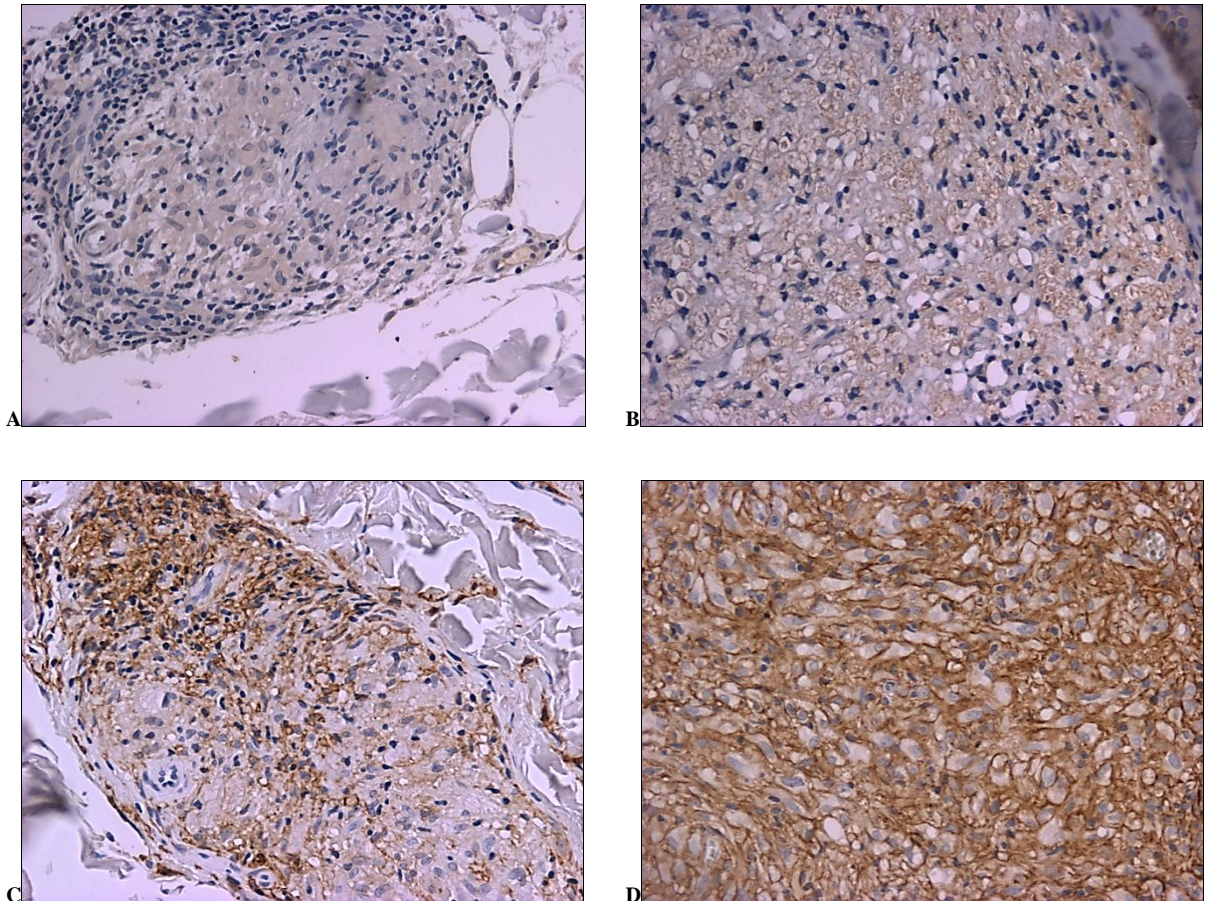
### 5.5. A MARCAÇÃO PARA CD62L, CD68, CD14 E CD16

A maioria das células com morfologia típica de macrófagos nas lesões de pele das diferentes formas de hanseníase foi positiva para os marcadores CD62L, CD68, CD14 e CD16. Dentre estas, a marcação do antígeno CD68 foi a que mostrou maior porcentagem média de células marcadas. Poucas células com morfologia típica de linfócitos foram marcadas para CD62L, independente da forma estudada (Figura 10).



**Figura 10: Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD68 e CD62L em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x).** A- Forma tuberculoide com marcação para CD68: as células epitelioides e as células gigantes multinucleadas são ressaltadas pela marcação, que não diferenciou subpopulações de macrófagos. B- Forma virchowiana com marcação para CD68: as células espumosas são igualmente ressaltadas pela marcação. C- Forma tuberculoide com marcação para CD62L: células epitelioides e células gigantes multinucleadas são ressaltadas pela marcação. A marcação de linfócitos não é significativa. D- Forma virchowiana com marcação para CD62L: em todos os casos de forma virchowiana houve marcação de macrófagos na imuno-histoquímica para CD62L.

Com a marcação para CD16, foi possível perceber um padrão de distribuição centro-periferia para os macrófagos de lesões das formas TT e DT. Os macrófagos CD16<sup>+</sup> eram visualizados mais na periferia dos granulomas, de permeio aos linfócitos, enquanto os macrófagos do centro dos granulomas eram, em sua maioria, CD16<sup>-</sup>. As demais marcações não apresentaram uma distribuição espacial específica (Figura 11).



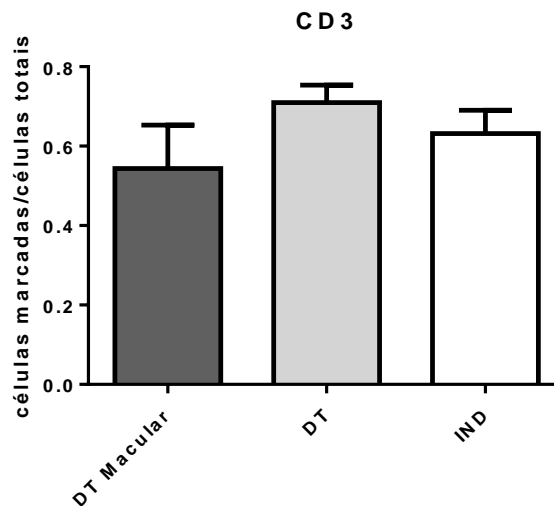
**Figura 11: Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD14 e CD16 em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x).** A- Forma dimorfa-tuberculoide com marcação para CD14: as células epitelioides do centro do granuloma foram bem marcadas. B- Forma virchowiana com marcação para CD14: o padrão de marcação citoplasmático predomina. C- Forma tuberculoide com marcação para CD16: os macrófagos da periferia do granuloma são marcados, enquanto os do centro não são. D- Forma virchowiana com marcação para CD16: o padrão de marcação membranoso típico.

## **5.6. COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DT MACULAR X FORMA DT X FORMA IND QUANTO ÀS MARCAÇÕES PARA CD3, CD4, CD8, CD62L, CD68, CD14 E CD16**

A classificação DT engloba um grupo especial de pacientes que possuem lesões maculares hipocrômicas múltiplas. As biópsias de pele destes pacientes exibem um infiltrado inflamatório semelhante àquele característico da forma IND, ou seja, um infiltrado linfocitário de distribuição perivascular, perianexial e perineural, sem a formação de granulomas. Até hoje, os estudos de imunofenotipagem de linfócitos em lesões de hanseníase não avaliaram estes pacientes de forma específica. Para avaliar as características imunofenotípicas do infiltrado inflamatório das lesões de pele dos três pacientes com forma DT macular desta amostra, o grupo DT foi dividido. Como as características anatomopatológicas do grupo DT macular são semelhantes às da forma IND, os pacientes com esta última forma foram incluídos na comparação.

Na imuno-histoquímica para CD3, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 903,5 (mín: 788; máx: 1035); DT = 2.439,6 (mín: 836; máx: 8.188); IND = 1.277,5 (mín: 801; máx: 1.670).

Não houve diferença significativa ( $p = 0,2$ ) entre as médias de percentagem de células marcadas para CD3 entre os grupos das formas DT e IND e o grupo de pacientes com a forma DT com lesões maculares, respectivamente, 74,2%; 63,2%; 54,3% (Gráfico 15).



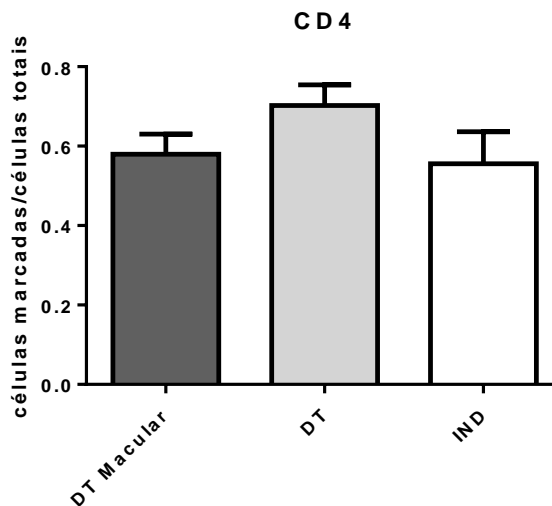
**Gráfico 15** - Percentagem média de células marcadas para CD3 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 12$  (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Percentagem de células marcadas: DT Macular = 54,3%, DT = 74,2%, IND = 63,2%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,2$ .

Na imuno-histoquímica para CD4, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 971,9 (mín: 921; máx: 1.050); DT = 1.897,5 (mín: 982; máx: 4.344); IND = 1.366,1 (mín: 868; máx: 1.720).

Não houve diferença significativa ( $p = 0,37$ ) entre as médias de percentagem de células marcadas para CD4 entre os grupos das formas DT e IND e o grupo de pacientes com a forma DT com lesões maculares (respectivamente: 67,5%; 55,6%; 58,0%) (Gráfico 16).



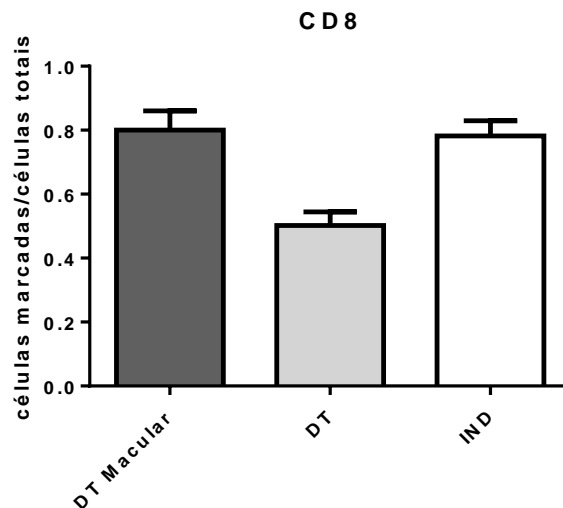
**Gráfico 16** - Percentagem média de células marcadas para CD4 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 12$  (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Percentagem de células marcadas: DT Macular = 58,0%, DT = 67,5%, IND = 55,6%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,37$ .

Na imuno-histoquímica para CD8, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 908,5 (mín: 789; máx: 1.038); DT = 2.155,6 (mín: 909; máx: 6.265); IND = 1.255,8 (mín: 806; máx: 1.619).

A percentagem de células marcadas para CD8 foi menor ( $p = 0,02$ ) no grupo de pacientes com a forma DT do que nos grupos com as formas IND e DT macular (respectivamente: 50,0%; 78,2%; 80,0%). Na marcação para CD8, o grupo DT-macular apresentou uma imunofenotipagem mais semelhante ao grupo indeterminado que ao grupo DT (Gráfico 17).



**Gráfico 17** - Percentagem média de células marcadas para CD8 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

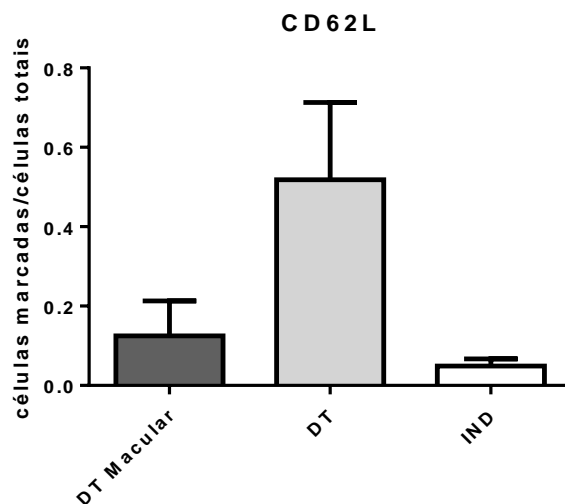
Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 12$  (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Percentagem de células marcadas: DT Macular = 80,0%, DT = 50,0%, IND = 78,2%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,02$ .

A relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD4 e para CD8 (CD4/CD8) foi de 0,7 para o grupo da forma DT macular, de 0,7 para o grupo da forma IND e de 1,4 para o grupo da forma DT. O grupo DT-macular apresentou preponderância da marcação para CD8 enquanto o grupo DT apresentou preponderância da marcação para CD4.

Na imuno-histoquímica para CD62L, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 927,5 (mín: 832; máx: 1.041); DT = 2.376,3 (mín: 1.000; máx: 6.888); IND = 1.299,4 (mín: 821; máx: 1.669).

A porcentagem de células marcadas para CD62L foi maior no grupo de pacientes com a forma DT do que nos grupos com as formas DT macular e IND (respectivamente: 12,5%; 51,8%; 4,9%), porém sem significância estatística ( $p = 0,16$ ). Na marcação para CD62L, o grupo DT-macular apresentou uma imunofenotipagem mais semelhante ao grupo IND (Gráfico 18).



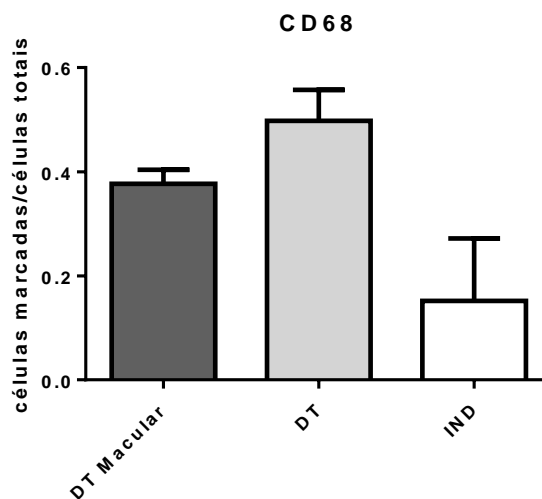
**Gráfico 18** - Porcentagem média de células marcadas para CD62L por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas: n = 12 (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Porcentagem de células marcadas: DT Macular = 12,5%, DT = 51,8%, IND = 4,9%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,16$ .

Na imuno-histoquímica para CD68, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 903,5 (mín: 785; máx: 1.035); DT = 2.476,0 (mín: 805; máx: 5.242); IND = 1.337,7 (mín: 803; máx: 1.626).

A porcentagem de células marcadas para CD68 foi menor no grupo de pacientes com a forma IND do que nos grupos com as formas DT e DT macular (respectivamente: 15,2%; 48,5%; 37,6%), porém sem significância estatística ( $p = 0,2$ ). Na marcação para CD68, o grupo DT-macular apresentou uma imunofenotipagem mais semelhante ao grupo DT que ao grupo da forma IND (Gráfico 19).



**Gráfico 19** - Porcentagem média de células marcadas para CD68 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

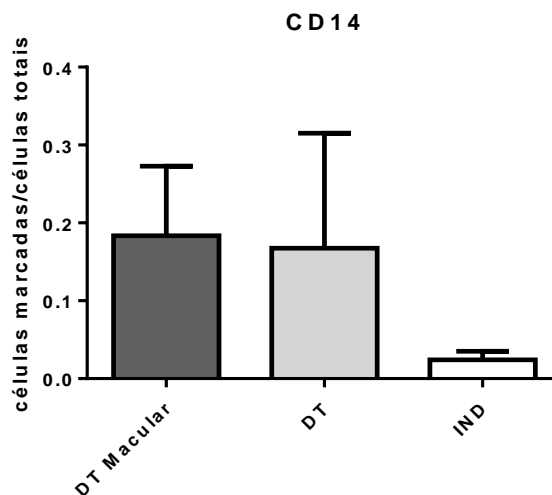
Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 12$  (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Porcentagem de células marcadas: DT Macular = 37,6%, DT = 48,5%, IND = 15,2%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,2$ .



Na imuno-histoquímica para CD14, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 798,3 (mín: 758; máx: 811); DT = 2.458,2 (mín: 808; máx: 6.984); IND = 1.422,8 (mín: 699; máx: 2.004).

Não houve diferença significativa ( $p = 0,28$ ) das médias de porcentagem de células marcadas para CD14 entre os grupos das formas IND, DT e DT com lesões maculares (respectivamente: 2,4%; 16,7%; 18,3%). Mas, da mesma forma que para a marcação para CD68, o grupo DT macular se assemelhou mais ao grupo DT que ao grupo da forma IND (Gráfico 20).



**Gráfico 20** - Porcentagem média de células marcadas para CD14 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

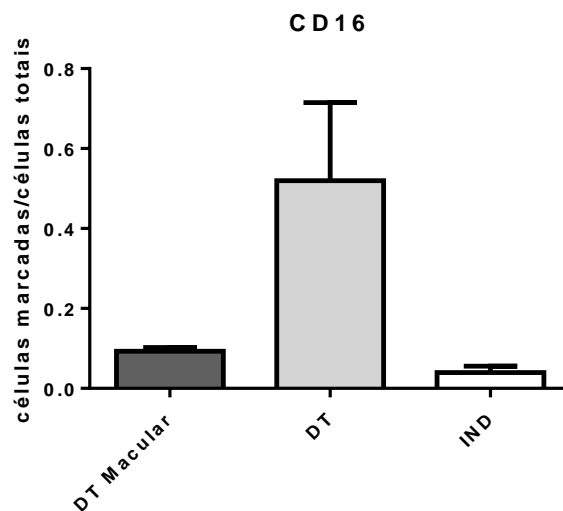
Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 12$  (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Porcentagem de células marcadas: DT Macular = 18,3%, DT = 16,7%, IND = 2,4%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,28$ .

Na imuno-histoquímica para CD16, o número total de células contadas em cada caso (média, mínimo e máximo), para estes grupos, foi: DT macular = 793,2 (mín: 634; máx: 951); DT = 2.107,5 (mín: 676; máx: 5.306); IND = 1.462,9 (mín: 612; máx: 2.319).

A porcentagem de células marcadas para CD16 foi maior no grupo de pacientes com a forma DT do que nos grupos com as formas IND e DT macular (respectivamente: 42,5%; 4,0%; 9,3%), porém sem significância estatística ( $p = 0,09$ ). Ao contrário das marcações para CD68 e CD14, aqui, o grupo DT macular se assemelhou mais ao grupo da forma IND do que ao grupo DT (Gráfico 21).

A relação entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD14 e para CD16 (CD14/CD16) foi de 2,0 para o grupo da forma DT macular e de 0,4 e 0,6 para os grupos das formas DT e IND, respectivamente. O grupo DT-macular apresentou preponderância da marcação para CD14 enquanto o grupo DT apresentou preponderância da marcação para CD16.



**Gráfico 21** - Porcentagem média de células marcadas para CD16 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com hanseníase das formas dimorfa-tuberculoide macular, dimorfa-tuberculoide e indeterminada.

Legenda: DT Macular (forma dimorfa-tuberculoide com lesões maculares), DT (forma dimorfa-tuberculoide, excluídos os pacientes com lesões maculares), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 12$  (DT Macular = 3, DT = 4, IND = 5). Porcentagem de células marcadas: DT Macular = 9,3%, DT = 42,5%, IND = 4,0%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,09$ .

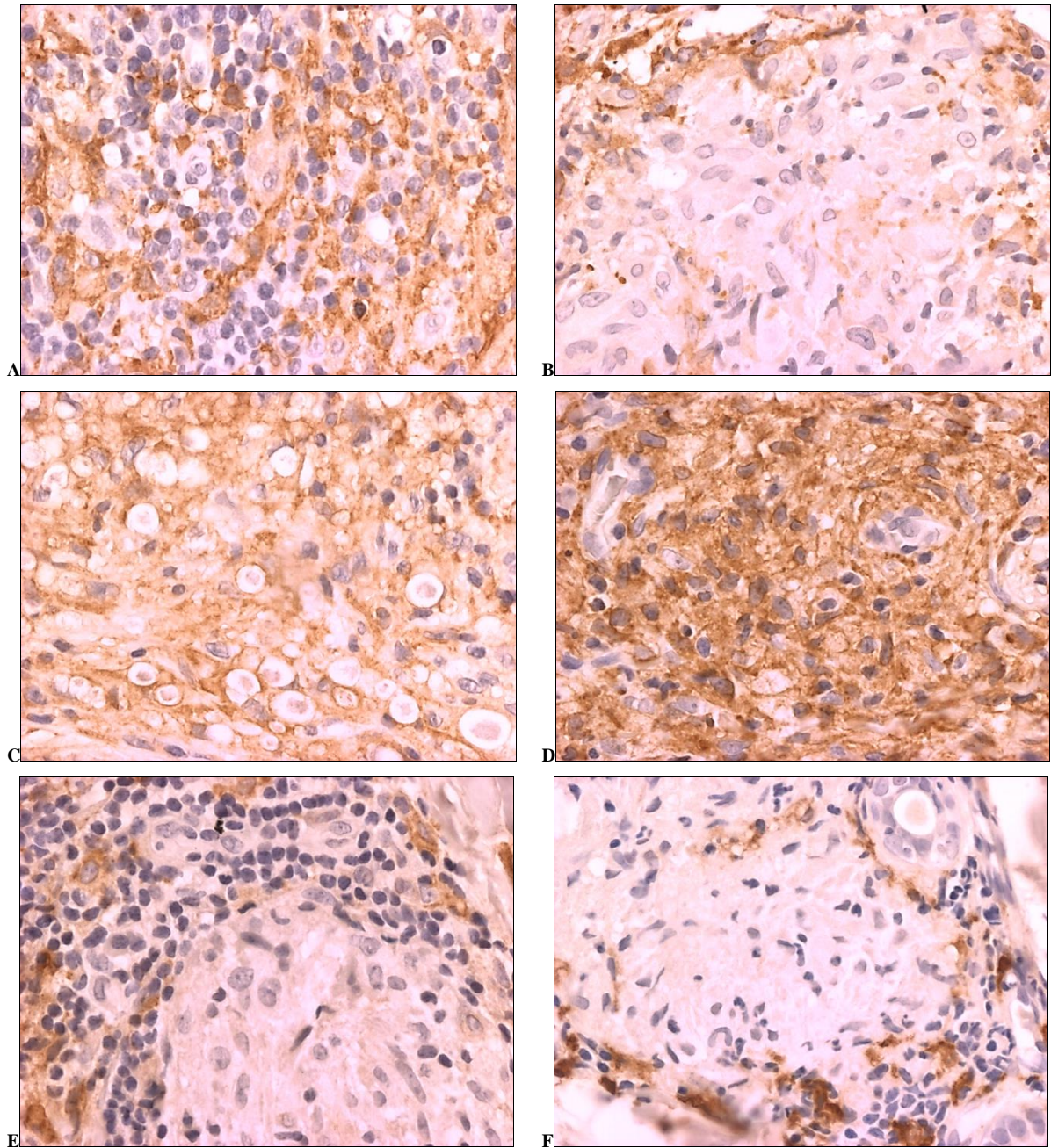
## 5.7. MARCAÇÃO PARA CD163, L1, FERRO

No momento da quantificação da marcação por CD163, L1 e ferro já haviam sido incluídos, e tiveram então suas biópsias avaliadas com estas colorações, 53 pacientes (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7).

As células marcadas para CD163 tem uma morfologia típica de macrófagos (Figura 12). Nos casos das formas VV e DV a marcação evidenciou o citoplasma amplo e de coloração acastanhada clara de células maiores, com núcleo maior, claro e mais vesiculoso. Nos casos das formas TT e DT a marcação ressaltou o citoplasma de células um pouco menores, mas, ainda sim, maiores que linfócitos. Nestes casos, as células marcadas apresentaram citoplasma de coloração acastanhada mais intensa e apresentavam núcleo um pouco menos vesiculoso que as anteriores.

A marcação citoplasmática de coloração menos intensa dos macrófagos espumosos das formas VV e DV foi devida a um padrão de marcação que poupou as vesículas lipídicas citoplasmáticas. A marcação citoplasmática dessas células teve um aspecto vesicular, no qual as vesículas lipídicas incolores foram demarcadas e ressaltadas por uma fina linha externa de marcação acastanhada.

