

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KARINA DE SOUSA PAULA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES CUTÂNEAS E
PELE CONTRALATERAL EM NOVOS CASOS DE HANSENÍASE**

Belo Horizonte

2016

KARINA DE SOUSA PAULA

CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES CUTÂNEAS E
PELE CONTRALATERAL EM NOVOS CASOS DE HANSENÍASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio Rocha

Coorientadores: Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Dra. Ana Thereza Chaves

Belo Horizonte

2016

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Reitor: **Prof. Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitora de Pós-Graduação: **Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitora de Pesquisa: **Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Dr. Humberto José Alves**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco**

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo**

Chefe do Departamento de Clínica Médica: **Profa. Dra. Valéria Maria Augusto**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho**

Sub-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro**

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical:

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Profa. Dra. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr

Pollyana Anício Magalhães Gontijo – Representante Discente

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da caridade. A toda a minha família por serem os alicerces da minha vida, em especial minha mãe e meu pai, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha por me aceitar como sua orientanda de forma tão acolhedora e disponível e pelo exemplo de ser um médico pesquisador tão dedicado. Sua contribuição com raciocínio brilhante que me fez enxergar novos horizontes.

Ao Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier por ter confiado no meu trabalho, por todas as oportunidades concedidas e, principalmente pelo apoio e ensinamentos, sua dedicação contagia todos os seus alunos.

À Dr^a Ana Thereza Chaves, por sua amizade, confiança, dedicação, ensinamentos e por ter sido a grande impulsionadora desta conquista, abrindo portas muito importantes. Muito obrigada!

À Dr^a Sandra Lyon pelo acolhimento e por ter aberto as portas do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes. Obrigado por confiar nesse estudo e por compartilhar seu enorme conhecimento e verdadeiro amor á luta pela eliminação e controle da hanseníase.

Aos pacientes portadores da hanseníase, pois sem sua participação voluntária não seria possível à realização desse estudo.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Hanseníase Fábio, Atvaldo, Maria Júlia, Edilamar e Ana Laura, pela ajuda, cooperação e apoio. Vocês foram fundamentais nessa conquista.

Ao Laboratório de Patologia Molecular, Fernanda obrigada pelas dicas e ajuda nos experimentos e Vitor pela disponibilidade e atenção.

A toda equipe do HEM, em especial a equipe de enfermagem e médicas residentes, que muito contribuíram para a consolidação desse trabalho.

A todos meus amigos, obrigada pelo carinho, apoio, amizade e pelas alegrias compartilhadas.

Aos órgãos de financiamento, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - CBB- APQ-02332-13 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – nº: 485891/2013-1 pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A hanseníase ainda é uma doença negligenciada no Brasil. Em 2014 foram notificados 24.612 casos novos. A doença possui uma grande variedade de manifestações clínicas e histopatológicas que estão associadas com a resposta imune do hospedeiro. Os aspectos histo e imunopatológicos dessa resposta na lesão cutânea são bem conhecidos. Entretanto, são desconhecidas as características da pele não lesionada, aparentemente indene. Diante dessa lacuna no conhecimento, realizamos um estudo observacional, transversal e comparativo dos aspectos imuno-histopatológicos de biópsias cutâneas da lesão e da pele contralateral, por meio dos métodos HE e imuno-histoquímica. Foram avaliadas características do infiltrado inflamatório e o padrão de expressão de Foxp3 e das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-12. Os testes estatísticos Qui-quadrado, Teste *t* e Mann-Whitney foram realizados nesse estudo e analisados no software MINITAB 17. Na análise histopatológica, foram evidenciados focos perivascularres de infiltrado inflamatório na pele lesionada com maior celularidade que na pele contralateral. Na análise imuno-histoquímica, a expressão dos biomarcadores de interesse não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre a pele lesionada e pele contralateral indene. Assim, os resultados sugerem que a resposta imune cutânea contra a hanseníase parece ser ativa tanto nas áreas lesionadas quanto nas áreas contralaterais aparentemente indenadas.

Palavras-chave: Hanseníase; citocinas e histopatologia.

ABSTRAT

Leprosy is a neglected disease in Brazil. In 2014, were reported 24,612 new cases. The disease has different clinical and histopathological manifestations that are associated with host immune responses. Pathological features are well known in skin lesions. However, they are unknown in the uninjured skin. Given this gap in knowledge, we conducted an observational and cross-sectional comparison of immunohistopathological aspects of lesions and contralateral skin, through HE and immunohistochemical methods. Inflammatory infiltrate characteristics and Foxp3, IFN- γ , IL-10, IL-17 and IL-12 expression were evaluated. Statistical tests (Chi-square, T Test and Mann-Whitney) were performed and analyzed in MINITAB 17 software. In histopathology, perivascular inflammatory infiltration were evidenced both in damaged and normal skin, with greater cellularity in the first. In immunohistochemistry analysis, the normal and injured skin exhibit predominantly similar phenotypes in biomarkers. Thus, the results suggest that cutaneous immune response against leprosy appears to be active in both the lesion and in apparently harmless skin.