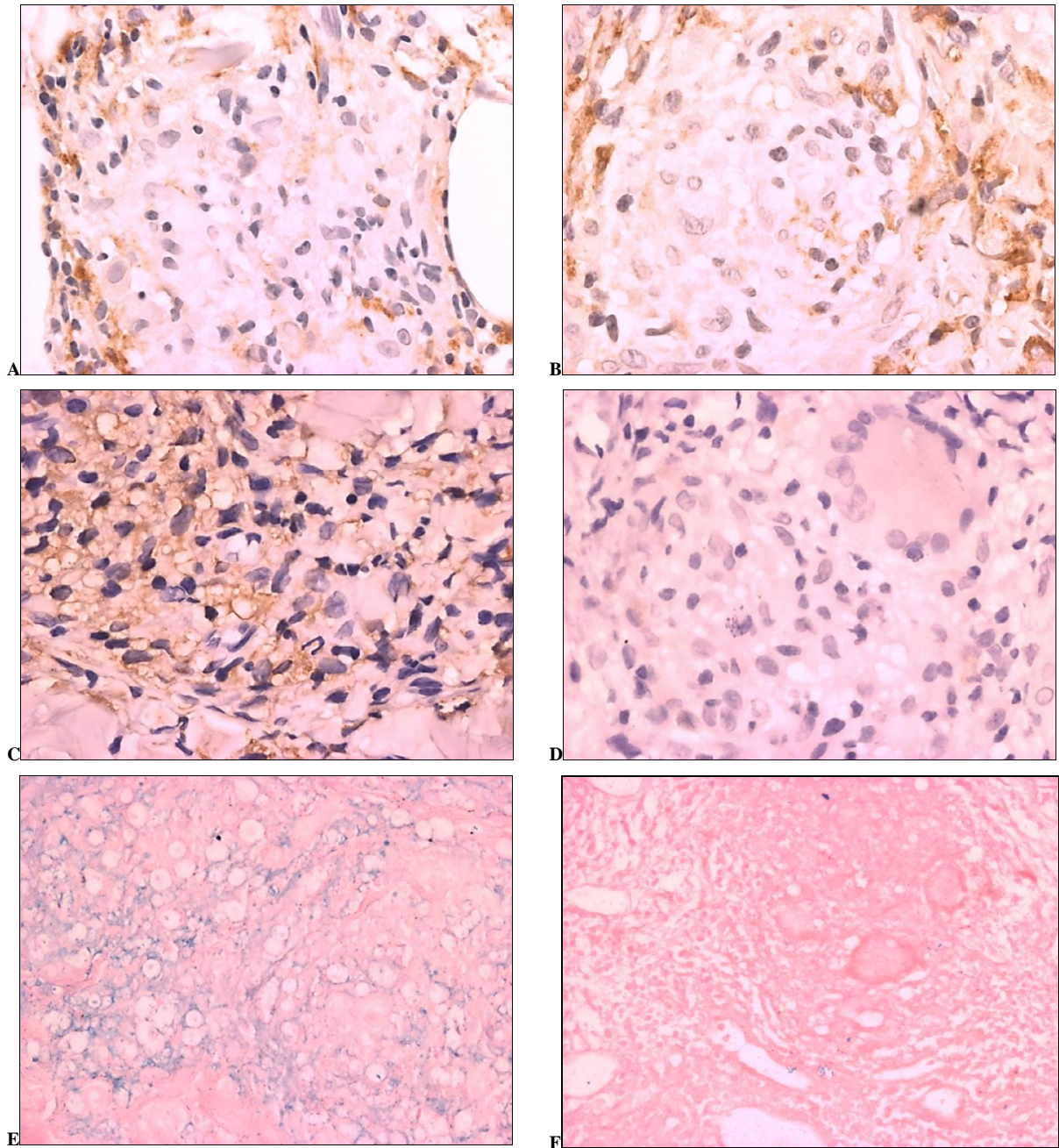
A coloração para CD163 apresentou um gradiente de concentração nos granulomas das formas TT e DT. As células marcadas nestes granulomas estavam dispostas, em sua maioria, na região periférica, de permeio aos linfócitos. Raramente houve marcação de células na região central destes granulomas e, quando isso ocorreu, tratou-se, quase sempre, de casos da forma DT. As células epitelioides e as células gigantes multinucleadas não apresentaram marcação para CD163 (Figura 12).



**Figura 12: Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD163 em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x).** A- Forma dimorfo-virchowiana: notar que a marcação evidenciou o citoplasma amplo e de coloração acastanhada clara de células maiores, com núcleo amplo, claro e vesiculoso. B- Forma tuberculoide: notar que a marcação a marcação ressaltou o citoplasma de células um pouco menores, com coloração acastanhada mais intensa e de núcleo um pouco menos vesiculoso. C- Forma virchowiana: notar a marcação citoplasmática de aspecto vesicular, em que as vesículas lipídicas foram ressaltadas por fina linha externa de marcação acastanhada. D- Forma virchowiana: a maioria das células foram marcadas para CD163. E/F- Formas dimorfo-tuberculoide e tuberculoide, respectivamente. As células marcadas nos granulomas estão dispostas na região periférica, de permeio aos linfócitos. As células epitelioides não apresentaram marcação.

A coloração para L1 mostrou-se menos informativa que a coloração para CD163, na medida em que a intensidade de marcação foi menor, bem como a quantidade de células marcadas. Não foi possível perceber um gradiente de concentração de células marcadas nos granulomas das formas TT e DT. Apesar de não ter havido marcação de células no centro dos granulomas, não houve marcação de células em sua periferia (Figura 13).

A coloração para ferro evidenciou depósitos intracelulares sobretudo nos casos da forma VV. A localização intracelular dos depósitos foi evidenciada pelo aspecto vesicular da marcação, causado pela presença das vesículas lipídicas no citoplasma das células espumosas. Não é possível discernir se houve marcação de depósitos extracelulares de ferro (Figura 13).

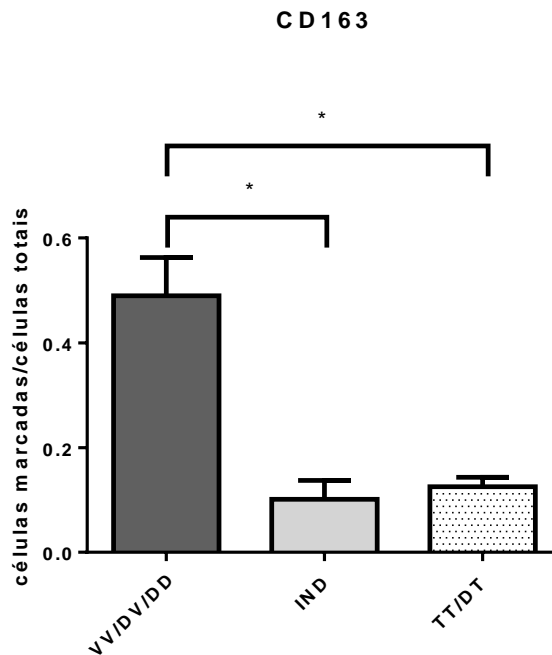


**Figura 13: Detalhes da marcação imuno-histoquímica para CD163 e L1 e da marcação para ferro em biópsias de pele de lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase (aumento 400x).** A/B- Forma tuberculoide e marcação para CD163 evidenciando um gradiente de marcação centro-periferia. C- Forma virchowiana e marcação para L1: a intensidade de marcação foi menor que a obtida para os casos de forma virchowiana marcados com CD163. D- Forma tuberculoide e marcação para L1: não há o gradiente de concentração centro-periferia evidente na marcação para CD163. E- Forma virchowiana: a localização intracelular dos depósitos de ferro é evidenciada pelo aspecto vesiculoso da marcação, causado pela presença das vesículas lipídicas no citoplasma das células espumosas. F- Forma tuberculóide: a coloração para depósitos de ferro é negativa.

## 5.8. QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO PARA CD163, L1, FERRO

Na imuno-histoquímica para CD163, o número total médio de células contadas em cada caso, conforme as diferentes formas, foi: VV = 3.049,9 (mín: 592; máx: 4.724); DV = 2.891 (mín: 354; máx: 5.925); DD = 1.429; DT = 3.863,3 (mín: 96; máx: 10.633); TT = 3.294,6 (mín: 760; máx: 5.250); IND = 1.190,1 (mín: 386; máx: 2.218).

A porcentagem média de células marcadas para CD163 foi maior no grupo das formas VV/DV/DD do que na forma IND e no grupo das formas DT/TT, respectivamente, 49,0%; 10,1%; 12,5% ( $p = 0,0003$ ) (Gráfico 22).

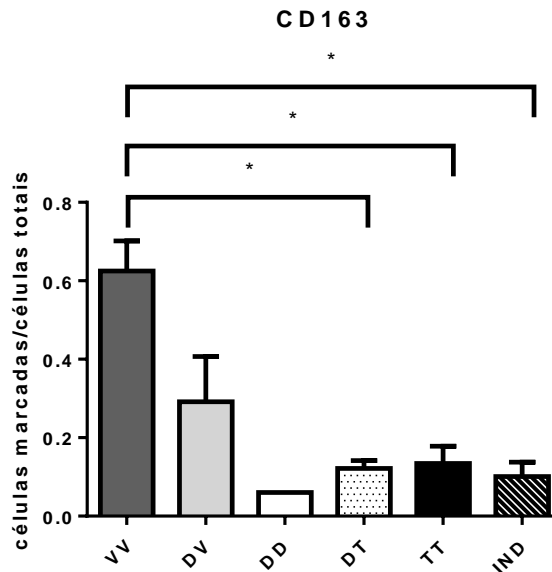


**Gráfico 22** - Porcentagem média de células marcadas para CD163 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV/DV (formas virchowiana, dimorfa-virchowiana e dimorfa-dimorfa), IND (forma indeterminada), TT/DT (formas tuberculoide e dimorfa-tuberculoide).

Notas:  $n = 53$  (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7). Porcentagem de células marcadas: VV/DV/DD = 49,0%, IND = 10,1%, TT/DT = 12,5%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,0003$ .

A quantidade de células marcadas para CD163 foi maior à medida que se aproximou do polo virchowiano (VV=62,5%, DV=29,1%, DD=6,0%, DT=12,2%, TT=13,4%, IND=10,1%) (Gráfico 23).



**Gráfico 23** - Porcentagem média de células marcadas para CD163, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

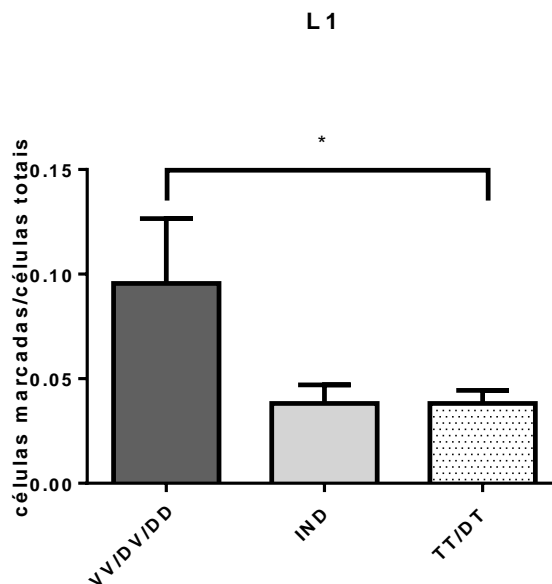
Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), DD (forma dimorfa-dimorfa), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide), IND (forma indeterminada).

Notas: n = 53 (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7). Porcentagem de células marcadas: VV=62,5%, DV=29,1%, DD=6,0%, DT=12,2%, TT=13,4%, IND=10,1%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,0002$ .



Na imuno-histoquímica para L1, o número total médio de células contadas em cada caso, conforme as diferentes formas, foi: VV = 3.738,8 (mín: 1433; máx: 5.778); DV = 4.089,8 (mín: 967; máx: 7.150); DD = 609; DT = 4.730,5 (mín: 427; máx: 11.723); TT = 3.426,8 (mín: 1.171; máx: 4.697); IND = 1.293,1 (mín: 796; máx: 2.377).

Em todos os casos, a quantidade de células marcadas para L1 foi menor que a quantidade de células marcadas para CD163. A percentagem média de células marcadas para L1 foi maior no grupo das formas VV/DV/DD do que na forma IND e no grupo das formas DT/TT, respectivamente, 9,5%; 3,8%; 3,8% ( $p = 0,045$ ) (Gráfico 24).

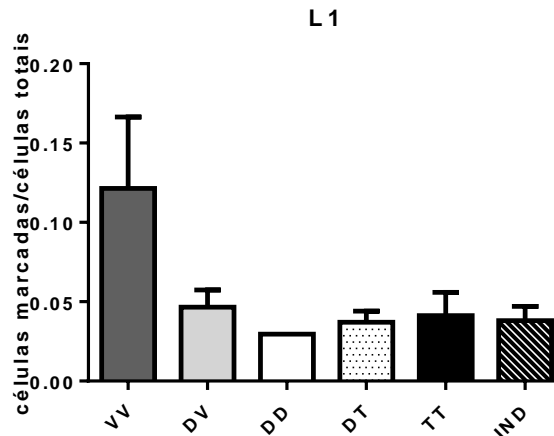


**Gráfico 24** - Percentagem média de células marcadas para L1 por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV/DV (formas virchowiana, dimorfa-virchowiana e dimorfa-dimorfa), IND (forma indeterminada), TT/DT (formas tuberculoide e dimorfa-tuberculoide).

Notas:  $n = 53$  (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7). Percentagem de células marcadas: VV/DV/DD = 9,5%, IND = 3,8%, TT/DT = 3,8%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,045$ .

O comportamento da marcação para L1 foi semelhante ao da marcação para CD163, uma vez que a quantidade de células marcadas para L1 foi maior à medida que se aproximou do polo virchowiano (VV=12,1%, DV=4,6%, DD=2,9%, DT=3,7%, TT=4,1%, IND=3,8%) (Gráfico 25).



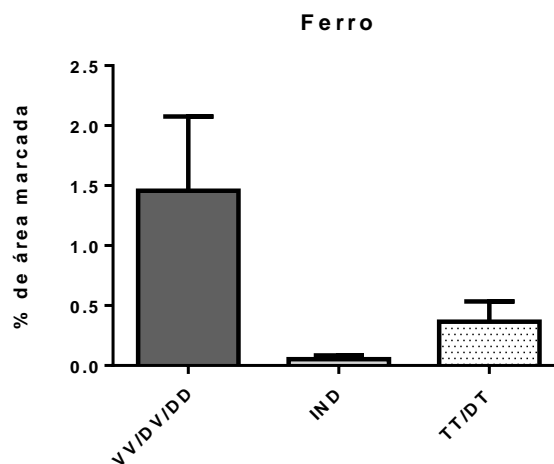
**Gráfico 25** - Porcentagem média de células marcadas para L1, por imuno-histoquímica *in situ* de lesões de pele de pacientes, estratificada conforme as diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), DD (forma dimorfa-dimorfa), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide), IND (forma indeterminada).

Notas: n = 53 (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7). Porcentagem de células marcadas: VV=12,1%, DV=4,6%, DD=2,9%, DT=3,7%, TT=4,1%, IND=3,8%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,16$ .

Na marcação para ferro, a área total média avaliada em cada caso, conforme as diferentes formas, foi: VV =  $4,6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  (mín:  $1,2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ; máx:  $8,7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ); DV =  $3,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  (mín:  $0,6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ; máx:  $5,8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ); DD =  $3,3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ; DT =  $3,7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  (mín:  $0,6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ; máx:  $6,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ); TT =  $3,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  (mín:  $1,0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ; máx:  $6,0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ); IND =  $3,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  (mín:  $2,3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ; máx:  $5,0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ).

A porcentagem média de área marcada para ferro foi maior no grupo das formas VV/DV/DD do que na forma IND e no grupo das formas DT/TT, respectivamente, 1,45%; 0,05%; 0,36%, porém sem significância estatística ( $p = 0,08$ ) (Gráfico 26).

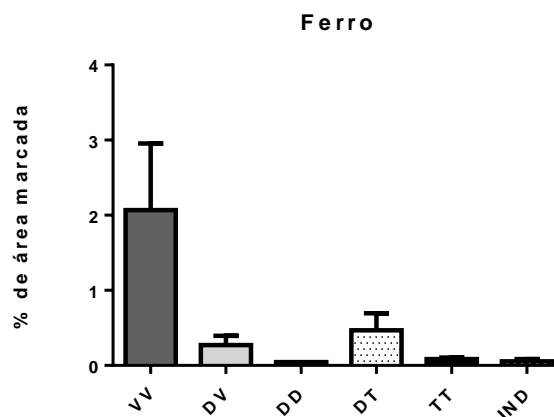


**Gráfico 26** - Porcentagem média de área marcada para ferro em lesões de pele de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Legenda: VV/DV/DV (formas virchowiana, dimorfa-virchowiana e dimorfa-dimorfa), IND (forma indeterminada), TT/DT (formas tuberculoide e dimorfa-tuberculoide).

Notas:  $n = 53$  (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7). Porcentagem de área marcada: VV/DV/DD = 1,45%, IND = 0,05%, TT/DT = 0,36%. Teste Kruskal-Wallis:  $p = 0,08$ .

A porcentagem de área marcada para ferro foi maior na forma VV que nas demais (VV=2,1%, DV=0,27%, DD=0,04%, DT=0,5%, TT=0,08%, IND=0,05%), porém sem significância estatística ( $p = 0,24$ ) (Gráfico 27).



**Gráfico 27** - Porcentagem média de área marcada para ferro em lesões de pele de pacientes com hanseníase, estratificada conforme as diferentes formas da doença.

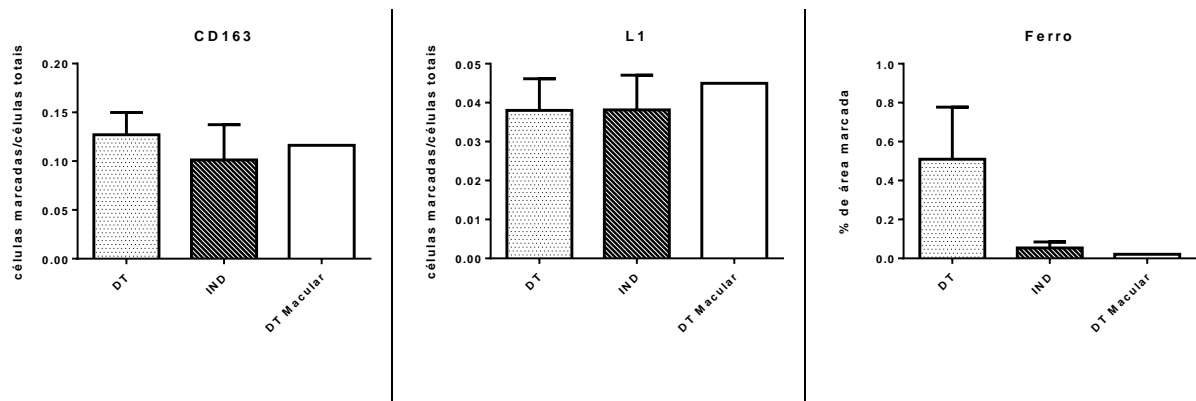
Legenda: VV (forma virchowiana), DV (forma dimorfa-virchowiana), DD (forma dimorfa-dimorfa), DT (forma dimorfa-tuberculoide), TT (forma tuberculoide), IND (forma indeterminada).

Notas:  $n = 53$  (TT=7, DT=20, DD=1, DV=6, VV=12, IND=7). Porcentagem de área marcada: VV=2,1%, DV=0,27%, DD=0,04%, DT=0,5%, TT=0,08%, IND=0,05%. Teste Kruskal-Wallis:  $p < 0,24$ .

### **5.9. A MARCAÇÃO CD163, L1, FERRO EM ALGUNS CASOS DISCORDANTES**

Alguns casos com discordância dos componentes clínico e histopatológico da classificação de Ridley e Jopling tiveram as marcações para CD163, L1 e ferro comparadas aos casos típicos, sem discordância. Estes casos foram escolhidos por representarem controvérsias importantes na classificação da hanseníase. Dessa forma, foram avaliados três casos envolvendo a discordância DT x IND. O primeiro deles é representante do grupo DT-macular. O segundo representa uma discordância comum, na qual o exame anatomopatológico destoava da exuberância das manifestações clínicas e resulta em achados discretos. O terceiro demonstra a importância da biópsia na identificação da forma DT frente a manifestações clínicas inicialmente sugestivas da forma IND. Também foi escolhido um caso envolvendo a discordância TT x IND, em que o componente destoante é o exame anatomopatológico. Por fim, um caso envolvendo a discordância DD x IND, representativo da dificuldade existente na identificação da rara forma DD.

O caso DT macular, com biópsia de forma IND, foi comparado com os grupos de forma IND e DT quanto às marcações para CD163, L1 e ferro. Não houve diferença em relação a marcação para CD163 e L1 entre este caso e os grupos. De fato, a marcação para CD163 e L1 não diferiu entre os grupos de forma IND e DT nesta amostra. Por outro lado, a porcentagem de área marcada para ferro na biópsia do paciente DT macular se assemelhou mais aos casos da forma IND que aos casos da forma DT. A marcação para ferro foi mais compatível com a classificação histopatológica que com a classificação clínica (Gráfico 28).

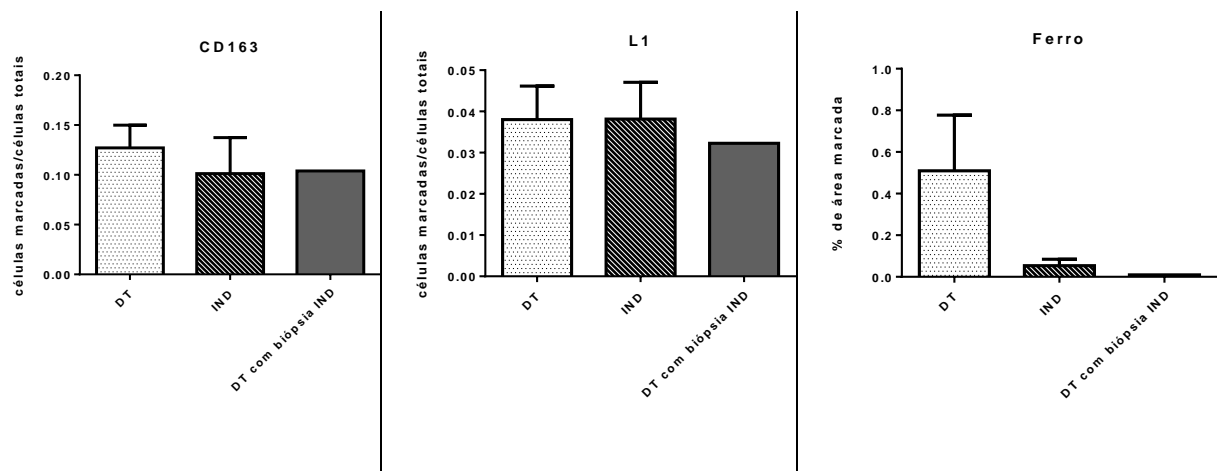


**Gráfico 28** - Comparação entre um caso com manifestação clínica da forma DT-macular e biópsia da forma IND e os casos típicos de forma IND e DT, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro.

Legenda: DT (grupo de casos da forma dimorfa-tuberculoide), IND (grupo de casos da forma indeterminada), DT Macular (paciente com clínica atípica da forma DT: lesões maculares múltiplas e biópsia típica da forma IND).

Notas: n = 25 (DT=17, IND=7, DT Macular = 1). Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para CD163: DT=12,7%, IND=10,1%, DT macular=11,6%. Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para L1: DT=3,8%, IND=3,8%, DT macular=4,5%. Porcentagem de área marcada na coloração para ferro: DT=0,5%, IND=0,05%, DT Macular=0,02%.

O com típica clínica DT e biópsia de forma IND também foi comparado com os grupos de forma IND e DT quanto à marcação para CD163, L1 e ferro. Seus resultados foram semelhantes aos do paciente anterior. Sua biópsia mostrou mais semelhança com o grupo de forma IND, uma vez que a área marcada para ferro foi menor que a média do grupo de forma DT. A marcação para ferro foi mais compatível com a classificação histopatológica que com a classificação clínica (Gráfico 29).

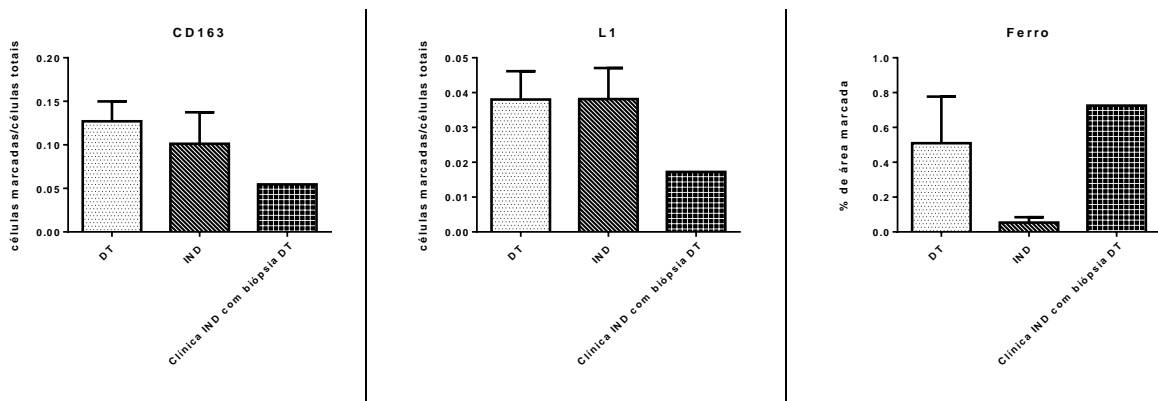


**Gráfico 29** - Comparação entre um caso com manifestação clínica típica da forma DT e biópsia da forma IND e os casos típicos de forma IND e DT, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro.

Legenda: DT (grupo de casos da forma dimorfa-tuberculoide), IND (grupo de casos da forma indeterminada), DT com biópsia IND (paciente com clínica típica da forma DT e biópsia típica da forma IND).

Notas: n = 25 (DT=17, IND=7, DT com biópsia IND = 1). Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para CD163: DT=12,7%, IND=10,1%, DT com biópsia IND=10,4%. Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para L1: DT=3,8%, IND=3,8%, DT com biópsia IND =3,2%. Porcentagem de área marcada na coloração para ferro: DT=0,5%, IND=0,05%, DT com biópsia IND =0,009%.

O caso com clínica da forma IND e biópsia de forma DT demonstrou área de marcação para ferro mais compatível com o grupo de forma DT do que com o grupo de forma IND. Mais uma vez, a marcação para ferro foi mais compatível com a classificação histopatológica que com a classificação clínica (Gráfico 30).



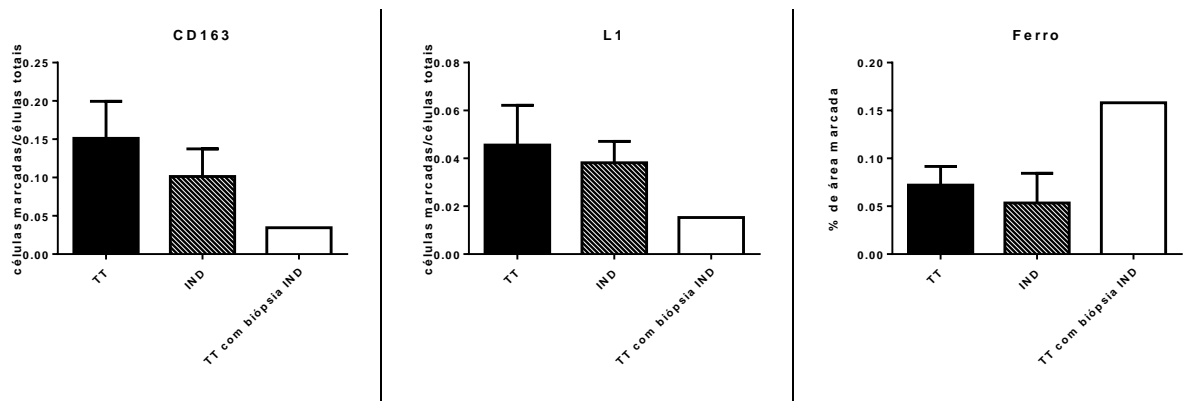
**Gráfico 30** - Comparação entre um caso com manifestação clínica típica da forma IND e biópsia típica da forma DT e os casos típicos de forma IND e DT, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro.

Legenda: DT (grupo de casos da forma dimorfa-tuberculoide), IND (grupo de casos da forma indeterminada), Clínica IND com biópsia DT (paciente com clínica típica da forma IND e biópsia típica da forma DT).

Notas: n = 25 (DT=17, IND=7, Clínica IND com biópsia DT = 1). Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para CD163: DT=12,7%, IND=10,1%, Clínica IND com biópsia DT =5,4%. Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para L1: DT=3,8%, IND=3,8%, Clínica IND com biópsia DT =1,7%. Porcentagem de área marcada na coloração para ferro: DT=0,5%, IND=0,05%, Clínica IND com biópsia DT =0,7%.



De forma interessante, um caso com clínica típica da forma TT, apresentou biópsia compatível com a forma IND. Os grupos de pacientes com as formas TT e IND apresentaram pouca marcação para CD163 e L1 e o caso em questão apresentou uma marcação ainda menor para estes marcadores. Todavia, sua marcação para ferro foi mais intensa que a dos referidos grupos (Gráfico 31).

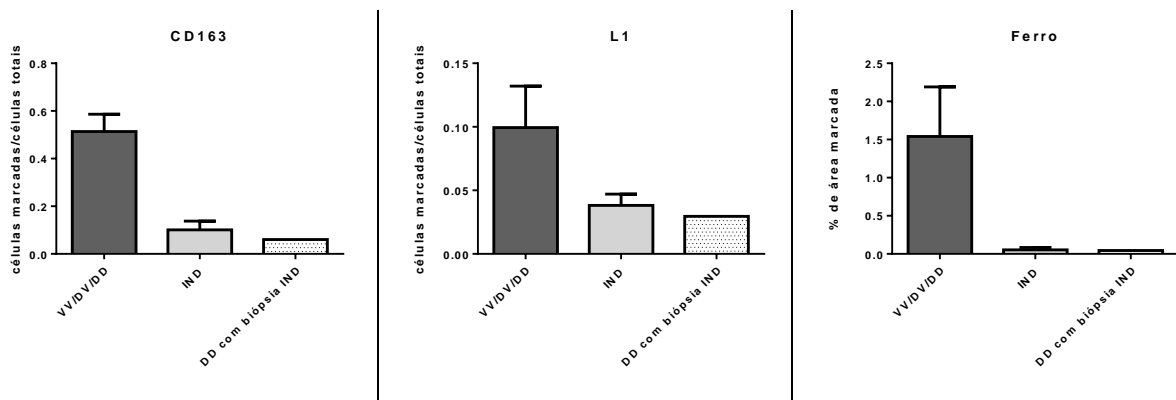


**Gráfico 31** - Comparação entre um caso com clínica da forma TT e biópsia da forma IND e os grupos de pacientes com formas TT e IND, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro.

Legenda: TT (grupo de casos da forma tuberculoide), IND (grupo de casos da forma indeterminada), TT com biópsia IND (paciente com clínica típica da forma TT e biópsia típica da forma IND).

Notas: n = 14 (TT=6, IND=7, TT com biópsia IND=1). Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para CD163: TT=15,1%, IND=10,1%, TT com biópsia IND=3,4%. Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para L1: TT=4,6%, IND=3,8%, TT com biópsia IND=1,5%. Porcentagem de área marcada na coloração para ferro: TT=0,07%, IND=0,05%, TT com biópsia IND =0,16%.

No caso classificado como forma DD, a biópsia foi compatível com a forma IND. Como apenas um paciente da amostra foi classificado com forma DD, como critério de comparação foi escolhido o grupo de pacientes multibacilares VV/DV/DD. Em relação a este caso, as marcações para CD163, L1 e ferro foram mais compatíveis com os resultados dos pacientes de forma IND que os daqueles do grupo VV/DV/DD. Mais uma vez, as marcações foram mais compatíveis com a classificação histopatológica que com a classificação clínica (Gráfico 32).



**Gráfico 32** - Comparação entre um caso com clínica da forma DD e biópsia da forma IND e os grupos de pacientes com formas VV/DV/DD e IND, quanto às marcações para CD163, L1 e ferro.

Legenda: VV/DV/DD (grupo de casos das formas virchowiana/dimorfa-virchowiana/dimorfa-dimorfa), IND (grupo de casos da forma indeterminada), DD com biópsia IND (paciente com clínica típica da forma DD e biópsia típica da forma IND).

Notas: n = 26 (VV/DV/DD=18, IND=7, DD com biópsia IND =1). Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para CD163: VV/DV/DD=51,3%, IND=10,1%, DD com biópsia IND=6,0%. Porcentagem de células marcadas na imuno-histoquímica para L1: VV/DV/DD=9,9%, IND=3,8%, DD com biópsia IND=2,9%. Porcentagem de área marcada na coloração para ferro: VV/DV/DD=1,54%, IND=0,05%, DD com biópsia IND =0,04%.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES

A concordância entre a classificação operacional da OMS e a classificação utilizada no serviço de referência foi apenas moderada ( $\kappa=0,49$ ). A contagem do número de lesões superestimou o número de pacientes multibacilares (42,9% x 38,8%) e, mesmo assim, classificou como paucibacilares 26,3% dos pacientes considerados multibacilares pela classificação do serviço de referência. Superestimar o número de pacientes multibacilares possibilita o surgimento de diferentes problemas, pois aumenta, desnecessariamente, o tempo de tratamento, de seis para doze meses. Isto onera o sistema público de saúde, onde o paciente é acompanhado durante todo o tratamento, além de causar transtornos ao próprio paciente, que será submetido a um tratamento com mais medicamentos do que deveria e por mais tempo, obrigando-o a se adaptar ao acompanhamento mensal substancialmente prolongado. Ou seja, aumentam-se a chance de efeitos adversos advindos da terapia e a chance de o paciente abandonar o tratamento antes de completa-lo. Por outro lado, classificar de forma errada o paciente como paucibacilar possibilita o surgimento de problemas diferentes, pois resulta em tratamento insuficiente. Primeiro, resultará em maior chance de recidiva e complicações decorrentes da doença. Segundo, dificultará o controle epidemiológico da hanseníase, uma vez que os casos multibacilares são os responsáveis pela disseminação da doença e sua manutenção.

Neste sentido, nossos resultados são corroborados pelos trabalhos de outros autores, que apontaram falhas semelhantes da classificação operacional da OMS. Em uma pesquisa com 264 pacientes nas Filipinas, 31-58% dos casos considerados multibacilares por meio de baciloscopia ou biópsia de pele apresentavam menos de seis lesões cutâneas e teriam sido tratados como paucibacilares se classificados apenas conforme o número de lesões (PARDILLO et al., 2007). Em um trabalho brasileiro, realizado no Estado de Sergipe, envolvendo os registros de 1213 pacientes, 11% dos casos com menos de seis lesões cutâneas apresentavam baciloscopia positiva (CAVALCANTI et al., 2012). A classificação operacional da OMS resulta em um número expressivo de “falsos-paucibacilares”.

A comparação entre as diferentes formas de classificação de hanseníase demonstrou que a classificação conforme o número de segmentos corporais afetados apresentou melhor concordância com a classificação utilizada no serviço de referência do que a classificação operacional da OMS. Mais que isso, a sensibilidade para a detecção de casos multibacilares obtida pela classificação conforme o número de segmentos corporais afetados foi superior à da classificação que leva em conta o número de lesões. A sensibilidade para a detecção de casos multibacilares é qualidade intrínseca fundamental de um método de classificação de hanseníase (GUPTA et al., 2012). Quanto melhor a sensibilidade do sistema de classificação para detecção de multibacilaridade, menores as chances de se submeter um paciente à dose insuficiente de poliquimioterapia, menores os índices de recidiva e melhor o controle epidemiológico da transmissão da hanseníase (LOCKWOOD et al., 2007).

Este bom desempenho já foi descrito por outros autores. Em um estudo envolvendo 756 pacientes, no Nepal, a sensibilidade e especificidade da classificação conforme os segmentos corporais afetados (três ou mais), comparada à baciloscopia e ao exame anatomopatológico, foi de 93% e 39%, respectivamente (VAN BRAKEL et al., 1992). Em outro trabalho, com 100 pacientes, na Índia, a classificação conforme o número de segmentos corporais afetados (dois ou mais) teve melhor sensibilidade (90% x 63%) que a classificação operacional da OMS, mas pior especificidade (75% x 85%) (GUPTA et al., 2012).

Estes resultados parecem indicar que a dispersão das lesões ao longo da superfície cutânea seja um melhor indicador de multibacilaridade do que a contagem simples das lesões. Outra explicação pode ser o fato de a classificação conforme o número de segmentos corporais afetados levar em consideração não apenas a presença de lesões cutâneas, mas também o acometimento neurológico. Lesões cutâneas concomitantes a neuropatias em segmentos corporais distintos são clinicamente mais sugestivos de casos multibacilares (ARAÚJO, 2003). De qualquer maneira, se por um lado a inclusão do critério neurológico melhora a sensibilidade da classificação conforme o número de segmentos corporais, por outro, a necessidade da avaliação neurológica a torna de mais complexa efetivação fora dos serviços de referência em hanseníase.

Quanto à classificação de Ridley e Jopling, a concordância plena entre o componente clínico e o componente anatomopatológico ocorreu em apenas 46,9% dos casos. Os próprios idealizadores da classificação obtiveram concordância plena em apenas 68% dos 82 casos que

estudaram (RIDLEY e JOPLING, 1966). Meyers et al., estudando 1429 pacientes, relataram concordância plena em 77,2% dos casos, mas não publicaram seus resultados completos (MEYERS *et al.*, 1979). Sehgal et al. estudaram 82 pacientes e houve concordância perfeita em apenas 42,7% (SEHGAL et al., 1977).

No presente trabalho, a melhor concordância clínico-patológica foi para a forma VV (85,7%), seguida da forma IND (72,7%), achados semelhantes ao de outros autores (BHATIA et al., 1993; MOORTHY et al., 2001; SHARMA et al., 2008; SANTOS et al., 2013). A pior taxa de concordância foi para a forma DV (14,3%), para a qual outros autores relataram concordâncias entre 43% e 70% (SEHGAL et al., 1980; BHATIA et al., 1993; MOORTHY et al., 2001; SHARMA et al., 2008; LOCKWOOD et al., 2012). Na presente amostra, as discordâncias envolvendo o diagnóstico histológico de forma DV ocorreram em relação ao diagnóstico clínico de forma DT (cinco dos seis casos discordantes). Lockwood et al. estudaram 303 casos de hanseníase multibacilar e relataram que 41% dos pacientes com forma clínica DT foram reclassificados pelo exame anatomopatológico, sendo quase um terço deles para a forma DV (LOCKWOOD et al., 2012).

Diferentes fatores explicam a discordância clínico-patológica das formas DT e DV. Primeiro, algumas vezes, a diferenciação entre estas formas do espectro é difícil clinicamente. Segundo, os casos discordantes entre as duas formas podem representar simplesmente a instabilidade imunológica natural da hanseníase, com consequente dissociação clínica e anatomopatológica flagrada no momento da pesquisa (MOORTHY et al., 2001; LOCKWOOD et al., 2012). Terceiro, a dificuldade pode ser mais de ordem prática. Apesar de pormenorizados e específicos, os critérios anatomopatológicos de Ridley e Jopling não são de fácil interpretação. Em alguns casos é muito difícil diferenciar um infiltrado em que predominam os macrófagos com pequenas vesículas de gordura de um infiltrado em que predominam células epitelioides, fato é que o índice baciloscópico foi ressaltado por Ridley como um critério importante para a diferenciação anatomopatológica das formas DT, DD e DV (RIDLEY, 1974).

Também foi baixa a correlação clínico-patológica da forma TT (28,6%). Dentre os casos clinicamente da forma TT, houve mais casos reclassificados para a forma DT do que confirmados pelo anatomopatológico. De forma inversa, dos 22 casos clinicamente classificados como DT, cinco foram reclassificados para forma TT pelo patologista.

Manandhar et al. tiveram confirmação histológica em apenas seis de 25 pacientes clinicamente classificados com a forma TT, enquanto treze foram reclassificados para forma DT (MANADHAR et al., 2013). Bhatia et al. estudaram 1272 pacientes e, diante de semelhantes discordâncias clínico-patológicas, relataram a impressão de que a linha de demarcação entre as formas TT e DT no exame anatomopatológico é incerta e que os critérios atuais de diferenciação não lhes parecem adequados (BHATIA et al., 1993).

Um grupo de pacientes clinicamente classificados como da forma DT apresentou exame anatomopatológico de forma IND ou com achados inespecíficos. Dos seis casos em que esta discordância aconteceu, em quatro os pacientes apresentavam múltiplas máculas hipocrômicas, demonstrando que, nem sempre, a classificação anatomopatológica de Ridley e Jopling deve suplantiar a classificação clínica. Tais pacientes não devem ser considerados como de forma IND. Este grupo especial de pacientes “DT-maculares” já foi relatado por outros autores e, em muitos casos, a biópsia de nervo periférico é condizente com a forma clínica, a despeito da inespecificidade da biópsia de pele (KAUR et al., 1993). De encontro com estes resultados estão os resultados de Srinivasan et al., que estudaram a concordância entre os laudos anatomopatológicos de biópsias retiradas de bordas opostas de uma mesma lesão em 42 pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase. Em apenas cinco casos os laudos foram discordantes, sendo um deles da forma IND e o outro da forma DT (CREE et al., 1988).

É interessante ressaltar a ausência da forma DD dentre os 49 pacientes incluídos no estudo comparativo entre as diferentes formas de classificação de hanseníase. Nenhum dos três pacientes clinicamente classificados como tal foi confirmado à biópsia. Trata-se de uma forma incomum, mas é interessante notar sua ausência nos laudos anatomopatológicos em trabalho envolvendo 303 pacientes multibacilares da coorte INFIR (LOCKWOOD et al., 2012). Em outro trabalho, em que três dermatopatologistas examinaram 100 biópsias no Malawi, a forma DD constou nos laudos de um único dermatopatologista, apenas na primeira rodada de interpretação. O mesmo não identificou a forma DD novamente na segunda rodada de interpretação (FINE et al., 1993). Pelos critérios da chave de classificação de Ridley e Jopling a diferença entre a classificação DT e a DD reside, fundamentalmente, na estimativa subjetiva do número de linfócitos que permeia o infiltrado inflamatório epitelióide. Na forma DT há um infiltrado linfocítico “moderado”, enquanto na DD este é “escasso”. É possível que a raridade da forma DD nos laudos anatomopatológicos decorra dessa questão prática.

## 6.2. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD3, CD4, CD8

Apesar de não ter havido diferença significativa entre as médias de porcentagem de células marcadas para CD3 entre os grupos, pôde-se perceber uma tendência de aumento das médias em direção ao polo TT. De fato, é esperado que nas formas DT e TT a participação dos linfócitos na composição do infiltrado inflamatório seja maior que nas demais formas (RIDLEY, 1974).

A classificação histopatológica de Ridley e Jopling diferencia as formas DV e VV, principalmente, pela quantidade de linfócitos que compõe cada uma delas. Se a quantidade de linfócitos é numerosa, a classificação é DV. Se a quantidade de linfócitos é moderada, a classificação é VV (RIDLEY, 1974). Este critério parece ser mais fácil de se escrever do que de se empregar. Não é simples diferenciar uma biópsia com linfócitos numerosos de outra com linfócitos moderados. É possível que esta dificuldade seja a explicação para o fato de, na amostra analisada, a quantificação de células CD3<sup>+</sup> ter sido semelhante para as formas DV e VV.

De forma condizente com os resultados de outros autores, a porcentagem média de células marcadas para CD4 foi maior no grupo DT/TT que no grupo VV/DV (NARAYANAN et al., 1986; DEWEESE et al., 1987; MODLIN et al., 1988). Todavia, com a separação destas formas polares, não houve diferença entre os grupos VV e DV. Pelos mesmos motivos já expostos, para a marcação para CD3, esperava-se que a quantificação de células CD4<sup>+</sup> fosse menor na forma VV que na forma DV. Caso os pacientes de forma VV estivessem em surto reacional tipo eritema nodoso, poderia haver aumento da contagem de células CD4<sup>+</sup>, mas este não foi o caso (REA et al., 1983).

É sabido que a marcação para CD4 não é específica para linfócitos. Há células da linhagem mononuclear fagocítica que expressam o CD4 (SATO et al., 2000; ESASHI et al., 2004; BABA et al., 2006). Sendo assim, poderia ser aventada a hipótese de ter havido marcação de macrófagos ou células dendríticas nas biópsias das lesões de forma VV, superestimando a contagem de células CD4<sup>+</sup>. Estima-se, entretanto, que a população de macrófagos que expressam CD4 seja pequena e específica de algumas condições inflamatórias. Da mesma forma, acredita-se que a população de células dendríticas nas lesões de hanseníase seja pequena. Sieling et al. mostraram que as células dendríticas correspondem a cerca de 1,5%

das células do infiltrado inflamatório das lesões de forma TT e são ainda mais raras nas lesões da forma VV (SIELING et al., 1999).

Em consonância com os resultados de outros autores as células CD8<sup>+</sup> predominaram nas lesões das formas DV e VV. A forma TT foi aquela em que as menores contagens de células CD8<sup>+</sup> foram encontradas. A relação CD4/CD8 foi uma variável ainda mais explicativa que as médias de marcação para CD4 e CD8 isoladamente. Os valores encontrados para as formas VV (0,5), DV (0,5), DT (1,1) e TT (1,7) estão de acordo com os trabalhos de outros autores (REA et al., 1983; NARAYANAN et al., 1986; MODLIN et al., 1988; IYER et al., 2007).

### 6.3. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD62L

O CD62L é um receptor de adesão endotelial tipo *homing*, também denominado L-selectina. Não foram encontrados estudos prévios sobre a marcação para CD62L em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Entretanto, os estudos feitos fora do contexto da doença indicam que a marcação positiva para CD62L ocorre em monócitos do subtipo clássico (YANG et al., 2014), linfócitos T de memória com fenótipo Th2 (KANEGANE et al., 1996) e linfócitos T *naive* (MATSUZAKI et al., 2005).

O CD62L é um marcador tanto para monócitos como para linfócitos. Sieling et al. demonstraram que a razão LT de memória/LT *naive* é de 14:1 nas lesões de forma TT e de 1:1 nas lesões de forma VV (SIELING e MODLIN, 1992). Todavia, os pesquisadores não pormenorizaram as subpopulações de LT de memória existentes: LT efetores (Th1) x LT de vigilância ou recirculação (Th2) (HENGEL et al., 2003).

No presente trabalho, entretanto, os linfócitos CD62L<sup>+</sup> foram raros, de um modo geral, nas lesões de pele de todas as formas de hanseníase e não explicam a maior positividade imunohistoquímica para CD62L nas lesões de forma VV e DV. Na verdade, tanto nas formas VV/DV quanto nas formas DT/TT, a maioria dos macrófagos apresentou marcação positiva para CD62L. À semelhança da marcação para CD68, a maior porcentagem de células CD62L<sup>+</sup> nas lesões do polo Th2 pode ser explicada pela menor diluição exercida pelos linfócitos sobre a contagem total de células no infiltrado inflamatório destas lesões, em contraste com as lesões das formas TT e DT, que, ricas em linfócitos, tem relativizada a positividade expressa por seus macrófagos classicamente ativados.



#### 6.4. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS MARCADAS PARA CD68, CD14, CD16

A marcação para CD68 foi mais exuberante nas lesões da forma VV que nas demais lesões. Esta é considerada uma marcação genérica para macrófagos, incapaz de diferenciá-los no espectro M1-M2 (BARROS et al., 2013). Uma possível explicação para a maior porcentagem média de células CD68<sup>+</sup> na forma VV seria o fato de o infiltrado das lesões da forma VV ser composto quase que exclusivamente por macrófagos. Por outro lado, nas lesões das demais formas, inclusive a forma DV, a quantidade de linfócitos é maior, diminuindo a porcentagem representada por macrófagos no total do infiltrado inflamatório. Esta impressão é compartilhada por outros pesquisadores (SUNDERKÖTTER et al., 2004).

Poucos autores estudaram a marcação para CD68 em lesões de hanseníase. De um modo geral, foi demonstrado que a maioria das células das lesões de forma VV são CD68<sup>+</sup>. Alguns autores perfizeram uma contagem absoluta de células CD68<sup>+</sup> em um número limitado de campos microscópicos (QUARESMA et al., 2010; DA COSTA et al., 2013; BOBOSHA et al., 2014), enquanto outros estimaram a porcentagem de células marcadas por método semi-quantitativo (LOCKWOOD et al., 2011). Bobosha et al. encontraram mais células CD68<sup>+</sup> nas lesões da forma VV que nas lesões das formas DT/TT (BOBOSHA et al., 2014). Lockwood et al. não detectaram diferença nas médias de porcentagem de células CD68<sup>+</sup> de pacientes com as formas VV, DV e DT. Estes autores não incluíram a forma TT em sua amostra (LOCKWOOD et al., 2011).

À semelhança do que ocorreu com a marcação para CD68, a porcentagem média de células marcadas para CD14 foi maior na forma VV do que nas demais formas. É provável que este achado seja devido à predominância numérica dos macrófagos sobre os linfócitos nas lesões de forma VV, visto que o CD14 é marcador genérico de macrófagos e monócitos.

A diminuição da expressão de CD14, esperada para macrófagos alternativamente ativados ou de reparo tecidual (MOSSER, 2003) ou para monócitos não clássicos (“de patrulhamento”) (YANG et al., 2014), não pôde ser evidenciada nas formas DV ou forma VV. Nestas formas, há predominância da resposta imunológica tipo Th2, situação na qual é esperado que a secreção de IL-4 e IL-13 induza a diferenciação de macrófagos de reparo tecidual. Estes macrófagos são associados à síntese de matriz extracelular e angiogênese, fenômenos

biológicos exacerbados na forma VV (MAGALHAES et al., 2008). Além disso, sua atividade microbicida é baixa, o que guarda relação com a elevada carga parasitária das lesões de forma VV. No presente trabalho, a quantificação de células CD14<sup>+</sup> não permitiu identificar uma variação numérica desta subpopulação de macrófagos nas lesões cutâneas de pacientes com as diferentes formas de hanseníase.

A quantidade de células positivas para CD16 foi maior que a quantidade de células positivas para CD14 em todas as formas de hanseníase. Este aumento poderia refletir apenas diferenças técnicas relacionadas à sensibilidade dos anticorpos utilizados. Todavia, para a forma DV, especialmente, a quantificação de células CD16<sup>+</sup> apresentou um aumento de 140% vezes em relação à quantificação de células CD14<sup>+</sup>. É possível que a marcação para CD16 esteja, neste caso, apontando diferenças entre subpopulações de macrófagos. A expressão de CD16 é maior em monócitos dos subgrupos intermediário (“pró-inflamatório”) e não-clássico (“de patrulhamento”), que têm menor atividade microbicida que os monócitos do subgrupo clássico (CD16<sup>-</sup>). É possível que uma população mais numerosa de macrófagos CD16<sup>+</sup> presentes nas lesões da forma DV (e, por associação, também da forma VV) derivem de monócitos CD16<sup>+</sup> e tenham um comportamento biológico mais semelhante àquele esperado para os macrófagos alternativamente ativados (“de reparo tecidual”) ou regulatórios (“tipo 2”). De fato, a presença de uma resposta imunológica do tipo Th2, especialmente a presença de IL-10 e de imunocomplexos, está associada à diferenciação destes dois últimos tipos de macrófagos, de menor atividade microbicida e mais condizentes com as elevadas cargas parasitárias das formas DV e VV (MOSSER e EDWARDS, 2008).

## **6.5. QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO PARA CD163, L1, FERRO**

A quantidade de células marcadas para CD163 foi maior nas lesões de forma VV e DV, sobretudo nas primeiras, em consonância com os achados de Moura et al., que estudaram a marcação em seis casos de forma DT e seis casos de forma VV (MOURA et al., 2012), bem como os resultados de Bobosha et al., que estudaram a marcação para CD163 em dez casos de forma VV e quatro de forma DT. Os macrófagos de reparo tecidual (ou alternativamente ativados) expressam mais CD163 que os macrófagos classicamente ativados e este antígeno é considerado um de seus marcadores de superfície (MOSSER, 2003). A maior média de marcação celular para CD163 nos casos de forma VV e DV vai de encontro à predominância da resposta imunológica tipo Th2 destes casos, com aumento da secreção de IL-4 e IL-13 e

possível estímulo à diferenciação de macrófagos de reparo tecidual (MOSSER e EDWARDS, 2008). Este subtipo de macrófago é associado à síntese de matriz extracelular e angiogênese, exacerbada nas lesões da forma VV (MAGALHAES et al., 2008), e baixa atividade microbicida, o que guarda relação com o elevado índice baciloscópio dessas lesões.

Ainda não foi estabelecida uma definição consensual de marcadores específicos para cada uma das populações de macrófagos envolvida nas diferentes doenças e não se pode afirmar, apenas com base na marcação para CD163, que os macrófagos predominantes nas lesões de forma VV e DV sejam do fenótipo de reparo tecidual (alternativamente ativados). A menor atividade microbicida, inerente aos macrófagos das lesões de forma VV e DV também é observada em macrófagos regulatórios (ANDERSON e MOSSER, 2002). Ambos, macrófagos regulatórios e macrófagos de reparo tecidual, estão associados à maior suscetibilidade a patógenos intracelulares (HARRIS et al., 2007; MÜLLER et al., 2007; MOSSER e EDWARDS, 2008). Com base na revisão da literatura realizada, é plausível que as formas DV e VV, representativas de uma resposta imunológica do tipo Th2, marcada pela secreção de IL-10 e pela formação de imunocomplexos, também estejam associadas à diferenciação dos macrófagos de fenótipo regulatório.

Sem se comprometer com a eminente necessidade de se criar uma definição consensual dos marcadores específicos para as subpopulações de macrófagos envolvidas nas diferentes doenças, alguns autores optam por, simplesmente, denominá-los macrófagos tipo 2 (M2). Recentemente, Bobosha et al. consideraram que os macrófagos CD163<sup>+</sup> são macrófagos M2 e relacionaram seu encontro em lesões da forma VV com a presença de uma quantidade maior de linfócitos T<sub>regs</sub> nestas lesões (BOBOSHA et al., 2014). Os macrófagos M2 tem a capacidade de induzir a diferenciação de T<sub>regs</sub> “in vitro” (SAVAGE et al., 2008), bem como a IL-10, secretada por T<sub>regs</sub>, tem papel importante na indução de diferenciação de macrófagos M2 na hanseníase, com forte atividade fagocítica, porém baixo poder microbicida (MONTROYA et al., 2009).

Barros et al., que não incluíram material proveniente de pacientes com hanseníase em sua amostra, alertaram para o fato de a marcação para CD163, isoladamente, não indicar adequadamente os macrófagos M2. Os pesquisadores correlacionaram a expressão de CD163 com a de fatores de transcrição associados à diferenciação de macrófagos M1 (STAT1 – associado à transcrição de interferon) e M2 (CMAF – associado à transcrição de IL-10) em

biópsias de doenças com perfil inflamatório Th1 (mononucleose e doença de Crohn) e de perfil Th2 (oxiuríase, pólipos nasais alérgicos, tecidos em cicatrização e granulomas de corpo estranho). Demonstraram que, em todos os casos, havia mais macrófagos CD163<sup>+</sup> do que CD68<sup>+</sup>. Todavia, nas doenças com perfil Th1 os macrófagos CD163<sup>+</sup> co-expressavam STAT1, enquanto nas doenças de perfil Th2 os macrófagos CD163<sup>+</sup> co-expressavam CMAF, representando duas populações distintas em suas funções (BARROS et al., 2013).

Contrariando estes achados, nesta amostra, a porcentagem média de células CD68<sup>+</sup> foi maior que a de células CD163<sup>+</sup> em todas as formas de hanseníase. Além disso, o balanço entre células CD68<sup>+</sup> e CD163<sup>+</sup> nas formas TT e DT mostrou nítida tendência à predominância das primeiras. Nas formas DV e VV, este balanço foi mais equilibrado, evidenciando uma contribuição maior dos macrófagos CD163<sup>+</sup> na composição do infiltrado inflamatório do polo Th2 da doença. Barros et al. não incluíram em seu trabalho lesões de pele de pacientes com hanseníase e amostraram as doenças selecionadas, sobretudo, com fragmentos de tecido mucoso, o que poderia explicar esta discordância.

De qualquer maneira, a marcação para CD163 parece traduzir melhor a variação fenotípica dos macrófagos envolvidos com o processo inflamatório das diferentes formas de hanseníase do que as marcações para CD14, CD16, L1 e ferro. Neste sentido, é muito importante ressaltar o gradiente de marcação de células CD163<sup>+</sup>, nos granulomas das formas TT e DT, que foi descrito, pela primeira vez, neste trabalho. Este gradiente de distribuição das células mostra uma clara compartimentalização dos macrófagos dentro dos granulomas, semelhante ao consagrado gradiente observado na imunofenotipagem de linfócitos, em que as células CD4<sup>+</sup> ficam dispostas no centro dos granulomas e as células CD8<sup>+</sup> concentradas na periferia dos mesmos (MODLIN *et al.*, 1982).

A maior deposição de ferro nas lesões de forma VV acompanhou a maior expressão de CD163 pelos macrófagos dessas lesões, achado já relatado por outros pesquisadores (MOURA *et al.*, 2012). Todavia, porcentagem de área marcada para ferro nas lesões das diferentes formas de hanseníase foi pequena e não traduziu tão bem as variações do infiltrado inflamatório das lesões ao longo do espectro da doença como o fez a marcação para CD163.

Não foi possível discernir a presença de depósitos de ferro extracelulares nas lesões de forma VV. Gaetano et al. afirmaram que o macrófago M2 apresenta altos níveis de CD163, baixos

níveis de ferritina e altos níveis de ferroportina, que lhe proveem, respetivamente, alta capacidade de absorção de ferro, baixa capacidade de armazenamento e alta capacidade de secreção de ferro para os tecidos em regeneração (GAETANO et al., 2010). Neste sentido, os macrófagos CD163<sup>+</sup> das lesões de forma VV se comportariam menos como macrófagos de reparo tecidual que como macrófagos de fenótipo regulatório. Estes macrófagos não parecem liberar ferro para o tecido ao seu redor, mas, ao contrário, parecem retê-lo. Para Moura et al., esta seria uma alteração induzida pelo *M.leprae*, de forma a garantir-lhe o aporte do ferro necessário (MOURA et al., 2012). Além disso, como demonstraram Weiss et al., a indução da retenção de ferro intracelular pode resultar em significativa redução da atividade da INOS e do poder microbicida do macrófago (WEISS et al., 1994).

A marcação para L1 mostrou tendência de aumento em direção às formas de hanseníase do polo de perfil inflamatório Th2, em concordância com os achados de outros autores, que associaram aos macrófagos L1<sup>+</sup> menor atividade microbicida e maiores cargas parasitárias na infecção por *L.major* (STEINBRINK et al., 2000) e *M.leprae* (SUNDERKÖTTER et al., 2004). Entretanto, a porcentagem média de células marcadas para L1 foi significativamente menor que porcentagem média de células marcadas para CD163 e o padrão de marcação para L1 não permitiu diferenciar subpopulações de macrófagos componentes dos granulomas de células epitelioides, como foi possível demonstrar por meio do padrão de marcação para CD163.

A porcentagem de células L1<sup>+</sup> foi de 4,1% nas lesões da forma TT e de 12,1% nas da forma VV. Sunderkötter et al. obtiveram porcentagem média de marcação superior a esta (4,0% para a forma TT e 40% para a VV). Além disso, os pesquisadores relataram uma porcentagem de células L1<sup>+</sup> significativamente maior nas lesões de forma DT que nas lesões de forma TT, ressaltando que esta marcação imuno-histoquímica facilitaria a diferenciação histopatológica entre estas duas formas do espectro, o que não foi corroborado pelos resultados deste trabalho. Sunderkötter et al. utilizaram anticorpos específicos para as frações MRP-8 e MRP-9 da proteína L1 e não observaram diferenças entre os resultados dos dois clones. Estes anticorpos foram produzidos para aquela pesquisa e é possível que apresentem um comportamento diferente do clone comercial utilizado neste trabalho, específico para a fração MRP-9 da L1.

## **6.6. A MARCAÇÃO CD163, L1, FERRO EM ALGUNS CASOS DISCORDANTES**

Nos casos analisados em que houve discordância clínico-patológica na classificação de Ridley e Jopling, a coloração imuno-histoquímica não acrescentou informações novas à impressão inicial, tida ao exame anatomopatológico com as colorações pelos métodos HE e Wade. Sunderkötter et al. relataram que a marcação de células L1<sup>+</sup> acrescentaria ao exame anatomopatológico, no sentido de diferenciar casos de forma DT de casos de forma TT. Os resultados do presente trabalho não corroboram esta impressão, uma vez que a quantidade de células marcadas para L1 foi pequena em todas as formas de hanseníase. Do mesmo modo, exceto pela forma VV, a marcação para CD163 e a marcação para ferro não diferiram em intensidade suficiente para permitir a diferenciação das formas de hanseníase ao longo do espectro.

A marcação para CD163 nos granulomas das lesões de forma TT parece manter um gradiente centro-periferia mais bem definido que os granulomas da forma DT. Essa impressão, todavia, não parece acrescentar objetividade aos critérios de classificação histopatológicos de Ridley e Jopling. Mais importante, a porcentagem média de marcação de células CD163<sup>+</sup> foi semelhante nas formas DT e TT.

## **6.7. A IMUNOFENOTIPAGEM DA FORMA INDETERMINADA**

Apesar de, desde a década de 1980, os trabalhos terem focado a imunofenotipagem de linfócitos em lesões de pele de hanseníase, quase nenhuma atenção foi dada à forma IND. De certa forma, o objetivo dos pesquisadores era compreender o paradigma Th1xTh2 e, neste sentido, a imunofenotipagem do infiltrado inflamatório das lesões de forma IND não contribuiria. Nesta amostra, as lesões de forma IND apresentaram predomínio de células CD8<sup>+</sup> frente às células CD4<sup>+</sup> (78,2% x 55,6%), ou seja, um comportamento mais semelhante ao das formas DV e VV. Mais que isso, a forma IND apresentou uma relação CD4/CD8 mais semelhante à reportada para a forma VV (MODLIN et al., 1988).

Por outro lado, poucas células CD62L<sup>+</sup> foram vistas no infiltrado inflamatório das lesões de forma IND. Isto parece indicar que há uma predominância de células T CD4<sup>+</sup> de memória com fenótipo efetor (Th1) sobre células T CD4<sup>+</sup> de memória com fenótipo de vigilância ou recirculação (Th2) ou células T CD4<sup>+</sup> *naive*. Aparentemente, este resultado guarda relação com o conceito atual de que a forma IND, considerada uma forma inicial da doença, pode

apresentar cura espontânea em boa parte dos pacientes (JOB et al., 1997; ARAÚJO, 2003; AGRAWAL et al., 2005; WALKER e LOCKWOOD, 2007).

A predominância numérica de linfócitos sobre macrófagos no infiltrado linfohistiocitário das lesões de forma IND é expressa pela baixa porcentagem de marcação de células CD68<sup>+</sup> e é compatível com a escassa literatura (LOCKWOOD et al., 2011). A positividade para células CD14<sup>+</sup> ou CD16<sup>+</sup>, comparada à positividade para células CD68<sup>+</sup>, foi muito menor nas lesões de forma IND que nas outras formas.

Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a presença de células CD163<sup>+</sup> e L1<sup>+</sup> nas lesões da forma IND. Houve positividade para estas células, porém tão baixa quanto a positividade da marcação para CD68. Todavia, vale ressaltar que dois dos casos de forma IND tinham duas e três lesões, enquanto os demais cinco casos apresentavam apenas uma lesão cada. Nos casos com duas e três lesões foram marcadas para CD163 14,1% das células e 30% das células, respectivamente. Nos demais casos, com apenas uma lesão, foram marcadas para CD163 entre 2,9% e 8,3% das células do infiltrado. Apesar do número limitado de casos, aparentemente, o número de células CD163<sup>+</sup> parece aumentar à medida que aumenta o número de lesões de pele da forma IND. É possível que o aumento do número de células CD163<sup>+</sup> esteja associado à disseminação da doença a partir da forma IND.

## **6.8. A IMUNOFENOTIPAGEM DO GRUPO DT-MACULAR**

Os pacientes que se apresentam com múltiplas lesões hipopigmentadas, cujas biópsias mostram características de forma IND, e não o granuloma típico da forma DT, são, mesmo assim, classificados com forma DT.

A imunofenotipagem de macrófagos evidencia diferenças entre o infiltrado das lesões deste grupo DT-macular e das lesões de forma IND. Suas lesões expressam mais células CD68<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>, aos moldes do que ocorre na forma DT, e isso pode sugerir uma maior importância de macrófagos classicamente ativados nestas lesões.

Por outro lado, as lesões do grupo DT-macular expressam relação CD4/CD8 e marcação para CD16 mais condizentes com as lesões da forma IND. Com as marcações realizadas nesta amostra, não é possível afirmar se os linfócitos CD8<sup>+</sup> desses dois grupos são citotóxicos ou

supressores. Nas lesões das formas DT/TT, a maioria dos LT CD8<sup>+</sup> são citotóxicos, enquanto nas lesões das formas DV/VV a maioria dos LT CD8<sup>+</sup> são supressores (MODLIN et al., 1988). Classificar adequadamente os pacientes do grupo DT-macular tem importantes implicações sobre o prognóstico dos pacientes, como a chance de recidiva da doença após o tratamento ou a chance de surtos reacionais. Neste sentido, vale ressaltar que a marcação para CD163 e L1 não diferencia as lesões do grupo DT macular das lesões de forma IND ou DT.



## 7. CONCLUSÕES

### 7.1. SOBRE A COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES

A classificação operacional da OMS, quando comparada à classificação utilizada no serviço de referência, que leva em conta a classificação de Ridley e Jopling, além de considerar multibacilares os pacientes com baciloscopia dérmica positiva, superestimou o número de pacientes multibacilares e resultou em um número expressivo de “falsos-paucibacilares”.

A classificação conforme o número de segmentos corporais afetados, que classifica como multibacilar o paciente com três ou mais segmentos corporais afetados, apresentou melhor concordância com a classificação utilizada no serviço de referência do que a classificação operacional da OMS.

### 7.2. SOBRE A CONCORDÂNCIA ENTRE OS COMPONENTES CLÍNICO E ANATOMOPATOLÓGICO DA CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING

A concordância plena entre os componentes clínico e anatomopatológico da classificação de Ridley e Jopling foi apenas moderada:

- 1- Há importante discordância entre os diagnósticos das formas TT e DT e a linha que divide estas formas ao exame anatomopatológico parece incerta.
- 2- Os pacientes com lesões maculares múltiplas devem ser classificados conforme a impressão clínica, pois seu exame anatomopatológico não traduz a exuberância de sua manifestação clínica.
- 3- Os critérios histopatológicos definidores da classificação dimorfa-dimorfa na chave de classificação anatomopatológica de Ridley parecem insuficientes para o diagnóstico dessa forma, pois, da maneira como são interpretados atualmente, tendem a induzir a classificação para as formas dimorfa-tuberculoide ou dimorfa-virchowiana.

4- Os critérios histopatológicos da chave de classificação de Ridley são vagos ao diferenciar as formas virchowiana e dimorfa-virchowiana com base na caracterização de um infiltrado com uma quantidade “numerosa” ou “moderada” de linfócitos.

### **7.3. SOBRE A IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS**

Na imunofenotipagem de linfócitos, a relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi mais condizente com o clássico paradigma Th1xTh2 que cada uma das marcações isoladamente.

### **7.4. SOBRE A IMUNOFENOTIPAGEM DE MACRÓFAGOS**

Os macrófagos CD62L<sup>+</sup> compuseram a maioria dos macrófagos das lesões de pele de hanseníase dos pacientes deste trabalho, independente da forma da doença. A marcação para CD62L não diferenciou subpopulações de macrófagos.

As lesões de pele dos pacientes do grupo DT-macular apresentaram maior marcação para CD68 e CD14 que as lesões de pele de pacientes com a forma indeterminada. Todavia, as marcações para CD14 e CD16, especialmente a primeira, não apresentaram variação condizente com o clássico paradigma Th1xTh2 das lesões de pele das diferentes formas de hanseníase e não diferenciaram adequadamente subpopulações de macrófagos no infiltrado inflamatório destas lesões.

A marcação para CD163 representou melhor a variação fenotípica dos macrófagos envolvidos com o processo inflamatório das diferentes formas de hanseníase do que as marcações para CD14, CD16, L1 e ferro.

A porcentagem média de células CD163<sup>+</sup>, nas lesões de forma indeterminada, aumentou à medida que aumentou o número de lesões de pele destes pacientes.

Apesar disso, a marcação de células CD163<sup>+</sup> não apresenta uma variação pormenorizada o suficiente para permitir a diferenciação das formas de hanseníase ao longo do espectro. Nos granulomas epitelioides, a marcação para CD163 apresenta uma distribuição centro-periferia bem definida, mas a observação desse critério não acrescentou objetividade aos critérios de classificação histopatológica de Ridley e Jopling.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787-93, out. 1996.

AGRAWAL, A. et al. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 107, n. 6, p. 445-54, out. 2005.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 1, p. 101-6, jul. 2002.

ARAÚJO, M. Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-82, maio 2003.

ASLEH, R.; LEVY, A. P. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. **Vascular Health and Risk Management**, v. 1, n. 1, p. 19-28, [2005].

ASLEH, R. et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 92, n. 11, p. 1193-200, jun. 2003.

BABA, T. et al. CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 2004-12, mar. 2006.

BARROS, M. H. et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80908, [2013].

BARTHE, C. et al. Identification of 'cystic fibrosis protein' as a complex of two calcium-binding proteins present in human cells of myeloid origin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1096, n. 2, p. 175-7, fev. 1991.

BARTON, R.W.; PRENDERGAST J.; KENNEDY C.A. Binding of the T cell activation monoclonal antibody Ta1 to dipeptidylpeptidase IV. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 48, n. 4, p. 291-6, [1990].

BHATIA, A. S. et al. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 61, n. 3, p. 433-438, [1993].

BIRD, T. J. et al. Role of macrophages in defective cell-mediated-immunity in lepromatous leprosy .2. macrophage and lymphocyte interaction. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 48, n. 2, p. 178-182, [1980].

BOBOSHA, K. et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2773, abr. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico: Campanha nacional de hanseníase, verminoses, tracoma e esquistossomose 2015**. Brasília 2015. Disponível em: <<http://ses.sp.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=5639>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. Portaria n. 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 out. 2010. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=55&data=15/10/2010>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

CAVALCANTI, A. A. et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 616-9, out. 2012.

CRAWFORD, C. L.; HARDWICKE, P. M. D. Experimental leprosy: a model of epithelioid cell granuloma. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 3, p. 255-261, mar. 2011.

CREE, I. A. et al. Reproducibility of histology in leprosy lesions. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 56, n. 2, p. 296-301, [1988].

DA COSTA, D. A. et al. Wade histoid leprosy: histological and immunohistochemical analysis. **Leprosy Review**, v. 84, n. 3, p. 176-85, set. 2013.

DEWEESE, N. E. et al. Characterization of suppressor inducer (cd4+ 2h4+) t-lymphocytes in leprosy granulomas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 88, n. 4, p. 484-484, abr. 1987.

ESASHI, E. et al. Development of CD4+ macrophages from intrathymic T cell progenitors is induced by thymic epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4360-7, out. 2004.

FABRIEK, B. O. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 887-92, jan. 2009.

FERNÁNDEZ, J. M. M. Sixth International Congress of Leprosy. **American Medical Association Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 69, n. 5, p. 4, [1954].

FINE, P. E. M. et al. Extent, origin, and implications of observer variation in the histopathological diagnosis of suspected leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 61, n. 2, p. 270-282, [1993].

GAETANO, C.; MASSIMO, L.; ALBERTO, M. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. **Haematologica**, v. 95, n. 11, p. 1801-3, nov. 2010.

GAJL-PECZALSKA, K.J., et al. B-lymphocytes in lepromatous leprosy. **New England Journal of Medicine**, v. 288, n. 20, p. 1033-1035, [1973].

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269-290, [2008].

GUPTA, R.; KAR, H. K.; BHARADWAJ, M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy--a clinic-pathological study. **Leprosy Review**, v. 83, n. 4, p. 354-62, dez. 2012.

GUPTA, S. K.; BHUTANI, L. K.; NATH, I. The insitu characteristics of mononuclear cell infiltrates in dermal lesions of leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 50, n. 3, p. 297-305, [1982].

HAMMER, H. B. et al. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 13, n. 1, p. 59-64, 1995 jan. 1995.

HARRIS, J. et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 505-17, set. 2007.

HENGEL, R. L. et al. Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 28-32, jan. 2003.

IYER, A. M. et al. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. **Human Pathology**, v. 38, n. 7, p. 1065-1073, jul. 2007.

JOB, C. K. et al. Histopathologic evidence to show that indeterminate leprosy may be a primary lesion of the disease. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 65, n. 4, p. 443-9, dez. 1997.

KANEGANE, H. et al. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1- and Th2-like cytokine-producing memory CD4+ T cells. **Immunology**, v. 87, n. 2, p. 186-90, fev. 1996.

KAUR, S. et al. Concurrent skin and nerve histology in leprosy and its role in the classification of leprosy. **Leprosy Review**, v. 64, n. 2, p. 110-116, [1993].

LOCKWOOD, D. N. et al. Comparing the clinical and histological diagnosis of leprosy and leprosy reactions in the INFIR cohort of Indian patients with multibacillary leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1702, [2012].

\_\_\_\_\_. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e1327, dez. 2011.

LOCKWOOD, D. N. J.; SARNO, E.; SMITH, W. C. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution? **Leprosy Review**, v. 78, n. 4, p. 317-320, [2007].

MAGALHAES, G. D. O. et al. A quantitative and morphometric study of tryptase-positive mast cells in cutaneous leprosy lesions. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 62-66, jan. 2008.

MANADHAR, U.; ADHIKARI, R.C.; SAYAMI, G. Clinico-histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. **Journal of Pathology of Nepal**, 3: 452-458 p. [2013].

MASSONE, C. et al. Immunophenotype of skin lymphocytic infiltrate in patients co-infected with *Mycobacterium leprae* and human immunodeficiency virus: a scenario dependent on CD8+ and/or CD20+ cells. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 2, p. 321-328, ago. 2011.

MATHUR, M. C. et al. Clinicohistopathological correlation in leprosy. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 9, n. 36, p. 248-51, 2011 out. 2011.

MATSUZAKI, S. et al. Polarization of Th1/Th2 in human CD4 T cells separated by CD62L: analysis by transcription factors. **Allergy**, v. 60, n. 6, p. 780-7, jun. 2005.

MCCLEAN, K. et al. Phenotype and cytokine expression of intralesional cells in borderline leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 62, n. 3, p. 380-388, set. 1994.

MENDES, N. F.; KOPERSZT.S; MOTA, N. G. S. T-lymphocytes and b-lymphocytes in patients with lepromatous leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 16, n. 1, p. 23-29, [1974].

MENDONCA, V. A. et al. Analysis of chemokine receptors on the surface of circulating leukocytes of individuals infected with *Mycobacterium leprae*: preliminary results. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 41, p. 95-98, [2008].

MEYERS, W. M. et al. Ridley-jopling 5-group classification of leprosy - correlations of parameters of the classification in 1,429 leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 47, n. 4, p. 683-684, [1979].

MODLIN, R. L. et al. In situ characterization of lymphocyte-t subsets in leprosy granulomas. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 50, n. 3, p. 361-362, [1982].

\_\_\_\_\_. Lymphocyte-t subsets in the skin-lesions of patients with leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 182-189, [1983a].

\_\_\_\_\_. In situ demonstration of lymphocyte-t subsets in granulomatous inflammation - leprosy, rhinoscleroma and sarcoidosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 51, n. 3, p. 430-438, [1983b].

\_\_\_\_\_. Learning from lesions - patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 4, p. 1213-1217, fev. 1988.

\_\_\_\_\_. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma-delta t-cell receptors accumulate in human infectious-disease lesions. **Nature**, v. 339, n. 6225, p. 544-548, jun. 1989.

\_\_\_\_\_. Th1-Th2 paradigm: insights fom leprosy. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 829-832, [1994].

MONTOYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-53, out. 2009.

MOORTHY, B. N. et al. Histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 67, n. 6, p. 299-301, nov. 2001.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 417-426, [2004].

MOSMANN, T.R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2349-57, abr. 1986.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209-12, fev. 2003.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology** v. 8, n. 12, p. 958-69, dez. 2008.

MOURA, D. F. et al. CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 11, p. 2925-36, nov. 2012.

MÜLLER, U. et al. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5367-77, out. 2007.

NARAYANAN, R. B. et al. In vitro studies on dermal granulomas of human leprosy - characterization of cells using monoclonal-antibodies. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 54, n. 2, p. 268-272, jun. 1986.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, n. 3, p. 275-83, mar. 1998.

PARDILLO, F. E. et al. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 8, p. 1096-9, abr. 2007.

PARENTE, J. N. et al. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 90, n. 1, p. 41-47, jan. 2015.

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLERHEITBROCK, H. W. L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral-blood. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2527-2534, nov. 1989.

POULIOT, P. et al. Myeloid-related proteins rapidly modulate macrophage nitric oxide production during innate immune response. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 5, p. 3595-601, set. 2008.

PURUSHOTHAMAN, K. R. et al. Increased expression of oxidation-specific epitopes and apoptosis are associated with haptoglobin genotype: possible implications for plaque progression in human atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 2, p. 112-9, jul. 2012.

QUARESMA, J. A. et al. Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 4, p. 135-40, out. 2010.

REA, T. H. et al. lymphocyte-t subsets in blood and tissues of patients with lepromatous leprosy and erythema-nodosum leprosum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 327-327, [1983].

RIDLEY, D. S. histological classification and immunological spectrum of leprosy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 5, p. 451-465, [1974].

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, jul. 1966.



RIDLEY, M. J.; RIDLEY, D. S.; TURK, J. L. Surface markers on lymphocytes and cells of mononuclear phagocyte series in skin sections in leprosy. **Journal of Pathology**, v. 125, n. 2, p. 91-98, [1978].

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF-beta Secreting CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, jan. 2014.

SALES, J. S. et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 165, n. 2, p. 251-63, ago. 2011.

SANTOS, V. S. et al. Evaluation of agreement between clinical and histopathological data for classifying leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e189-92, mar. 2013.

SARITA, S. et al. A study on histological features of lepra reactions in patients attending the Dermatology Department of the Government Medical College, Calicut, Kerala, India. **Leprosy Review**, v. 84, n. 1, p. 51-64, mar. 2013.

SATO, K. et al. Autocrine activation-induced cell death of T cells by human peripheral blood monocyte-derived CD4+ dendritic cells. **Cellular Immunology**, v. 199, n. 2, p. 115-25, fev. 2000.

SAVAGE, N. D. et al. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2220-6, ago. 2008.

SCHNARE, M. et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 947-50, out. 2001.

SEDER, R. A. et al. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 21, p. 10188-92, nov. 1993.

SEHGAL, V. N. et al. Application of clinical and histopathological classification of leprosy. **Dermatologica**, v. 161, n. 2, p. 93-96, [1980].

SEHGAL, V. N.; REGE, V. L.; REYS, M. Correlation between clinical and histopathologic classification in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 45, n. 3, p. 278-280, [1977].

SHARMA A.; SHARMA R.K.; GOSWAMI K.C.; BARDWAJ S. Clinico-histopathological correlation in leprosy. **Jk Science**, 10: p. 120-123, [2008].

SHEN, J. Y. et al. In situ identification of activated ta1+ lymphocytes-t in human leprosy skin-lesions. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 55, n. 3, p. 494-498, set. 1987.

SIELING, P. A. et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: Correlation with effective host immunity. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 3, p. 1851-1858, Feb 1 1999.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. T-cell and cytokine patterns in leprosy skin-lesions. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 13, n. 3-4, p. 413-426, 1992.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 287-92, jul. 1992.

STEINBRINK, K. et al. Ineffective elimination of *Leishmania major* by inflammatory (MRP14-positive) subtype of monocytic cells. **Immunobiology**, v. 202, n. 5, p. 442-59, nov. 2000.

SUNDERKÖTTER, C. H. et al. High expression of myeloid-related proteins 8 and 14 characterizes an inflammatorily active but ineffective response of macrophages during leprosy. **Immunology**, v. 111, n. 4, p. 472-80, abr. 2004.

TIBBLE, J. et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 506-13, out. 2000.

VANBRAKEL, W. H.; DESOLDENHOFF, R.; MCDUGALL, A. C. The allocation of leprosy patients into paucibacillary and multibacillary groups for multidrug therapy, taking into account the number of body areas affected by skin, or skin and nerve lesions. **Leprosy Review**, v. 63, n. 3, p. 231-246, [1992].

VOGL, T. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1042-9, set. 2007.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 165-172, mar. 2007.

WEISS, G. et al. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 3, p. 969-76, set. 1994.

World Health Organization. **Multidrug therapy against leprosy - Development and implementation over the past 25 years**, Geneva: WHO Document Production Services, 2004. Disponível em: <[http://www.who.int/lep/resources/MDT\\_Full.pdf](http://www.who.int/lep/resources/MDT_Full.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. WHO Expert Committee on Leprosy: eighth report. **World Health Organization technical report series**, Genebra, n. 968, p. 1-61, [2012]. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/entity/global\\_leprosy\\_programme/publications/8th\\_expert\\_comm\\_2012.pdf](http://www.searo.who.int/entity/global_leprosy_programme/publications/8th_expert_comm_2012.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, n. 36 (89), p. 389-400, set. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2014/wer8936.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. WHO Expert Committee on Leprosy: seventh report.. **World Health Organization technical report series**, Genebra, v. 874, p. 1-43, [1998]. Disponível em: <[http://www.who.int/lep/resources/Expert\\_contents.pdf](http://www.who.int/lep/resources/Expert_contents.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2016.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1, [2014].

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, out. 2010.

## 9. ANEXOS

- 1- Artigo publicado.
- 2- Artigo submetido. Aguarda-se a resposta após as modificações sugeridas pelo revisor.
- 3- Aprovação COEP-UFMG.
- 4- Folha de Aprovação.

## 9.1. ARTIGO PUBLICADO

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## Degree of Skin Denervation and Its Correlation to Objective Thermal Sensory Test in Leprosy Patients

Ismael Alves Rodrigues Júnior<sup>1</sup>, Isabel Cristina Costa Silva<sup>1</sup>, Leticia Trivellato Gresta<sup>1</sup>, Sandra Lyon<sup>2</sup>, Manoel de Figueiredo Villarroel<sup>3</sup>, Rosa Maria Esteves Arantes<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Departamento de Dermatologia, Hospital Eduardo de Meneses, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Núcleo de Estudos e Pesquisa em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

### Abstract

**Background:** Leprosy is an infectious disease affecting skin and peripheral nerves resulting in increased morbidity and physical deformities. Early diagnosis provides opportune treatment and reduces its complications, relying fundamentally on the demonstration of impaired sensation in suggestive cutaneous lesions. The loss of tactile sensitivity in the lesions is preceded by the loss of thermal sensitivity, stressing the importance of the thermal test in the suspicious lesions approach. The gold-standard method for the assessment of thermal sensitivity is the quantitative sensory test (QST). Morphological study may be an alternative approach to access the thin nerve fibers responsible for thermal sensitivity transduction. The few studies reported in leprosy patients pointed out a rarefaction of thin dermo-epidermal fibers in lesions, but used semi-quantitative evaluation methods.

**Methodology/Principal Findings:** This work aimed to study the correlation between the degree of thermal sensitivity impairment measured by QST and the degree of denervation in leprosy skin lesions, evaluated by immunohistochemistry anti-PGP 9.5 and morphometry. Twenty-two patients were included. There were significant differences in skin thermal thresholds among lesions and contralateral skin (cold, warm, cold induced pain and heat induced pain). The mean reduction in the density of intraepidermal and subepidermal fibers in lesions was 79.5% (SD = 19.6) and 80.8% (SD = 24.9), respectively.

**Conclusions/Significance:** We observed a good correlation between intraepidermal and subepidermal fibers deficit, but no correlation between these variables and those accounting for the degree of impairment in thermal thresholds, since the thin fibers rarefaction was homogeneously intense in all patients, regardless of the degree of sensory deficit. We believe that the homogeneously intense denervation in leprosy lesions should be objective of further investigations focused on its diagnostic applicability, particularly in selected cases with only discrete sensory impairment, patients unable to perform the sensory test and especially those with nonspecific histopathological finds.

**Citation:** Rodrigues Júnior IA, Silva ICC, Gresta LT, Lyon S, Villarroel Mdf, et al. (2012) Degree of Skin Denervation and Its Correlation to Objective Thermal Sensory Test in Leprosy Patients. *PLOS Negl Trop Dis* 6(12): e1975. doi:10.1371/journal.pntd.0001975

**Editor:** Joseph M. Vinetz, University of California San Diego School of Medicine, United States of America

**Received:** August 12, 2012; **Accepted:** November 4, 2012; **Published:** December 13, 2012

**Copyright:** © 2012 Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa Tecnológica e Científica (CNPQ 571093/2008-4, CNPq 473013/2012-6, CAPES (2248/11) and FAPEMIG (PPM 2012). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: rosa@icb.ufmg.br

### Introduction

Leprosy is an infectious disease affecting skin and peripheral nerves [1,2,3,4]. The neural impairment results in increased morbidity and, sometimes, disabling permanent physical deformities. Prompt diagnosis during the incipient stages is important to avoid these complications. The World Health Organization and the Brazilian Ministry of Health guidelines propose leprosy diagnosis based on the detection of skin lesions with impaired sensation, thickened peripheral nerves or a positive skin smear [5,6,7].

In the initial phase, the presence of hypochromic macule occurs without neural thickening and with a negative dermal smear, making the sensitivity test of a suspicious lesion an important criterion to establish the early diagnosis. The tactile sensitivity test with Semmes-Weinstein monofilaments is the most common and

applicable test among the available sensitivity tests for outpatient setting [8].

In leprosy lesions, loss of tactile sensitivity is preceded by loss of thermal sensitivity, since tactile sensitivity, mediated by thick myelinated A-beta type nerve fibers, can be preserved, even if the loss of thermal sensitivity, mediated by thin myelinated A-delta type fibers and thin unmyelinated C type fibers, has already occurred [9,10]. Thus, the assessment of thermal sensitivity is of fundamental importance to establish an early diagnosis.

The use of test tubes with hot and cold water is hampered in ambulatory practice since it is time consuming and the water temperature control may be difficult to standardize [11]. The quantitative sensory test (QST) performed by electronic equipment is considered the gold standard method to assess thermal sensitivity [12,13,14,15,16], despite its large size, high cost and need for an experienced professional.

### Author Summary

Our study has addressed objectively the rarefaction of cutaneous thin nerve fibers density and its correlation with quantitative thermal sensory test in leprosy patients. Thermal sensitivity evaluation is crucial to the early diagnosis of leprosy, since it is the first type of cutaneous sensitivity lost in the lesions. However, some patients are unable to perform thermal tests, like children and patients with cognitive impairment. The pathological study of those lesions is also fundamental and it is the gold standard method to diagnose and classify leprosy patients. However, it may also be unspecific, especially in the indeterminate form of leprosy. Our findings show that even in lesions with slight thermal sensitivity impairment, there is a homogeneously intense denervation, specifically in the superficial skin layers. We believe that our findings pave the way to future studies focused on the diagnostic applicability of the cutaneous thin nerve fibers density quantification in leprosy suspected lesions.

Morphological study of skin biopsy is an alternative to assess thin nerve fibers structure and densities related to the thermal sensitivity function [17]. The protein gene product (PGP 9.5) is a neuronal pan-axonal marker widely used for intraepidermal and dermal nerve endings analysis and quantification. Current guidelines recommend skin biopsy rather than peripheral nerve biopsy in the diagnosis of thin fiber neuropathies [18] since the methods to evaluate peripheral nerve conduction, which assess thick nerve fibers, may fail to detect nerve impairment [19].

In leprosy patients a few morphological studies showed a decrease of thin cutaneous nerve fibers density associated to the worsening of heat and cold detection thresholds. However, such studies have used non-systematic semi-quantitative methods to evaluate the nerve density and the thermal thresholds, and did not exclude treated patients [20,21,22,23,24].

### Methods

#### Objectives

This work aimed to study the correlation between the degree of thermal sensitivity impairment, measured by QST, and the degree of denervation in leprosy skin lesions, evaluated by immunohistochemistry anti-PGP 9.5 and morphometry.

#### Leprosy diagnosis

According to the Brazilian guidelines (27), written in the form of ordinances, a case of leprosy is defined if a patient fulfills one of the criteria: skin lesion with decreased sensitivity, positive skin smear or enlarged peripheral nerve. Although the diagnosis can be based on only one of these criteria, only patients who had skin lesions could be included in our work. In our reference center, at the Eduardo de Menezes Hospital of the Minas Gerais State Hospital Foundation, the tactile sensitivity test of suspicious lesions is performed with dry cotton wool and, for research purposes, monofilaments. The thermal sensitivity test is performed with hot and cold water tubes and, for research purposes, sensory thermo-analyzer. The histamine test is performed in suspicious lesions that showed no significant sensitivity impairment. Skin smears are routinely performed on all suspected or confirmed cases. The pathological examination of the lesions is routinely performed for diagnostic investigation in suspected cases and research purposes in previously confirmed cases. Clinical examination of peripheral nerves is done routinely in suspected and confirmed cases.

#### Participants

Leprosy patients with at least one skin lesion with a minimum diameter of three centimeters to offer an adequate docking area for the thermal stimulator were included if they had been in treatment for maximum of 30 days. Patients were excluded if lesions were located in body regions impaired by leprosy peripheral neuropathy, clinically evaluated by peripheral nerves palpation, tactile sensitivity test of the palms and soles, evaluation of muscular trophic and palms and soles hydration. We also excluded patients with other diseases known to cause peripheral neuropathy, such as alcoholism, diabetes, HIV infection, thyroidopathy, metabolic disturbances or systemic vasculitis as well as patients with limited cognitive ability, unable to respond adequately to QST, or whose scars from previous biopsies compromised the skin areas to be studied.

#### Description of procedures or investigations undertaken

**Tactile test and thermal quantitative sensory test.** The tactile sensitivity of the lesions was assessed by Semmes-Weinstein monofilaments, a set of nylon rods, with gradually thicker gauges, that pressed on the skin, exert different pressures. The force exerted by the monofilament: green = 0,05 g; blue = 0,2 g; lilac = 2,0 g; dark red = 4,0 g; orange = 10,0 g.

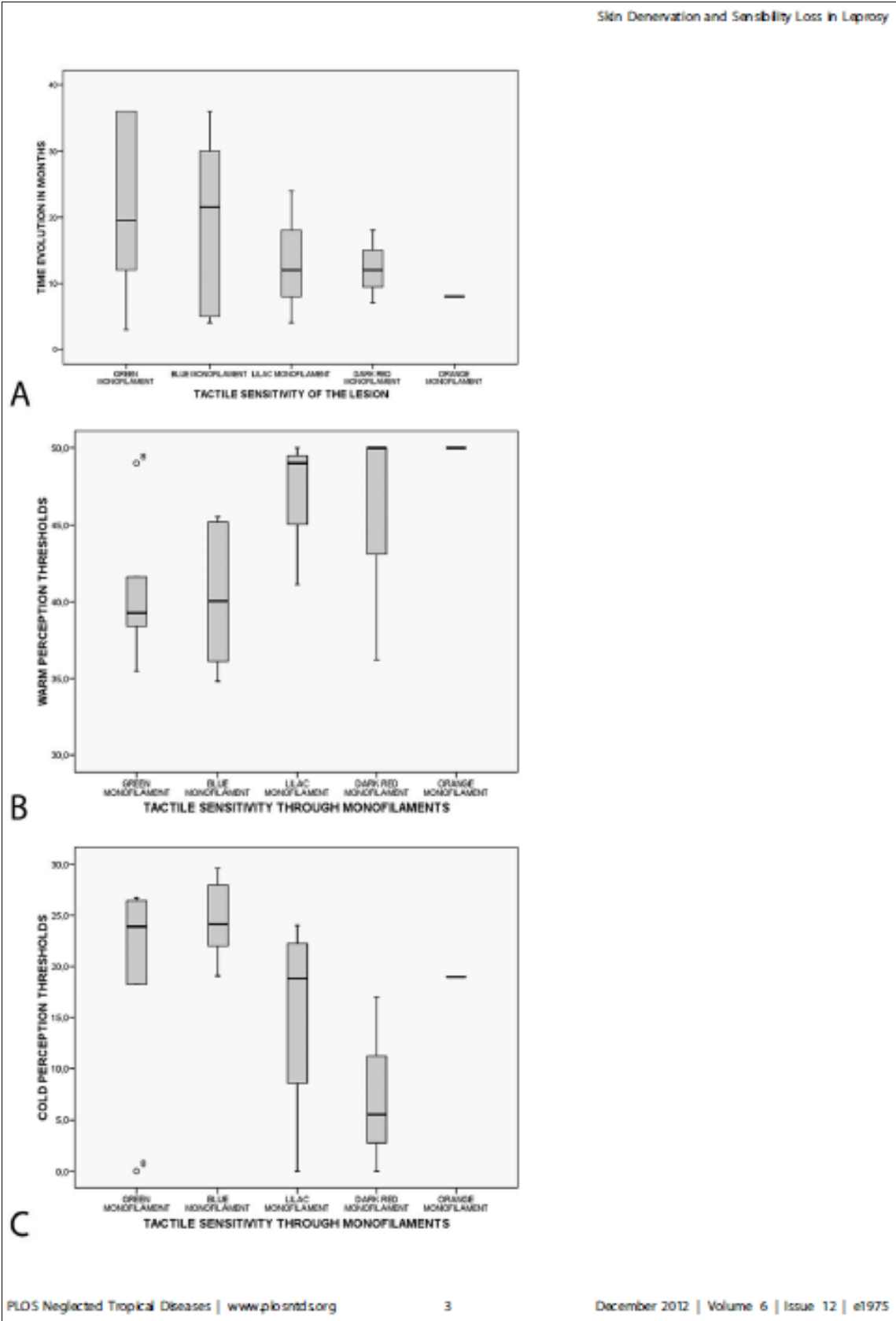
The QST was performed in a quiet environment using the Thermal Sensory Analyzer TSA-II (Medoc, Ramat Yishai, Israel) programmed with a 32°C basal temperature stimulator, a linear variation of 1°C per second, a maximum temperature of 50°C for heat and 0°C for cold, a return to baseline at 0.8°C per second, a programmed interstimulus interval of four to 6 seconds and a thermal stimulator area of 3.0 × 3.0 cm<sup>2</sup>.

Lesions were tested immediately after contralateral skin for each of the four thresholds determined. The cold (CPT) and warm (WPT) perception thresholds were determined by the method of levels. Then, the cold-induced (CPPT) and heat-induced (HPPT) pain perception thresholds were determined by the method of limits.

An automatic safety restriction of the equipment limited the temperature variation to which patients were exposed to the range of 0°C to 50°C. When the patient did not perceive cold at 0°C or heat at 50°C, these borderline values were recorded, allowing for statistical analysis.

**Skin biopsy.** The comparative thin nerve fibers density in the corresponding contralateral free of lesions skin was essential to study the fibers density in leprosy lesions. The lesions denervation was calculated in relation to the contralateral skin innervation. After determining the thermal thresholds of the affected and contralateral skin, all patients underwent biopsy of the two sites by means of a five-millimeter diameter punch.

**Processing of skin fragments.** The samples were fixed in 10% formalin solution, paraffin-blocked and 10-µm thick sequential sections were obtained. After deparaffinized and rehydrated the sections stained with hematoxylin and eosin (HE) and WADE were classified according to Ridley and Jopling leprosy classification [25]. For immunohistochemical procedures endogenous peroxidase activity and nonspecific binding were blocked, followed by incubation in goat serum diluted at 1:20 in 0.01 M PBS with 0.2% serum albumin and 0.001% Triton X. After blocking, the sections were incubated overnight with anti-PGP 9.5 rabbit polyclonal antibodies (Ultraclone Ltd, England) at a concentration of 1:400 in antibody diluting solution (Dako, USA) in a moist chamber at 4°C. The slides were washed in PBS and sequentially treated with pre-diluted biotinylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin (Dako LSAB<sup>®</sup> Kit, USA) for 30 minutes and with pre-diluted streptavidin-peroxidase conjugate (Dako LSAB<sup>®</sup> Kit,



**Figure 1. Sensitivity in leprosy lesions.** (A) Patients with preserved or just slightly impaired tactile sensitivity in their lesions tended to present a longer evolution time until diagnosis,  $p = 0.759$  (Kruskal-Wallis test). (B) Distribution of warm and (C) cold perception thresholds in lesions stratified according to the results of the tactile sensitivity test. There was a trend towards an association between worsening WPT (A) and CPT (B) and the degree of tactile sensitivity loss.  
doi:10.1371/journal.pntd.0001975.g001

USA) for an additional 30 minutes interval. The reaction was revealed in a solution of diaminobenzidine (DAB, Sigma, USA) and 30 volumes hydrogen peroxide in PBS. The sections counterstained with Harris hematoxylin were coverslip-mounted with Entellan (Merck, Germany).

**Morphometry.** Two measurements were determined by morphometry: (1) the count of intraepidermal nerve fibers per millimeter of epidermis; and (2) the ratio between the area of subepidermal nerve fibers marked and the total area of the papillary dermis examined. The images were obtained using an Olympus BX51 optical microscope (Olympus, Japan) and captured by the video color camera Cool SNAP-Probcf (Media Cybernetics, USA) coupled to a computer using the Image-Pro Express 4.0 software (Media Cybernetics, United States). KS300 program (Carl Zeiss Micro Imaging, Germany) was used for analysis of the scanned images.

The intraepidermal nerve fibers were counted by a full scan of both sections of each slide using an objective magnification of 40 $\times$ . We considered only fibers above the basal cell layer to minimize the erroneous counting of unwanted structures. Panoramic images of each slice, obtained with a 4 $\times$  objective, were captured to measure the length of the epidermis. Using the KS 300 program, a line was drawn to delineate the full extent of the lower limit of the basal layer providing the epidermis length automatically.

To count the subepidermal fibers stained brown by immunohistochemistry, screening of all papillary dermis in both sections of the slides was performed using an objective magnification of 20 $\times$ . The marking of unwanted structures such as cutaneous annexes and inflammatory infiltrate prevented the automated counting of nerve fibers in deeper regions of the papillary and reticular dermis in lesions, limiting the nerve fibers quantification to a depth limit of 50  $\mu$ m from the extremity of the most superficial dermal papillae, both in lesions and contralateral skin. So, in each image, a blueprint was designed to exclude the epidermis and the dermis located deeper than this boundary line. Through the image analysis program, the area corresponding to the structures stained in brown and the total dermal area delineated in the blueprint were automatically obtained in  $\mu$ m<sup>2</sup> for each field scanned.

#### Ethics

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais and all participants gave their written informed consent.

#### Statistical methods

The Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 (SPSS, USA) was used in the descriptive analysis measures of central tendency (mean and median), variability (the standard deviation and coefficient of variation) and percentages.

For comparative analysis between the paired groups "lesions" and "contralateral skin", nonparametric continuous variables were studied with Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test and Spearman correlation coefficient.

Taking as reference the work of Cohen [26], the sample size of twenty-two patients was sufficient to study the correlation aiming a power of 0.8 and accepting as parameters a significance of 0.1 and an effect size of 0.5.

#### Results

Between January and December 2009 twenty two new leprosy cases were included in the study. All patients had lesions with thermal hypoesthesia and/or tactile deficit. At least 19 patients showed typical histology of the disease. Three patients had only mild perineural, perivascular and perianaxial lymphocytic infiltrate. These three had hypochromic macules with indubitable thermal and/or tactile hypoesthesia. All patients showed improvement of skin lesions after treatment initiation.

Eleven patients were men. The mean age was 42 years (ranging between 10 and 73 years). Ten patients (45.5%) presented with six or more lesions and four (18.2%) had more than one clinically impaired peripheral nerve. According to the WHO operational classification ten patients (45.5%) were considered multibacillary. Under the Ridley-Jopling classification four patients (18.2%) were considered to have the indeterminate form of leprosy, two (9.1%) had the tuberculoid form, five (22.7%) had the borderline tuberculoid form, nine (40.9%) had the borderline lepromatous form and two (9.1%) had the lepromatous form.

Tactile sensitivity was preserved to the 0.05 g, 0.2 g, 2.0 g, 4.0 g and 10.0 g monofilament in 30%, 30%, 20%, 15% and 5% of the lesions, respectively. The lesions with preserved or mostly preserved tactile sensitivity tended to present a longer evolution time until diagnosis than lesions with a more pronounced loss of tactile sensitivity (Fig. 1A).

QST results were different in "lesions" and "contralateral skin" groups for each of the thermal thresholds evaluated: CPT, WPT, CPPT and HPPT (Table 1). We noticed a trend towards an association between worsening WPT (Fig. 1B) and CPT (Fig. 1C) and the degree of tactile sensitivity loss.

The loss of thermal sensitivity, interpreted as the absolute and the percentage difference between lesions and contralateral skin is presented in Table 1 and is stratified according to the tactile sensitivity of the lesions in Table 2.

The subepidermal nerve fibers in contralateral biopsies were visualized as thicker brown structures with variable diameter and density of staining. These fibers were linear or sometimes grouped in small clumps, placed parallel to the basal layer and sometimes positioned to cross it towards the surface (Fig. 2A). The contralateral skin biopsies also showed intraepidermal nerve fibers as discontinuous linear structures stained in brown, resembling "beads" that vertically crossed the basal, spinous and granular layers toward the skin surface, then bent and continued parallel to the corneum stratum, inside of which they could eventually be seen (Fig. 2C and D). However, not all intraepidermal fibers were visualized throughout their entire course. Often, the fibers crossed the section obliquely and were only seen in portions of its course.

Lesion biopsies showed a substantial decrease in subepidermal fibers (Fig. 2B, arrowheads) and intraepidermal fibers (Fig. 2E).

Evaluation of intraepidermal and subepidermal denervation was performed in each patient by determining the percentage difference between the values obtained in the lesion and the contralateral skin. The lesions presented a mean rarefaction of subepidermal fibers of 79.5% (SD = 19.6; coefficient of variation = 0.24) and a mean reduction of intraepidermal fibers of 80.8% (SD = 24.9; coefficient of variation = 0.30) compared to the contralateral areas (Table 1).



**Table 1.** Quantitative thermal test thresholds and nerve fibers quantification in lesions and contralateral skin.

Perception threshold	Lesion		Contralateral skin		P	Absolute Difference		Percentage Difference		CV*
	Mean (°C)	Standard deviation	Mean (°C)	Standard deviation		Mean (°C)	Standard deviation	Mean (%)	Standard deviation	
Cold	19.0	9.22	27.9	2.3	<0.001	9.2	8.5	33.6	32.1	0.95
Warm	43.2	5.6	37.3	4.7	<0.001	6.0	4.3	16.6	12.6	0.76
Cold induced pain	3.0	6.0	8.7	9.2	0.013	5.5	6.7	39.6	46.5	1.17
Heat induced pain	48.0	2.1	44.6	4.2	<0.001	4.2	3.7	10.1	9.4	0.93
Cutaneous fibers	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	P	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	CV*
Intraepidermal (mm)	1.2	2.3	4.7	3.5	<0.001	3.6	2.9	80.8	24.9	0.30
Subepidermal (Nodermis)	0.2	0.2	1.1	0.8	<0.001	0.8	0.7	79.5	19.6	0.24

Notes: p value of the Wilcoxon test.

\*CV: coefficient of variation (standard deviation/mean); doi:10.1371/journal.pntd.0001975.t001

Good correlation was detected between the deficit of intraepidermal fibers and the deficit of subepidermal fibers (Spearman coefficient: 0.60;  $p=0.004$ ). However, the bivariate analysis showed lack of statistical correlation between intraepidermal or subepidermal fibers deficit and thermal thresholds deficit.

## Discussion

The Ministry of Health of Brazil recommends the use of a thin dry cotton swab to detect the tactile sensitivity deficit in leprosy lesions [27]. For the evaluation of protective sensation in hands and feet, some authors consider the inability of perception of the 0.2 g [28] or 2.0 g [29] monofilaments as the definition of tactile impairment. However, there is still no consensus regarding the threshold to be considered when the monofilaments are used in the assessment of tactile sensation on suspicious skin lesions for leprosy diagnostic purposes.

In our hands the diagnosis was properly performed before the patient was enrolled in the study. We tested lesions with the monofilament test in order to enable quantification of tactile lesions, since the test with cotton swab is only a qualitative test. We wanted to counterbalance the quantitative result (or semi-quantitative) of monofilament to the quantitative results of thermal sensitivity and quantification of morphological innervation of the skin. In fact, the use of monofilaments has been previously studied by our group and compared to the quantitative thermal test for the examination of suspicious lesions of Leprosy [30].

In 30% of our patients, the lesions were sensitive to the 0.05 g monofilament and in 30% the tactile sensitivity deficit was mild, with preserved sensitivity to the 0.2 g monofilament. The diagnosis of leprosy may be challenging when lesions do not present tactile impairment or when only a slight tactile hypoesthesia is demonstrated.

That may explain the longer period of evolution before diagnosis in patients presenting with normal or only small changes in tactile sensitivity. Outside the referral service, the evaluation of suspected lesions seems so strongly dependent on tactile tests that late diagnosis may occur if the Semmes-Weinstein test is normal or slightly impaired.

The thermal sensitivity deficit in leprosy lesions is known to precede the loss of tactile sensitivity [28,31]. In our hands, all lesions with a preserved tactile sensitivity to the 0.05 g or 0.2 g monofilaments showed impaired CPT and WPT. The most significant difference between lesions and contralateral skin was in the CPT, with mean absolute difference of 9.2°C. Averagely, the difference for the WPT was 6.0°C. The more significant impairment in CPT compared to WPT in leprosy lesions has been demonstrated by other studies, suggesting a more intense involvement of thin myelinated type A-delta fibers than thin unmyelinated type C fibers in leprosy skin lesions [30].

The quantification of contralateral skin intraepidermal fibers showed a mean of 4.7 fibers per millimeter of epidermis considering all sites examined. This value is similar to the mean of 5.3 found in a Brazilian study focused on the standardization of intraepidermal fibers quantification in the distal leg of healthy volunteers [32]. Nevertheless, it is lower than those found by most other authors. For instance, the quantification of intraepidermal fibers from the healthy distal leg showed means of 9.6/mm [33], 16.3/mm [34], 11.1/mm [35], 17.8/mm [36], 13.8/mm [37] and 5.2/mm [38]. For the proximal region of the thigh, normal means of 21.1/mm [37], 20.3/mm [33] and 23.8/mm [34] have been reported. To date, we do not have knowledge of reports on the standardization of intraepidermal fiber density in other regions besides those on lower limbs, used in the study of thin fiber

**Table 2.** Stratification of tactile sensitivity and the degree of thermal sensitivity impairment in lesions.

Tactile sensitivity in lesions	Difference in CPT (°C) (contralateral skin - lesion)			Difference in WPT (°C) (lesion - contralateral skin)		
	Mean	Minimum	Maximum	Mean	Minimum	Maximum
Green	8.1	2.3	27.6	4.3	1.0	7.5
Blue	3.8	1.0	6.2	5.1	1.3	12.4
Light	1.21	3.8	25.9	9.0	4.6	13.0
Dark red	18.8	7.0	25.0	7.7	3.2	15.4
Orange	8.2	-	-	5.4	-	-

Note: The thermal thresholds impairments were calculated as the percentage difference between the values obtained in the skin and the contralateral lesion. The degree of thermal sensitivity impairment in lesions was compared to contralateral skin and indicated by the absolute difference between the threshold values. doi:10.1371/journal.pntd.0001975.t002

neuropathies. Thus, ours and other previously published data point out for the need of standardization of normal fiber density in different body localization.

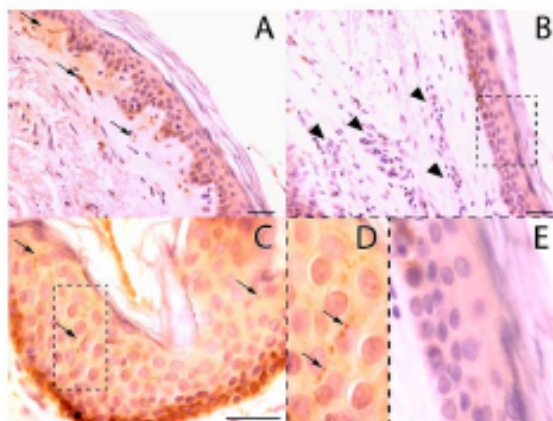
Intraepidermal fibers were seen in contralateral free of lesions skin of all patients, contrasting authors [23] who reported a complete intraepidermal denervation in 16 of 28 biopsies of contralateral skin in leprosy patients. This may be due to the counting criteria adopted. In our study, shorter segments, representing fibers arranged obliquely to the cutting plane of the paraffin block, were counted. Still, the contralateral skin of our patients showed a reduction of intraepidermal fibers when the reference values mentioned previously [33,34,35,36,37,38] were taken into account.

This intraepidermal denervation may be an evidence of systemic pathogenic mechanisms acting beyond the topographically limited inflammatory infiltrate typical of leprosy. Antunes and others have observed that no exact correspondence exists between the denervation regions and those affected by inflammatory infiltrate in lesions [21]. Facer and others have proposed that the thinning in intraepidermal fibers in the contralateral skin could be related to a widespread reduction in nerve growth factor [22].

In our study, intraepidermal fibers were absent in the lesions of six patients. In other sixteen, they were significantly reduced, but not completely abolished. This finding differs from others who have observed a complete intraepidermal denervation in lesions of all [23] or almost all patients [39]. Again, this may be due to the standardization criteria adopted for fiber counting. We believe that even short segments of intraepidermal fibers must be quantified because these segments are representative of fibers arranged obliquely to the cutting plane of the material.

To calculate the deficit in thermal thresholds and cutaneous innervation, we chose to use the percentage difference between contralateral skin and lesions. This should counteracts the physiological variations depending on the body region studied [40,41,42,43]. The threshold temperatures vary regionally, depending on factors such as thickness of epidermis, physiological fluid volume and density of cutaneous innervation [44]. Likewise, the density of intraepidermal innervation presents important regional variation, with respect to the craniocaudal concentration gradient, higher in the trunk than in the limbs and higher in their proximal region than at their distal extremities [45].

The denervation observed in lesions was considerable. On average, the lesions showed 20.5% of the subepidermal fibers and



**Figure 2. Immunohistochemical staining for PGP 9.5 in leprosy patients.** (A) Subepidermal fibers in the contralateral skin (arrows). (B) Inflammatory infiltrate (arrowheads) in the lesion skin. Notice the scarcity of stained nerve fibers. (C) Intraepidermal fibers (arrows) in the contralateral skin are demarcated with a dotted line in (D) showing visible nerve endings varicosities (arrows). (E) Notice the scarcity of intraepidermal fibers in the magnified field of the lesion skin. Bar = 30  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pntd.0001975.g002

19.2% of the intraepidermal fibers found in the contralateral skin biopsies. This marked denervation was homogeneous among all patients, especially regarding the subepidermal fibers. The coefficients of variation of the percentage differences in subepidermal and intraepidermal fibers were 0.24 and 0.30, respectively, indicating homogeneity in their deficit among the patients. In turn, the coefficients of variation of the percentage differences in WPT, CPT, CPPT and HPPT were high (0.95, 0.76, 1.17 and 0.93, respectively), indicating important variation in their deficit in our sample.

Although seemingly obvious, a correlation could not be detected between cutaneous denervation and thermal sensitivity impairment. The observation of those coefficients of variation anticipated that the degree of sensory deficit had been significantly variable among the patients, whereas the decrease in thin cutaneous fibers had been quite uniform in all cases.

Otherwise, the same significant and homogeneous rarefaction of innervation may support the use of quantification of thin cutaneous neural fibers as an additional diagnostic tool for leprosy. Thermal sensitivity tests are known to be dependent upon the patient's ability to respond correctly to the instructions of the examiner, which may hinder its application in children or in patients with cognitive impairment. The histological study of a suspicious lesion, considered the gold standard for establishing the diagnosis, may also be nonspecific [46]. These difficulties have not been fully addressed in other tests performed on lesion biopsies. The search for the causative microorganism using *in situ* hybridization or polymerase chain reaction, for example, have only demonstrated sensitivities of 45.5% and 66.6%, respectively

[47]. In this regard, the objective quantification of thin fibers in the skin of patients with suspicious skin lesions should be the object of larger studies specifically aimed at its validation within the existing methods for leprosy diagnosis.

#### Limitations

The lack of correlation between cutaneous denervation and thermal sensitivity impairment may arise from the fact that variations in thermal thresholds are also related to changes in the innervation of deeper skin layers that we did not approach in the current study. However, it should be considered that we have not yet conducted the qualitative ultrastructural analysis of nerve endings, the investigation of the immunocytochemical expression of the several neurotransmitters involved in thermal sensitivity control, or the study of inflammatory cytokines expression, factors that may be related to the functional impairment of cutaneous nerve endings [48,49].

#### Acknowledgments

We are indebted to V. A. da Silva for preparing the tissue samples. We gratefully thank the Eduardo de Menezes Hospital staff for all the support given in the recruitment and examination of the patients in this work.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IARJ, RMEA, MFV. Performed the experiments: IARJ, RMEA, ICCS, L.T.G. Analyzed the data: IARJ, RMEA, ICCS. Contributed reagents/materials/analysis tools: IARJ, RMEA, SL. Wrote the paper: IARJ, RMEA.

#### References

1. Araujo M (2003) Leprosy in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(3):373-382.
2. Goulart IMR, Goulart LR (2008) Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* 300(6):269-290.
3. Mordohai SL (2004) An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Acad Dermatol* 51(3):417-426.
4. Walker SL, Lockwood DNJ (2007) Leprosy. *Clin Dermatol* 25(2):165-172.
5. Agnew LA, Pandit L, Dalal M, Shetty JP (2008) Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin Neurol Neurosurg* 107(6):445-454.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Distribuição para vigilância, atenção e controle da hanseníase. Diário Oficial da União. Brasília. Available: <<http://www.saude.br.gov.br/vsa/portais/index.php?menu=orgao-granadocod=460842>>. Accessed 2011 Oct 28.
7. WHO. Weekly Epidemiological Record: global leprosy situation 2010. Available: <<http://www.who.int/lep/resources/wer/en/index.html>>. Accessed 2011 Oct 28.
8. Bekkerotoki J, Tomasek E (1987) The repeatability of testing with semma-Weinstein mono-filaments. *J Hand Surg [Am]* 12A(1):155-161.
9. Manzano GM, Giuliano LMP, Nobrega JAM (2008) Brief historical notes on the classification of nerve fibers. *Arq Neuropsiquiatr* 66(1):117-119.
10. Van Brakel WH, Nichols PG, Das I, Bakozaki P, Maddahi P, et al. (2005) The INFER Cohort Study: assessment of sensory and motor neuropathy in leprosy at hanseníase. *Leprosy* 76(4):277-295.
11. Srinivasan H, Stumpfe B (1989) Leprosy diagnosis: a device for testing the thermal sensitivity of skin lesions in the field. *Bull World Health Organ* 67(6):635-641.
12. Amer Assoc Electrodiagnost M (2004) Technology literature review: Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 29(5):734-747.
13. Meh D, Denisk M (1994) Quantitative assessment of thermal and pain sensitivity. *J Neurol Sci* 122(2):164-169.
14. Shy ME, Finkelman EM, So YT, Amazo JC, Corabith DR, et al. (2003) Quantitative sensory testing - Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 60(6):898-904.
15. Yarnitzky D, Sprecher E, Zadansky R, Hornik JA (1993) Heat pain thresholds - normative data and repeatability. *Pain* 60(3):329-332.
16. Zadansky R, Yarnitzky D (1998) Clinical applications of quantitative sensory testing (QST). *J Neurol Sci* 153(2):215-236.
17. Gulbenkian S, Wharton J, Polak J (1987) The visualization of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *J Auton Nerv Syst* 18(3):235-247.
18. Cruz G, Amad P, Amal N, Garcia-Larrea I, Huanqui M, et al. (2004) EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. *Eur J Neurol* 11(3):153-162.
19. Periquet M, Novak V, Collins M, Nagaraja H, Erlen S, et al. (1999) Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 53(3):1641-1647.
20. Antunes SLG, Liang Y, Neri JAD, Haak-Frendrich M, Johansson O (2003) The expression of NGF and PGP 9.5 in leprosy reactional cutaneous lesions - An assessment of the nerve fiber status using immunostaining. *Arq Neuropsiquiatr* 61(2B):346-352.
21. Antunes SLG, Sarno EN, Holmboe G, Johansson O (1997) A comparison of the expression of NGF, PGP 9.5 and NSE in cutaneous lesions of patients with early leprosy using immunohistochemistry. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 65(3):357-365.
22. Facer P, Mann D, Mathur R, Pandya S, Ladwala U, et al. (2000) Do nerve growth factor-related mechanisms contribute to loss of cutaneous nociception in leprosy? *Pain* 88(1-2):231-238.
23. Facer P, Mathur R, Pandya SS, Ladwala U, Singhal BS, et al. (1998) Correlation of quantitative tests of nerve and target organ dysfunction with skin immunohistology in leprosy. *Brain* 121:2239-2247.
24. Karamath SS, Springall DR, Lucas S, Levy D, Ashby P, et al. (1989) Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. *J Pathol* 157(1):15-26.
25. Ridley DS (1974) Histological classification and immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ* 51(5):451-465.
26. Cohen J (1992) A power primer. *Psychol Bull* 112(1):155-159.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Política de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. Available: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_da\\_hanseníase.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_da_hanseníase.pdf)>. Accessed 2011 Oct 28.
28. Van Brakel WH, Nichols PG, Wilke-Smith EP, Das I, Bakozaki P, et al. (2008) Early Diagnosis of Neuropathy in Leprosy-Comparing Diagnostic Tests in a Large Prospective Study (the INFER Cohort Study). *PLoS Negl Trop Dis* 2(4).
29. Wender R, Melchior H (2007) Dorsal sensory impairment in hands and feet of people affected by Hansen's disease in Israel. *Leprosy* 78(4):362-368.
30. Vilarelma M, Orsini M, Lima R, Antunes C (2007) Comparative study of the cutaneous sensation of leprosy-suspected lesions using Semma-Weinstein mono-filaments and quantitative thermal testing. *Leprosy* 78(2):102-109.
31. Vilarelma M, Orsini M, Grassi M, Antunes C (2007) Impaired warm and cold perception thresholds in leprosy skin lesions. *Leprosy* 78(2):110-121.
32. Moura L, Oliveira A, Zanotti E, Cardoso R, Schmidt R, et al. (2004) Normal pattern of intraepidermal nerve fibers in 30 healthy volunteers with PGP 9.5. *Arq Neuropsiquiatr* 62(2A):271-275.

33. Smith A, Ramachandran P, Tripp S, Singleton Jv (2001) Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 57(9):1701–1704.
34. Holland N, Stocks A, Hauser P, Cornblath D, Griffin J, et al. (1997) Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. *Neurology* 48(3):708–711.
35. Chiang M, Tan Y, Pan C, Teng T, Lin W, et al. (2002) Cutaneous innervation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 59(7):1094–1098.
36. McCarthy B, Hsieh S, Stocks A, Hauser P, Macko C, et al. (1995) Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology* 45(10):1849–1853.
37. McArthur J, Stocks E, Hauser P, Cornblath D, Griffin J (1998) Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 55(12):1513–1520.
38. Koskinen M, Hietanen A, Kytäniemi M, Pelin J, Rantala I, et al. (2005) A quantitative method for the assessment of intraepidermal nerve fibers in small-fiber neuropathy. *J Neurol* 252(7):789–794.
39. Dalgaard C, Rydh M, Hagerstrand A (1989) Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry* 92(5):385–390.
40. Barlett G, Stewart JD, Tamblyn R, Abmanowicz M (1998) Normal distribution of thermal and vibration sensory thresholds. *Muscle Nerve* 21(3):367–374.
41. Dyck PJ, Zimmerman I, Gillen DA, Johnson D, Karnes JL, et al. (1993) Cool, warm, and heat-pain detection thresholds – testing methods and inferences about axonomic distribution of receptors. *Neurology* 43(3):500–508.
42. Hagander LG, Midani HA, Kuzkowski MA, Pary GJG (2000) Quantitative sensory testing: effect of site and skin temperature on thermal thresholds. *Clin Neurophysiol* 111(1):17–22.
43. Hile MJ, Stemper R, Axelrod FR, Kolodny EH, Neundorfer B (1999) Quantitative thermal perception testing in adults. *J Clin Neurophysiol* 16(5):462–471.
44. Jamal GA, Hansen S, Weir AJ, Ballantine JP (1985) An improved automated-method for the measurement of thermal thresholds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48(4):354–360.
45. Luoma G (2007) Recent developments in the management of peripheral neuropathy using skin biopsy. *Rev Neurol* 163(12):1266–1270.
46. Scotland DM, Adams LB, Gillis TP, Keshenbuhl JL, Truman RW, et al. (2006) The continuing challenge of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19(2):338.
47. Dayal R, Agarwal M, Narayan M, Katoch VM, Katoch K, et al. (2007) PCR and in-situ hybridization for diagnosis of leprosy. *Indian J Pediatr* 74(7):645–648.
48. Anand P (1996) Neurotrophins and peripheral neuropathy. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 351(1330):449–454.
49. Antunes SLG, Noviski MFG, Nery JAC, Almeida SMR, Sarno EN (1996) Ultrastructural study of the dermal nerves in the cutaneous mucular lesions of patients with early leprosy. *Histoenol Int* 21(2):14–21.

## 9.2. ARTIGO SUBMETIDO

### Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil

Ismael Alves Rodrigues Júnior<sup>a</sup>, Christiane Teixeira Cartelle<sup>a</sup>, Maria de Lourdes Meirelles Noviello<sup>a</sup>, Leticia Trivellato Gresta<sup>a</sup>, Sandra Lyon<sup>b</sup>, Rosa Maria Esteves Arantes<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Pathology Department - Universidade Federal de Minas Gerais.

Campus da Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas – Bloco C3/251 – 6627 Antônio Carlos Av – Pampulha – Belo Horizonte – Brazil – Postal Code 31.270-010 – Phone: 55 (31) 3409-2896 / 55 (31)3409-2884 / 55 (31) 3409-2878

<sup>b</sup> Dermatology Department – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

Hospital Eduardo de Menezes – 2213 Dr. Cristiano Rezende Av – Bonsucesso – Belo Horizonte – Brazil – Postal Code 30.622-020 – Phone: 55 (31) 3328-5000

Ismael Alves Rodrigues ([ismaelalvesrodrigues@gmail.com](mailto:ismaelalvesrodrigues@gmail.com))

Christiane Teixeira Cartelle ([christiane.cartelle@gmail.com](mailto:christiane.cartelle@gmail.com))

Maria de Lourdes Meirelles Noviello ([marianoviello@yahoo.com.br](mailto:marianoviello@yahoo.com.br))

Leticia Trivellato Gresta ([letrivellato@gmail.com](mailto:letrivellato@gmail.com))

Sandra Lyon ([sandralyon@ig.com.br](mailto:sandralyon@ig.com.br))

Rosa Maria Esteves Arantes ([rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br))

*Corresponding author.*

Rosa Maria Esteves Arantes ([rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br))

**Abstract**

**Objectives:** Different leprosy classification methods were proposed since the 1930s. The aim of this study was to compare the current ones in a referral center in Brazil.

**Methods:** The WHO operational classification (WOC) was compared to the Ridley and Jopling classification (RJC), the Madrid classification and a classification based on the number of body areas affected by skin and/or neural lesions (NBAA). The correlation between the clinical and histopathological components of the RJC was assessed.

**Results:** The agreement between the WOC and the RJC was 77.6% ( $\kappa = 0.53$ ). The WOC tended to overestimate the number of multibacillary patients. The WOC showed its best agreement with the NBAA. There was perfect agreement between the clinical and histopathological RJC in 46.9% of the patients.

**Conclusions:** The agreement between the WOC and the RJC was better than any other purely clinical classification, reinforcing the importance and simplicity of the operational method. Although major disagreement between the clinical and histopathological RJC was uncommon, perfect agreement occurred in less than half the cases, and was even lower for BL and TT forms. Possible causes to explain the divergent cases were discussed, showing that there may be room for improvement in the RJC histopathological criteria.

**Keywords:** leprosy classification, Ridley Jopling, operational classification

**Highlights - International Journal of Infectious Diseases**

- WHO operational and the Ridley/Jopling classifications show moderate agreement.
- Operational method shows better performance than the other clinical classifications.
- Clinicopathological disagreement in the Ridley/Jopling classification is common.
- There may be room for improvement in the Ridley/Jopling histopathological criteria.

## Introduction

Leprosy presents a continuous spectrum of clinical and pathological manifestations that depend on the type and intensity of the patient's immune response to *Mycobacterium leprae*.<sup>1</sup> The intense cellular response is associated with the containment of the bacillus and to the forms of paucibacillary presentation, whose prototype is the tuberculoid form. A primarily humoral response is associated with intense agent replication and with multibacillary forms, with the lepromatous form at the extreme end.<sup>2</sup>

Several different leprosy classifications have been proposed since the 1930s, which consider these two ends of the spectrum and the intermediate (*borderline*) manifestations between them.<sup>3</sup> Based on clinical aspects, the Madrid classification, from 1953, includes the tuberculoid (TT), lepromatous (LL), borderline and indeterminate (IND) forms. This classification was included in the recommendations of the World Health Organization (WHO), prevalent until 2002.<sup>3,4</sup> In 1966, Ridley and Jopling created a classification that is still considered essential for leprosy research standardization. Its clinical, pathologic, bacilloscopic and immunological criteria provide the bases for the most complete classification of the disease's various forms, including IND, TT, borderline tuberculoid (BT), mid-borderline (BB), borderline lepromatous (BL) and LL.<sup>5,6</sup>

However, while developing multidrug therapy for leprosy, it became critical for the WHO to establish a simplified operational classification to differentiate between paucibacillary and multibacillary patients and thus facilitate adequate treatment. Currently, patients are considered paucibacillary if they present up to five skin lesions and multibacillary if they present six or more lesions. This operational classification facilitates fieldwork, since it does not require expertise in assessing skin lesion



morphology or applying the slit-skin smear examination (SSS), but different studies indicate its flaws.<sup>7-10</sup>

On the other hand, studies on the Ridley and Jopling classification (RJC) show great variations in agreement between its clinical and histopathological components.<sup>5,11-18</sup> In a study conducted in India, with 303 multibacillary patients, 73 of the 178 patients clinically classified as BT were reclassified, following the histopathological examination. Two of these patients were reclassified as LL and 32 as IND, both leprosy forms expected to be easily differentiated from BT.<sup>19</sup>

The aim of this study was to compare the WHO operational classification with the RJC in a leprosy referral center in Brazil. We also compared those classifications to the Madrid and the NBAA ("number of body areas affected") classification. The latter is based on the number of body areas affected by skin or neural lesions.<sup>7,20</sup> Finally, we assessed the correlation between the clinical and histopathological components of the Ridley and Jopling classification.

### **Materials and Method**

Forty-nine leprosy patients from the leprosy referral clinic of the Hospital Eduardo de Menezes (Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais) agreed to participate and gave their signed consent.

Patients underwent a complete dermato-neurological examination by a dermatologist with expertise in leprosy. Skin lesions were counted and the affected body areas were recorded in the appropriate form. All patients underwent SSS from four sites (ear lobes, elbows and skin lesions). The Ziehl-Neelsen stain and the SSS bacilloscopic index assessment were conducted in the same referral center by an experienced microbiologist. All patients underwent a skin lesion biopsy. Hematoxylin-

eosin and Wade staining were performed in the Experimental Neuroimmunopathology laboratory of the Instituto de Ciências Biológicas (UFMG), where a pathologist with expertise in leprosy interpreted the histopathological examination.

In the Madrid classification, patients with the borderline and LL forms were considered multibacillary. In the Ridley and Jopling classification, patients with the BB, BL and LL forms were considered multibacillary. The histological classification was the one outlined by RIDLEY (1974). In the NBAA classification, two thresholds for the multibacillary status were tested: patients with two or more and patients with three or more body areas involved. For NBAA classification, the body surface was divided into nine areas, as described by VAN BRAKEL et al. (1992) and GUPTA et al. (2012).

To assess the agreement between any two classification methods, we created 2x2 tables and calculated the kappa coefficient as well as the percentage of cases in which there was agreement. Kappa values between 0.20 and 0.40 were considered 'reasonable', those between 0.41 and 0.60 were considered 'moderate', those between 0.61 and 0.80 were considered 'good', and values above 0.81 were considered 'excellent'. Data were analyzed using the SPSS 15.0 software.

The discrepancy between the clinical and histopathological components of the RJC was classified as minimal or major disagreement. The cases in which discrepancy incurred in the change of the pauci/multibacillary status of the patient were considered major disagreement. Otherwise, it was considered minimal disagreement. Histopathological examinations showing nonspecific alterations were diagnosed as IND to permit the disagreement analysis.

## Results

This study included 49 new leprosy cases. Seventeen (34.7%) patients were undergoing treatment for at least one day and at most 30 days, and the remaining patients were not undergoing treatment at the time of the inclusion. Table 1 presents a descriptive analysis of the patients.

Twenty-one (42.9%) patients had six or more skin lesions and 16 (32.7%) patients had a positive SSS. Table 2 shows that most patients (except for the case of the Madrid and NBAA classifications) were paucibacillary. When compared to the operational classification, the Madrid and NBAA classifications resulted in a higher number of multibacillary patients, while the RJC resulted in a higher percentage of paucibacillary patients.

The different classification systems were compared in terms of their ability to define a patient's multibacillary status. The operational classification was more sensitive for the multibacillary status diagnosis than the clinical component of the RJC alone, but the addition of the histopathological examination resulted in significant improvement of the RJC's sensitivity (see Table 2).

When compared with the RJC, the Madrid and NBAA classifications showed the lower specificity for the multibacillary diagnosis. The purely clinical classification system that best agreed with the RJC was the WHO operational classification, with moderate agreement (kappa: 0.53).

The agreement between the RJC and the WHO operational classification was 77.6% (Table 3). One-third of the patients considered multibacillary by the operational classification were classified as paucibacillary by the RJC. On the other hand, four (14.3%) of the 28 patients considered paucibacillary by the operational classification were considered multibacillary by the RJC.

The best agreement with the WHO operational classification was obtained by the NBAA classification (3 or more areas) – 93.8%, kappa: 0.88) and the lowest agreement was observed for NBAA (2 or more areas – 69.4%, kappa: 0.43).

There was perfect agreement between the Ridley and Jopling clinical and histopathological classifications in 23 cases (46.9%). The best agreement occurred in the LL form (85.7%), followed by the IND (72.7%) and BT (50%) forms. Clinical and histopathological diagnoses were in agreement in only 28.6% of TT cases and 14.3% of BL cases (Table 4). There was minor disagreement between the histopathological and clinical profiles in 20 cases (40.8% of the sample).

In table 4, four (80%) of the five cases considered nonspecific by the histopathological examination and classified as IND for the purposes of the disagreement analysis had minor disagreement with the clinical hypothesis. Their paucibacillary status was not altered, since all four were clinically classified as BT. In the major disagreement case, the clinical classification was the BB form.

Except for this last case, major disagreement was seen only in cases classified as BL by the histopathological examination. Of the seven cases classified as BL in biopsies, five (71.4%) were clinically reclassified as BT (Table 5).

In six cases, the disagreement occurred between the clinical BT classification and the IND/nonspecific histopathological classification. Of these, four presented multiple hypopigmented macules and one had slightly elevated plaque lesions, all very suggestive of the BT form. By the other hand, there were two cases in which the clinical classification was IND while the histopathological classification was BT. Both patients presented single hypopigmented macular lesions and negative SSS and their histopathological findings were, therefore, surprising.

Three cases were clinically considered TT and were subsequently reclassified as BT following the histopathological examination. Two of these presented single erythematous plaques and the third patient had two erythematous plaques located in different body areas. Five patients clinically classified as BT were reclassified as TT following the biopsy report. Supporting de BT clinical diagnosis, two of these presented multiple erythematous plaques (6 and 8) and four presented lesions spread across three or more areas of the body.

### **Discussion**

The agreement between the WHO operational classification and the RJC was moderate ( $\kappa = 0.53$ ). The operational classification overestimated the number of multibacillary patients (42.9% vs. 36.8%), and classified as paucibacillary 28.6% of the patients considered multibacillary by the RJC. In a survey of 264 patients in the Philippines, 31-58% of cases considered multibacillary by SSS or skin biopsy had fewer than six skin lesions.<sup>9</sup> In a Brazilian study, conducted in the state of Sergipe with records from 1213 patients, 11% of cases who had fewer than six skin lesions had positive SSS smears.<sup>8</sup>

The moderate value of kappa and the agreement in 77.6% of the cases confirms the importance of the simplest method. Here, the undeniable simplicity of implementation of the WHO operational classification in the field work should be reinforced. It doesn't require familiarity with the different morphologic aspects of the leprosy skin lesions. Further, it dispenses the need for SSS or skin biopsy facilities. Even so, the WHO classification obtained the best agreement with the RJC when compared with any other purely clinical classification method.

The NBAA classification showed good sensitivity for the multibacillary status diagnosis, even better than the operational classification. One possible explanation is that the degree of dispersion of the lesions along the skin's surface may add information about the multibacillarity status, beyond the simple lesion count. In this sense, NBAA classification takes into account not only the presence of skin lesions, but also neurological involvement. Skin lesions concomitant with neuropathies in different body areas are clinically more suggestive of multibacillary cases.<sup>2</sup>

The need for neurological examination makes it more difficult to apply the NBAA method outside leprosy referral services. Besides, the NBAA classification showed lower specificity values for the multibacillary status diagnosis than the operational classification. In a Nepalese study involving 756 patients, the sensitivity and specificity of the NBAA classification (three or more areas) compared to the SSS and histopathological examination were 93% and 39%, respectively.<sup>20</sup> In another study with 100 patients in India, the NBAA rating (two or more areas) had better sensitivity (90% vs. 63%) but lower specificity (75% vs. 85%) than the operational WHO classification.<sup>7</sup>

Regarding the RJC, a complete agreement between its clinical and histopathological components occurred in only 46.9% of cases. The creators of the RJC obtained complete agreement in only 68% of the 82 cases studied.<sup>5</sup> Meyers et al. studied 1429 patients and reported complete agreement in 77.2% of cases, but their results were reported only in part in congress proceedings.<sup>21</sup> Sehgal et al. studied 82 patients and reported perfect agreement in only 42.7% of cases.<sup>14</sup>

The best clinicopathological correlation was seen for the LL form (85.7%) followed by the IND form (72.7%), similar to reports from other authors.<sup>10,13,16,17</sup> Agreement was lowest for the BL form (14.3%), for which other authors reported

agreement rates between 43% and 70%.<sup>13,14,16,17,19</sup> In this sample, the disagreements involving histopathological diagnosis of BL occurred together with a clinical diagnosis of BT (five of the seven discordant cases). Likewise, Lockwood et al. (2012) studied 303 cases of multibacillary leprosy and reported that 41% of patients with the clinical BT form were reclassified following the histopathological examination, with nearly a third of them being reclassified as BL.

Different factors explain the clinicopathological disagreement between the BT and BL forms. First, the distinction between these forms is often difficult from a clinical point of view. Second, discordant results between these two forms may simply represent the natural immune instability of leprosy, with consequent clinicopathological dissociations becoming evident during research.<sup>17,19</sup> Third, though detailed and specific, it seems that the Ridley and Jopling histopathological criteria are not always easy to implement. In some cases, it is very difficult to differentiate between an infiltrate made up mostly of macrophages with small lipidic vesicles and one mostly containing poorly differentiated epithelioid cells.

The clinicopathological correlation of the TT form was also low (28.6%). Among clinically tuberculoid cases, there were more cases reclassified as BT than confirmed as TT by pathology. Conversely, five of the 22 cases clinically classified as BT were reclassified as tuberculoid by the pathologist. Manandhar et al. had histological confirmation in only six of 25 patients clinically classified as TT, while 13 were reclassified as BT.<sup>11</sup> Bhatia et al. studied 1272 patients and, upon observing similar clinicopathological discordances, suggested that the line separating the TT and BT forms in biopsies is uncertain and that the current histopathological criteria of the RJC may not be appropriate.<sup>13</sup>

One should highlight the group of patients clinically classified as BT but with histopathological diagnosis of IND or nonspecific findings. Of these six cases, four had multiple hypopigmented macules and therefore should not be considered IND. There is little information about this particular group of "BT-macular" patients in the literature. In many cases, a peripheral nerve biopsy is consistent with the clinical presentation, despite the nonspecific skin biopsy.<sup>15</sup>

It is interesting to note the absence of cases classified as BB by the histopathological examination among our 49 patients. None of the three patients clinically classified as such was confirmed by biopsy. This is an uncommon form, but it is worth mentioning that the BB form was also absent among the pathology reports of 303 multibacillary patients from the INFIR (ILEP – International Federation of Anti-Leprosy Associations – Nerve Function Impairment in Reaction) cohort, focused on the study of leprosy reactions predictors and the associated neurological deficits.<sup>19</sup> In another study, in which three experienced dermatopathologists examined biopsies from 100 patients in Malawi, the BB form was found only once during the first round of biopsy interpretation, and the same examiner did not identify the BB form again on the second blind round of interpretation.<sup>22</sup> According to RIDLEY (1974), the histopathological difference between the BT and BB forms resides mainly in the estimate of the number of lymphocytes that permeates the epithelioid inflammatory infiltrate. In the BT form, there is a moderate lymphocytic infiltrate, while it is scarce in the BB form. It could be hypothesized that the lack of BB forms in pathological reports may arise from the fact that this "scarce" description might be unduly subjective.

In conclusion, the agreement between the WHO operational classification and the RJC was moderate and better than any other purely clinical classification studied.



Although major disagreement between the clinical and histopathological components of the RJC was uncommon, perfect agreement between these components occurred in less than half the cases, and was even lower for BL and TT forms. This shows that there is room for improvement in the RJC, especially in some of its histopathological criteria.

**Financial support:**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa Tecnológica e Científica (CNPq 473013/2012-6, 458832/2014-6), CAPES (2248/11) and FAPEMIG (PPM 2014). R.M.E.A. receives CNPq Research Schollarship (303338/2014-8).

**Conflict of interest statement:**

The authors declare that there are no known conflicts of interest associated with this publication. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Ethical Approval:**

This study was approved by the research ethics committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), under the protocol number 595/08.

**References**

- 1- World Health Organization (2012) WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organ Tech Rep Ser 968.
- 2- Araújo M: Leprosy in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36:373-382.
- 3- Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution? *Leprosy Review* 2007;78:317-320.
- 4- World Health Organization (1998) WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organ Tech Rep Ser 874.
- 5- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966;34:255-273.
- 6- Ridley DS. Histological classification and immunological spectrum of leprosy. *Bulletin of the World Health Organization* 1974;51:451-465.
- 7- Gupta R, Kar HK, Bharadwaj M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy-a clinic-pathological study. *Lepr Rev* 2012;83:354-362.
- 8- Cavalcanti AA, Lucena-Silva N, Montarroyos UR, Albuquerque PM. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: A 6-year retrospective study in Recife, state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:616-9.
- 9- Pardillo FE, Fajardo TT, Abalos RM, Scollard D, Gelber RH. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. *Clin Infect Dis* 2007;44:1096-9.
- 10- Santos VS, de Mendonça Neto PT, Falcão Raposo OF, Fakhouri R, Reis FP, Feitosa VL. Evaluation of agreement between clinical and histopathological data for classifying leprosy. *Int J Infect Dis* 2013;17:e189-192.
- 11- Manandhar U, Adhikari RC, Sayami G. Clinico-histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. *Journal of Pathology of Nepal* 2013;3:452-8.

- 12- Cree IA, Srinivasan T, Krishnan SAR, Gardiner CA, Mehta J, Fisher CAH, et al. Reproducibility of histology in leprosy lesions. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 1988;56:296-301.
- 13- Bhatia AS, Katoch K, Narayanan RB, Ramu G, Mukherjee A, Lavana RK. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 1993;61:433-8.
- 14- Sehgal VN, Koranne RV, Nayyar M, Saxena HMK. Application of clinical and histopathological classification of leprosy. *Dermatologica* 1980;161:93-6.
- 15- Kaur S, Sharma VK, Basak P, Kaur I, Radotra BD. Concurrent skin and nerve histology in leprosy and its role in the classification of leprosy. *Leprosy Review* 1993;64:110-6.
- 16- Sharma A, Sharma RK, Goswami KC, Bardwaj S. Clinico-histopathological correlation in leprosy. *JKScience* 2008;10:120-3.
- 17- Moorthy BN, Kumar P, Chatura KR, Chandrasekhar HR, Basavaraja PK. Histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2001;67:299-301.
- 18- Mathur MC, Ghimire RB, Shrestha P, Kedia SK. Clinico-histopathological correlation in leprosy. *Kathmandu Univ Med J* 2011;9:248-251.
- 19- Lockwood DN, Nicholls P, Smith WC, Das L, Barkataki P, van Brakel W, et al. Comparing the clinical and histological diagnosis of leprosy and leprosy reactions in the infir cohort of indian patients with multibacillary leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1702.
- 20- Van Brakel WH, Desoldenhoff R, McDougall AC. The allocation of leprosy patients into paucibacillary and multibacillary groups for multidrug therapy, taking into

**Table 1**  
**Descriptive analysis of 49 new leprosy cases from a referral center in Minas Gerais, Brazil.**

Variable	n	(%)
<b>Gender</b>		
Male	27	(55.1)
Female	22	(44.9)
<b>Age (years)</b>		
< 15	2	(4.0)
15-30	12	(24.5)
31-45	10	(20.4)
46-60	13	(26.5)
61-75	12	(24.5)
<b>Number of skin lesions</b>		
≤ 5	28	(57.1)
> 5	21	(42.9)
<b>Number of impaired nerves</b>		
≤ 1	41	(83.7)
> 1	8	(16.3)

Source: research data

Table 2

Classification of 49 new leprosy cases treated in a referral center in the state of Minas Gerais (Brazil) into paucibacillary and multibacillary, according to the following classifications: WHO operational, Madrid, NBAA (number of body areas affected), Ridley and Jopling (clinical), Ridley and Jopling (histopathological) and bacilloscopic.

Classification	Paucibacillary		Multibacillary		MB diagnostic sensitivity <sup>a</sup>	MB diagnostic specificity <sup>a</sup>	Kappa <sup>a</sup>
	n	(%)	n	(%)			
Madrid	16	(32.6)	33	(67.3)	100%	51.6%	0.44
NBAA (two or more areas)	13	(26.5)	36	(73.5)	100%	41.9%	0.35
NBAA (three or more areas)	25	(51.0)	24	(49)	83.3%	71.0%	0.51
Operational	28	(57.1)	21	(42.9)	77.8%	77.4%	0.53
Ridley and Jopling (clinical)	37	(75.5)	12	(24.5)	66.7%	100%	0.72
Ridley and Jopling (histopathological)	33	(67.3)	16	(32.7)	88.9%	100%	0.91

Source: research data

Notes: a-The sensitivity and specificity measures, as well as kappa, were calculated based on the final Ridley and Jopling classification.

MB – multibacillary.

**Table 3**  
**Agreement between the WHO operational classification and other classification methods in 49 new leprosy cases treated at a referral center in the state of Minas Gerais (Brazil).**

		Madrid		Ridley and Jopling	
		Multibacillary	Paucibacillary	Multibacillary	Paucibacillary
WHO operational classification	Multibacillary	21 (42.8%)	0 (0%)	14 (28.6%)	7 (14.3%)
	Paucibacillary	12 (24.5%)	16 (32.6%)	4 (8.2%)	24 (49.0%)
		Agreement: 75.5% Kappa: 0.53		Agreement: 77.6% Kappa: 0.53	

		NBAA (two or more areas)		NBAA (three or more areas)	
		Multibacillary	Paucibacillary	Multibacillary	Paucibacillary
WHO operational classification	Multibacillary	21 (42.8%)	0 (0%)	21 (42.8%)	0 (0%)
	Paucibacillary	15 (30.6%)	13 (26.5%)	3 (6.1%)	25 (51%)
		Agreement: 69.4% Kappa: 0.43		Agreement: 93.8% Kappa: 0.88	

Source: research data

Notes: NBAA (number of body areas affected)

**Table 4**

The discrepancy between the clinical and histopathological components of the Ridley and Jopling classification in 49 new leprosy cases treated at a referral center in the state of Minas Gerais (Brazil).

Ridley and Jopling histopathological classification	n	Perfect agreement	Minor disagreement	Major disagreement
Indeterminate	11	8 (72.7%)	3 (27.3%)	0
Tuberculoid	7	2 (28.6%)	5 (71.4%)	0
Borderline-tuberculoid	12	6 (50%)	6 (50%)	0
Borderline-borderline	0	-	-	-
Borderline-lepromatous	7	1 (14.3%)	1 (14.3%)	5 (71.4%)
Lepromatous	7	6 (85.7%)	1 (14.3%)	0
Nonspecific	5	0	4 (80%)	1 (20%)

Source: research data.

Table 5

Correlation between the clinical and histopathological components of the Ridley and Jopling classification methods in 49 new leprosy cases treated at a referral center in the state of Minas Gerais (Brazil).

		Ridley and Jopling histopathological classification (n)							total
		TT	BT	BB	BL	LL	Indeterminate	Nonspecific	
Ridley and Jopling clinical classification (n)	TT	2	3	0	0	0	1	0	6
	BT	5	6	0	5	0	2	4	22
	BB	0	1	0	1	0	0	1	3
	BL	0	0	0	1	1	0	0	2
	LL	0	0	0	0	6	0	0	6
	Indeterminate	0	2	0	0	0	8	0	10
	total	7	12	0	7	7	11	5	49

Source: research data

Notes: TT – tuberculoid, BT – borderline-tuberculoid, BB – borderline-borderline, BL – borderline-lepromatous, LL – lepromatous



## 9.2.1 RESPOSTA AOS REVISORES

Ref.: Manuscript

IJID-D-15-00904

### **Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil**

#### ***Reviewers' comments:***

#### ***Reviewer 01***

1. It is a statistical nice study; its findings are more or less comparable with previous studies. The study sample is rather small. It is a pity that seeing the weight of the pathology in this research ("there may be room for improvement in the Ridley/Jopling histopathological criteria") not a second pathologist experienced in leprosy was asked to view the slides. However, there are certain aspects which have to be made clear. Before classification a diagnosis has to be made. In leprosy of the three cardinal signs (enlarged nerves, loss of sensations in the lesions, positive skin smear) in theory two of the three should be positive before a diagnosis can be made.

#### **Reply:**

In fact, a different pathologist with experience in leprosy has reviewed each of our slides (both the pathologists are co-authors). When there were divergence between their reports, in a new session, together, they reached the final diagnosis. As we did not carried out this process in a "blind" way, we thought it was best to simplify and write only "by a pathologist with expertise in leprosy". Please, we ask the reviewer to consider the modifications indicated in yellow in the text. Modifications made on: page 6 (1<sup>st</sup> paragraph)

The sample was small because we performed a convenience sampling. The study included the patients who were diagnosed with leprosy at the Eduardo de Menezes Hospital Outpatient Clinic during a short period of time. On the other hand, the small sample size facilitated researchers to control and participate in the whole process of diagnosis confirmation, lesions counting, morphological description of the lesions and confirmation of clinical improvement during the treatment. This scientific approach to the recruitment and inclusion process would be impossible if we had only analyzed retrospectively medical records or tissue bank materials in the laboratory.

Modifications made on: page 9 (last paragraph)

*Considerations about the diagnosis:*

The WHO guidelines for leprosy diagnosis recommend that *one* of these signs must be positive: 1- skin lesion consistent with leprosy and with definite sensory loss, with or without thickened nerves and 2- positive skin smears.

<http://www.who.int/lep/diagnosis/en/>

The Ministry of Health of Brazil recommends that *one* of the three cardinal signs must be positive: 1- enlarged nerves, 2- loss of sensations, 3- positive skin smear.

(BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15 out. 2010. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=55&data=15/10/2010>).

Undoubtedly, the reviewer's recommendation that at least two of the three cardinal signs must be positive *in the same patient* would greatly increase the positive predictive value of each diagnosis made. In this regard, we would like to make it clear that, while respecting the recommendations of WHO and the Ministry of Health of Brazil for the diagnosis, all cases were confirmed by histopathological examination. Those with nonspecific inflammation (usually IND form) were carefully monitored during their treatment so that we would convince ourselves of their diagnosis.

However, the requirement that two of the three criteria must be positive *in the same patient* undeniably decreases the sensitivity for leprosy diagnosis for purposes of public leprosy control programs. Most patients have no positive SSS or peripheral nerve involvement. It is desirable that we make the diagnosis before the establishment of neural damage.

When the authors of the study "*Diagnosis and classification of leprosy*" (*Leprosy review, 2002, 73, S17-S26*) concluded that "*at least two of the traditional cardinal signs are necessary to achieve a reasonable degree of sensitivity in the diagnosis of leprosy*", they were suggesting that, ideally, in public leprosy control programs, we should list among the cardinal signs two or three criteria, and not just one. Oversimplifying the diagnostic criteria in public leprosy control programs by limiting the cardinal signs a single one (in that case, hypoesthetic skin lesions) is dangerous, because many MB patients do not present this hypoesthetic lesions, but would be easily diagnosed if other cardinal signs were added to the program's criteria: SSS and examination of peripheral nerves.

2. Page 4, last paragraph, states: "This operational classification facilitates fieldwork, since it does not require expertise in assessing skin lesion morphology or applying the slit-skin smear, but different studies indicate its flaws". Here is referred to flaws in classification, but what

about flaws in the (missed) diagnosis of leprosy in the field, especially when no skin smears are taken?

**Reply:**

In this regard, LECHAT, M. F. (2004) wrote, in the second paragraph on page 69 (document listed below), a nice historical summary of the WHO recommendations on skin slit smear (SSS):

*Thinking on the role of bacteriological examination changed gradually. The 1981 Study Group (1) still considered bacteriological examination to be “very important and highly relevant to leprosy control”, yet in November 1987, at the sixth meeting of the WHO Expert Committee, its poor quality was recognized as “the weakest link in most control programmes” (4). At its seventh meeting, 10 years later, the Expert Committee (5) stated that, while skin smears “are useful”, “since it is possible to classify leprosy without skin smear results, there is no need to establish skin smears services. Such services should not be a prerequisite for implementing MDT.” This statement ratified a de facto situation: what had been tolerance became a prescript, and the simplification doubtless facilitated the life of the leprosy field worker and contributed to wide acceptance of MDT.*

*World Health Organization. Multidrug therapy against leprosy - Development and implementation over the past 25 years, Geneva: WHO Document Production Services, 2004. Disponível em: [http://www.who.int/lep/resources/MDT\\_Full.pdf](http://www.who.int/lep/resources/MDT_Full.pdf)).*

In Brazil, the current recommendation on SSS comes in the form of a government specification. According to this, health care workers, whenever possible, should perform SSS to help classifying leprosy patients. Although the operational classification is still the recommended method, any positive SSS result, regardless its semi-quantitative logarithmic value, classifies the patient as multibacillary.

*(BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15 out. 2010. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=55&data=15/10/2010>).*

Following that specification, in our sample we performed SSS in all patients. We compared the SSS results directly to the operational classification:

		Bacilloscopy	
		Multibacillary	Paucibacillary
WHO operational classification	Multibacillary	12 (25%)	9 (18.7%)
	Paucibacillary	4 (8.3%)	23 (47.9%)
		Agreement: 72.9% Kappa: 0.43	

According to this table, the SSS classified as multibacillary 4 of 27 (14.8%) patients considered paucibacillary by the operational classification. More, the SSS classified as paucibacillary 9 of 21 (42.8%) patients considered multibacillary by the operational classification.

It is difficult to say which of the two classifications shall prevail or what the truth is. To GUPTA et al. (2012), the sensitivity for detecting MB cases is the fundamental intrinsic quality of any leprosy classification method.

*GUPTA, R.; KAR, H. K.; BHARADWAJ, M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy--a clinic-pathological study. **Leprosy Review**, v. 83, n. 4, p. 354-62, dez. 2012.*

That premise favors the addition of the SSS to the classification criteria and is supported by the results of PARDILLO et al. (2007), who studied 264 patients in the Philippines and showed that 31-58% of the cases considered multibacillary by the SSS or skin biopsy had less than six skin lesions. Similarly, CAVALCANTI et al. (2012), in a study involving the medical records of 1213 patients, showed that 11% of the patients with less than six skin lesions had positive SSS.

*CAVALCANTI, A. A. et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 616-9, out. 2012.*

*PARDILLO, F. E. et al. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 8, p. 1096-9, abr. 2007.*

Finally, one should note that the government specification in Brazil only considers the POSITIVE SSS for classification. In this way, the SSS, a simple and inexpensive laboratory test, can undoubtedly improve the sensitivity of the operational classification for the detection of multibacillary cases. Modifications made on: page 8 (2<sup>nd</sup> paragraph), page 11 (2<sup>nd</sup> paragraph), tables 2 and 3.

3. The importance of palpation of peripheral nerves (enlarged, of tender/painful) and the importance of skin smears (important for the diagnosis, and for the classification) is underestimated by the authors. Any laboratory where sputum smears for tuberculosis are examined, skin smears could be examined as well (How are the skin smears taken and stained, not decolorized to long - they have to know that decolorizing for leprosy is much shorter than for TB). On the other hand, only in exceptional cases is there a place for histopathology in a leprosy programme and there should be an experienced leprosy dermatopathologist.

**Reply:**

In the last paragraph on page 5, we strived to make clear the importance of the examination of peripheral nerves by stating: "*Patients underwent a complete dermato-neurological examination by a dermatologist with expertise in leprosy*". In addition, we could never have properly accomplished the NBAA classification (with *two* different thresholds) if we had not carefully examined the peripheral nerves of each patient included in this study. Finally, we showed the percentage of patients with one or more impaired peripheral nerves in Table 1.

In the response regarding the second issue raised by the reviewer n.1, we made it clear how important we consider the SSS. Anyway, we should add that the SSS performed in this leprosy reference center is in accordance with a national protocol specific for *M. leprae*. The Ministry of Health of Brazil recommends this protocol, jointly prepared by the teams of the National Program for Leprosy Control and the General Coordination of Public Health Laboratories. We also would like to add that the microbiologist responsible for all the SSS coloring process has been working in this reference center for 10 years.

(BRASIL. Ministério da Saúde. *Baciloscopia em hanseníase. Guia de procedimentos técnicos – serie A. normas e manuais técnicos*. Brasília, 2010. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_procedimentos\\_tecnicos\\_corticosteroides\\_hanseníase.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseníase.pdf)

When we make comparisons between the histopathological and clinical components of the Ridley and Jopling classification, we are not trying to highlight the importance of histopathology for the diagnosis *or* classification of leprosy patients in *public leprosy control programs*. The importance of our observations is within the Ridley and Jopling classification, which, as stated in the second paragraph on page 4, "is still considered essential for *leprosy research standardization*".

4. In leprosy it is the clinical classification (with skin smear results) which counts. If a patient is clinically classified as a BT patient, skin-smear negative, even if the histopathology mentions TT, the classification will stay as BT, and in case of more than 5 lesions, will be grouped as MB. However, if histopathology speaks of BL, then it is wise to reclassify as a BL. Page 8, 4th paragraph: "Of the seven cases classified as BL in biopsies, five were clinically reclassified as BT". I really do not understand this. Were these five originally classified as BL or BT? IF BT then I can understand to be reclassified as BL, not other way around. What were the skin smears results of these 5 "BT/BL patients". Remark: the place of the biopsy is important; in one place may be histopathologically a BT, but in another place BL for example!

**Reply:**

A typing mistake is compromising the correct interpretation. We gently ask to change the word "reclassified". We clinically classified these patients as BT, but, after the biopsy, we reclassified them to BL. Modifications made on: page 9 (1<sup>st</sup> paragraph).

These patients had the following bacillary indexes: 1.0 / 0.75 / 0.75 / 0.0 / 1.0.

We would like to state that we always marked the exact area for biopsy taking into account that established lesions usually carry a higher "granuloma index" on their edges.

5. Page 8, last paragraph: clinical classification was IND: how was the diagnosis made - which cardinal sign was positive? Indeed, surprisingly that the histopathological showed BT. From experience, if a lesion is indeterminate, the histopathology is often not of much help. Non-specific histopathological classification - a definitive diagnosis/classification cannot be made).  
Would non-specific inflammation not be better?

**Reply:**

“Nonspecific inflammation” will be, undoubtedly, much better. Please, we ask the reviewer to consider the changing in the text. Modifications made on: page 6 (last paragraph), page 8 (last paragraph), page 9 (2<sup>nd</sup> paragraph), page 13(2<sup>nd</sup> paragraph).

All the patients with the indeterminate form showed thermal hypoesthesia on their lesions. Some had also tactile hypoesthesia. More, we followed all patients during the treatment regimen to be sure that they would improve their skin lesions with the multidrug therapy, confirming the diagnosis.

The woman clinically classified as IND, but with a confirmatory biopsy of the BT form, showed a single hypochromic macule in the thigh with slight hypoesthesia, 10 cm in diameter, progressing for 6 months, with a negative familial history. The man had a single hypochromic macule on his forearm with slight hypoesthesia, also progressing for 6 months and positive familial history. We believe we have caught their lesions in its progression toward one of the poles of the spectrum. That evolution it thought to be part of the natural course of some patients with the IND form.

6. Page 9, first paragraph: "Five patients clinically classified as BT were reclassified as TT following the biopsy report". I really do not understand this. This is not correct in my point of view. On top of that real TT in leprosy clinic is rare.

**Reply:**

We are changing the word “reclassified” in some paragraphs of the text. We used “reclassified” for the sole purpose of indicating disagreement between the clinical and the histopathological components of the Ridley and Jopling classification. It does not indicate, in this case, that we have considered these patients as TT in the final Ridley and Jopling classification. It is not correct to consider these patients as TT, just because the biopsy has indicated this way. These cases are evidence that we should not always prioritize the biopsy over the clinical classification. The Ridley and Jopling classification is more than a histopathological characterization of leprosy cases. Modifications made on: page 5 (2<sup>nd</sup> paragraph), page 9 (3<sup>rd</sup> paragraph), page 12 (last paragraph).

7. Page 9, last paragraph: "It dispenses the need for SSS or skin biopsy facilities". How can this conclusion be drawn, based on what? Regarding histopathology I agree, regarding skin smears I disagree. On top of that skin smears taken from more sites and more lesions. Again a mix up diagnosis and classification. Positive skin smear is one of the cardinal signs for the diagnosis of leprosy (although WHO seems to disregard the importance of skin smears nowadays). Too often early lepromatous patients, without enlarged nerves and without loss of sensation in the lesions, are wrongly told that they did not suffer from leprosy. How tragic, the most infectious cases are not diagnosed in time because of such statements as "it dispenses the need for SSS facilities"!

**Reply:**

We could not agree more with the reviewer on this and we have detailed our reasons in the response to the second issue. However, what we wanted to show with the phrase “*It dispenses the need for SSS or skin biopsy facilities*” was that the operational classification is eminently clinical. We agree that the phrase does not translate exactly our point of view and ask the reviewer to consider not only its exclusion, but also the inclusion of the data related to the SSS between our results and the discussion. Modifications made on: page 10 (3<sup>rd</sup> paragraph).

8. Page 10, second paragraph: "the need for neurological examination makes it more difficult to apply the NBAA method outside leprosy referral services". In Brazil, at all levels palpation of peripheral nerves is taught during leprosy training courses. Neurological examination is essential for the diagnosis and follow-up of patients, and be applied by the leprosy trained health worker at health centre level, especially in leprosy endemic areas. The great scourge of leprosy is the neuritis and disability.

**Reply:**

When we wrote this, we were thinking in more remote regions of others countries, not specifically in our case, in Brazil. In fact, this referral center offers two annual training sessions open to all public basic health care units in the State of Minas Gerais. These training sessions give special attention to the neurological examination of peripheral nerves aiming not only the diagnosis but also the monitoring/prevention of neurological disabilities during the course of the disease.

Nonetheless, we can improve that phrase. We ask the reviewer to consider the changing to "performing the NBAA classification requires training in neurological examination of peripheral nerves." Modifications made on: page 10 (last paragraph).

9. Page 11, second paragraph: "The distinction between these forms (BT and BL) is often difficult from a clinical point of view". I cannot disagree more with this statement. Both clinically (and histopathologically), for experienced leprologists (and pathologists), in 90% of cases the differentiation between BT and BL should be no great problem.

**Reply:**

The authors misused the word "often". We would like to change the phrase to "sometimes, the distinction between these forms (BT and BL) can be difficult from a clinical point of view". Modifications made on: page 12 (2<sup>nd</sup> paragraph).

We do not really consider it a big problem to differentiate these forms in our daily clinical practice. However, somehow, in this sample, there was more trouble. Maybe, as the reference center receives more patients with greater diagnostic difficulty, we have had a biased sample with patients with less typical clinical presentation. However, other authors have reported similar difficulties. LOCKWOOD et al. (2012) studied 303 cases of multibacillary leprosy and reported that 41% of patients with a clinical DT diagnosis received a different histopathological diagnosis. The histopathological examination reclassified almost a third of these discordant cases as DV (LOCKWOOD et al., 2012).

That last citation was one of the ten (Pubmed / NCBI) interesting studies carried within the INFIR cohort. That research group included leprologists and experienced pathologists and their results currently serves as references on leprosy reactions / neuropathy predictors. Their first work, in 2005, classified patients based on the histopathological criteria of the Ridley and Jopling classification. Their last work, in 2012, took into account the clinical criteria of the Ridley and Jopling classification to evaluate the concordance between the clinical and pathological components of the classification. That shows how much the nuances of the leprosy classification methods are still on top of our concerns.



10. Page 12, second paragraph: it would be interesting if a picture could be shown of a typical BB lesion of one of the three BB patients mentioned.

**Reply:**

We made those pen markings below to facilitate the quantitative thermal sensory test, necessary for research purposes in other of ours studies. The top mark is an area without damage (the red color is due to the pressure exerted by the thermo-sensory analyzer). The lower mark points one of the lesions. We did not make the marks for biopsy. We took the biopsy from the erythematous edge of one of the lesions.



FIG. 5. **BB.** Note the medium size of the lesions, their vague outer edges and punched-out centers.

The photograph does not allow us to have exactly the same impression that the live clinical examination. Nonetheless, one can see the similarity between the two images and the description used by Ridley and Jopling: “(...) *These lesions are either irregularly shaped erythematous plaques with vague outer edges and oval hypopigmented center that looks as if it had been punched out (Fig.5), or (...)*”

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 34, n. 3, p. 255-73, jul. 1966. <http://ila.iisl.br/pdfs/v34n3a03.pdf>

11. Table 1, page 17: what is meant by "impaired nerves"? Enlarged nerves? Table 2, page 18: for my interest - how has these sensitivities and specificities been calculated? I have problems taking the WOC as the golden standard!

**Reply:**

In Table 1 “impaired nerves” means thickened or painful peripheral nerves or sensory/motor functional impairment in their area of innervation. We ask the reviewer to consider the appropriate complement made to the table legend. Modifications made on: table 1.

In the legend of Table 2, we explained that we have calculated the sensitivity and specificity in comparison to the final Ridley and Jopling classification. In fact, it seemed more appropriate, since the final Ridley and Jopling classification considered the clinical, histopathological and bacteriological impressions of each patient.

***Reviewer 02***

1. The authors states that the sensitivity and specificity were measured according to the final Ridley-Jopling classification. What does it mean? Where it is shown? Did the authors considered clinical, histopathological, bacillary index and lepromin test data? Please explain it. Please present the final R-J classification.

**Reply:**

The final Ridley and Jopling classification included the clinical presentation, the histopathological findings and the SSS results. We did not perform the Mitsuda test. We ask the reviewer to consider the inclusion of this information in the methods section as well as the incidence of the different forms according to the final classification in the results section. Modifications made on: page 7 (1<sup>st</sup> paragraph), page 7 (2<sup>nd</sup> paragraph).

2. In order to verify the agreement between these classifications, 49 patients seems a very low sample size. Did the authors perform any sample size calculation? Unfortunately, a low sample size may compromise several interpretations. This should be discussed.

**Reply:**

The sample was small due to its convenience character (as explained in the answer to the first question of the reviewer n.1). Studies with small samples should prompt further research, preferably international multicenter studies and we ask the reviewer to consider the inclusion of this statement in the discussion section. Modifications made on: page 9 (last paragraph).

Even so, they are important in order to keep the debate on leprosy classifications on focus. We should reinforce that our sample was representative enough to express agreement with the results of other authors, especially in relation to the agreement in the Ridley and Jopling classification (**please, see table below**). Our work has the distinction of having been held in a different country than those listed in the table below. More, we had tried to explain the reasons for the disagreement in the Ridley and

Jopling classification by pointing some of its *histopathological key to classification* (RIDLEY, 1974) imprecise aspects, especially regarding the absence of the DD form and the TT x DT disagreement.

KAUR (1993)	60	INDIA	44-68%
MANANDHAR (2013)	75	NEPAL	45,3%
RIDLEY (1966)	82	INDIA	68,3%
SEHGAL (1980)	82	INDIA	42,6%
MATHUR (2011)	156	NEPAL	80,4%
SHARMA (2008)	270	INDIA	53,3%
LOCKWOOD (2012)	303	INDIA	54,2-68,6%
MOORTHY (2001)	372	INDIA	62,6%
BHATIA (1993)	1272	INDIA	69%

RIDLEY, D. S. histological classification and immunological spectrum of leprosy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 5, p. 451-465, [1974].

3. Operational classification has lower MB sensitivity than Madrid, NBAA two and NBAA three. Therefore how "operational method shows better performance than the other clinical classifications"? According to this study, operational classification may leave many of MB cases undertreated. This should be discussed as a negative point for using the operational classification. In fact I think that the authors should highlight that we need more accurate classification methods to avoid misclassifications. It should also be verified in the subjects of this study if the use of the bacillary index (a cheap lab exam) could improve the operational classification. This should be also discussed. We should keep in mind that leprosy is a complex disease and patients deserve a better standard of care, which includes a more reliable classification and treatment.

**Reply:**

When we wrote better performance, we wanted to refer to the best kappa value and to a greater agreement value. We could not write those values in parentheses right after that phrase because it is part of the highlight section and the number of characters is limited. By using the kappa value, we will be associating the *best performance* to the *better agreement* with the final Ridley and Jopling classification. We will be taking into account not only the sensitivity but also the specificity of the operational classification, compared to Madrid and NBAA (considering the Ridley and Jopling classification as the gold standard). We would like to refer to the last paragraph of page 7 and to the third paragraph of page 10, where we made it clear that the agreement value was the one taken into account.

We cannot agree more with the reviewer about the fact that patients deserve better and it includes more precise classification methods and better treatment options. We will try to improve our message widening our results and discussion sections to include a comparison of the SSS and the operational classification (as we explained in the answer to the *issue n.2* raised by the *reviewer n.1*). Modifications made on: page 8 (2<sup>nd</sup> paragraph), page 11 (2<sup>nd</sup> paragraph), tables 2 and 3, page 14 (1<sup>st</sup> paragraph).

**Reviewer #3**

Rodrigues Junior and collaborators report on the comparisons between the available clinical and pathological classifications for leprosy. It is a contributive report, yet too numerous abbreviations are complicating reading. I just have a few minor remarks.

1- Abstract: Explicit BL/TT abbreviations.

**Reply:**

We completely agree with the reviewer.

Modifications made on: abstracts (page 2).

2- Page 5, line 3: The abbreviation could be presented when this classification is first cited, on page 4. Moreover, if the authors want to use it, they have to do so consistently, for example (page 6 – line 6).

**Reply:**

Again, we completely agree with the reviewer.

Modifications made on: page 4 (2<sup>nd</sup> paragraph), page 5 (line 3), page 5 (3<sup>rd</sup> paragraph), page 6 (2<sup>nd</sup> paragraph), page 7 (1<sup>st</sup> paragraph).

3- Page 7: Were the 16 SSS-positive patients.

**Reply:**

We believe that we should have discussed better de SSS results. We ask the reviewer to consider the inclusion of it in the results and discussion sections (as also demanded by reviewers 1 and 2).

Modifications made on: page 8 (2<sup>rd</sup> paragraph), page 11 (2<sup>nd</sup> paragraph), tables 2 and 3.

### 9.3. APROVAÇÃO COEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Minas Gerais

**PROJETO DE PESQUISA**

---

**Título:** A biologia e os mecanismos da lesão de nervos amielínicos na hanseníase: estudo prospectivo e retrospectivo de biópsias de pele de pacientes com diagnóstico confirmado.

**Área Temática:**

**Pesquisador:** ROSA MARIA ESTEVES ARANTES **Versão:** 1

**Instituição:** Faculdade de Medicina da UFMG **CAAE:** 05560412.1.0000.5149

**PARECER DO COLEGIADO**

---

**Número do Parecer:** 71309

**Data da Relatoria:** 22/08/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo transversal (projeto de doutorado) com uma casuística de 30 pacientes com idade superior a 7 anos, com diagnóstico de hanseníase, em fases iniciais de evolução, ainda sem tratamento. Serão selecionados pacientes com lesões de pelo menos 30 mm de diâmetro, para possibilitar uma área de estimulação térmica adequada ao teste eletrônico. Os pacientes serão submetidos ao teste de estimulação térmica e à biópsia. Depois serão acompanhados para controle e tratamento de eventuais complicações. Há critérios de exclusão e análise estatística. O custo do projeto é colocado como "ver no projeto de doutorado em anexo".

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos primários são:

a) Descrever o espectro de alterações estruturais, ultraestruturais e fenotípicas (marcadores de citoesqueleto dos nervos, receptores de fator de crescimento nervoso, canais iônicos, células de Schwann) dos elementos nervosos de interesse (fibras, terminações nervosas livres e estruturas sensitivas) caracterizando os fenômenos biológicos degenerativos dos nervos na hanseníase. b) Correlacionar os aspectos acima com limiares de detecção de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil das lesões, forma clínica da doença e classificação histopatológica. c) Propor uma sequência de eventos estruturais e patogênicos bem documentada para definir elementos que sejam potenciais alvos de intervenção terapêutica na doença. Há objetivos secundários, entre eles o estudo do perfil de citocinas nos fragmentos de biópsia das lesões.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são devidos à biópsia, como dor, alteração na cicatrização e um baixo risco de infecção. Os pacientes serão acompanhados pela dermatologia para avaliar a evolução e tratar possíveis complicações. Os benefícios é a possibilidade de estabelecimento da imuno-histoquímica das fibras nervosas como elemento diagnóstico e prognóstico em hanseníase, contribuindo para a importância do teste de sensibilidade térmica. O estudo das outras variáveis como ultraestrutura e citocinas ampliará o conhecimento científico sobre a patogênese da lesão neural em hanseníase.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem o mérito de analisar o processo patológico da lesão neural da hanseníase e verificar o valor do teste de imuno-histoquímica como elemento diagnóstico e prognóstico. Por meio da leitura inclusive do TCLE, há o entendimento da metodologia, porém no item dedicado a ela está escrito "Favor acessar o documento completo do projeto de doutorado em anexo". Não foi anexado este documento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Há o termo de compromisso assinado pelos dois pesquisadores; o termo de anuência do Hospital Eduardo de Menezes, o parecer consubstanciado do Coordenador do programa de pós-graduação em patologia, com assinatura do Chefe do Departamento de Patologia Geral, e a folha de rosto com as assinaturas dos responsáveis. O TCLE está em linguagem adequada, com explicação clara dos procedimentos, seus riscos e benefícios, garantindo o direito dos pacientes. Há TCLE para pacientes entre 7 e 12 anos de idade (assinatura dos pais ou responsáveis); há outro TCLE para pacientes entre 13 e 17 anos de idade (com assinatura do paciente) e outro TCLE para a assinatura dos responsáveis pelos pacientes adolescentes.

**Recomendações:**

Anexar o documento que é referido (projeto de doutorado).

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Como se faz referência ao projeto de doutorado (quanto ao acesso mais amplo à metodologia, custos), o mesmo deve ser anexado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

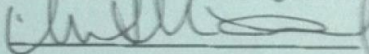
**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.



BELO HORIZONTE, 10 de Agosto de 2012



Assinado por:

Maria Tereza Marques Amaral

## 9.4. FOLHA DE APROVAÇÃO

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA	
---	---	---

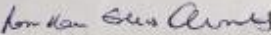
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

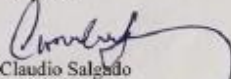
**IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS E MACRÓFAGOS DE LESÕES DE PELE DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE HANSENIASE SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING**

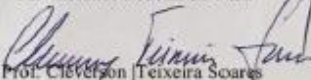
**ISMAEL ALVES RODRIGUES JÚNIOR**

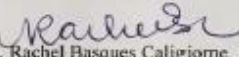
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

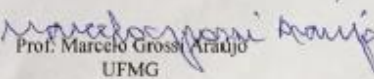
Aprovada em 11 de março de 2016, pela banca constituída pelos membros:

  
 Prof. Rosa Maria Esteves Arantes - Orientador  
 UFMG

  
 Prof. Claudio Salgado  
 Universidade Federal do Pará

  
 Prof. Cleverton Teixeira Soares  
 Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru

  
 Prof. Rachel Busques Caligiorme  
 Hospital Santa Casa de Misericórdia BH

  
 Prof. Marcelo Grossi Araújo  
 UFMG

Belo Horizonte, 11 de março de 2016.