Keywords: Leprosy; cytokines and histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no mundo em 2015.	21
FIGURA 2- Populações celulares da pele.	30
FIGURA 3- Regulação imune dérmica na hanseníase.	32
FIGURA 4- Delineamento e estratégias do estudo.....	38
FIGURA 5- Procedimento para realização de biópsia.	40
FIGURA 6- Classificação dos casos novos de hanseníase, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2014 e 2015 (n =26).	48
FIGURA 7- Relação entre diagnóstico clínico e índice baciloscópico.	49
FIGURA 8- Relação entre diagnóstico clínico e o ML Flow.	50
FIGURA 9- Relação entre IB e ML FLOW	51
FIGURA 10- Classificação dos casos baseada no diagnóstico histopatológico.....	52
FIGURA 11- Infiltrado inflamatório dérmico de casos MHT.....	54
FIGURA 12- Infiltrado inflamatório dérmico de casos MHDD.	55
FIGURA 13- Infiltrado inflamatório dérmico de casos MHV.	55
FIGURA 14- Intensidade da expressão de Foxp3 no infiltrado inflamatório do subgrupo MHT.	62
FIGURA 15- Expressões de IL-17 no infiltrado inflamatório e Foxp3 e da citocina IFN γ no epitélio em amostras do subgrupo MHV.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais do estudo.	42
TABELA 2- Variáveis histopatológicas do estudo.....	42
TABELA 3 - Variáveis imuno-histoquímicas do estudo.....	43
TABELA 4- Análise descritiva da população do estudo.....	47

TABELA 5- Índice Baciloscópico dos casos novos de hanseníase do estudo.	49
TABELA 6- Semi-quantificação da Reatividade Específica do Antígeno.	56
TABELA 7- Imuno-histoquímica do biomarcador Fox-P3 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.	57
TABELA 8- Imuno-histoquímica da citocina IL-10 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.	58
TABELA 9- Imuno-histoquímica do biomarcador IFN- γ nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.	59
TABELA 10- Imuno-histoquímica da citocina IL-12 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.	60
TABELA 11- Imuno-histoquímica da citocina IL-17 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Escala para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica.	44
QUADRO 2 - Escores de intensidade e distribuição das reações de IHQ.	44
QUADRO 3- Valores estimados de p das alterações histopatológicas nas formas clínicas da hanseníase.	54
QUADRO 4- Escores de intensidade e distribuição das reações de IHQ.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
CEAP	Centro Especializado em Anatomia Patológica
CD	Células dendríticas
Foxp3	Fator de transcrição
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
HE	Hematoxilina e Eosina
IB	Índice baciloscópico
IFNs	Interferons
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IMC	Imunidade mediada por células
LPS	lipopolissacarídeo
MB	Multibacilar
MH	Mal de Hansen ou Moléstia de Hansen
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHDD	Hanseníase dimorfa-dimorfa
MHDT	Hanseníase dimorfa-tuberculóide
MHDV	Hanseníase dimorfa-virchowiana
MHI	Hanseníase indeterminada

MHT	Hanseníase tuberculóide
MHV	Hanseníase virchowiana
ML Flow	Teste do Fluxo Lateral para o <i>Mycobacterium leprae</i>
MS	Ministério da Saúde
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	N-acetilmurâmico
NK	Natural <i>Killer</i> - “exterminadoras naturais”
NKT	Natural <i>killer</i> T
NLRs	Receptores do tipo NOD
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar
PGL-1	Glicolípido fenólico-I
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptores de células T
Th1	T <i>helper</i> 1 células T auxiliares do subtipo 1
Th2	T <i>helper</i> 2
Th17	T <i>helper</i> 17
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
T_{REG}	Células T reguladoras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
2 INTRODUÇÃO	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Conceitos da hanseníase	18
3.2 Agente etiológico.....	18
3.3 Epidemiologia da Hanseníase.....	20
3.4 Classificações da hanseníase	21
3.5 Formas clínicas e histopatológicas da hanseníase	23
3.6 Reações Hansênicas.....	26
3.7 Diagnóstico.....	27
3.8 Regulação imune dérmica	28
3.9 Regulação imune na hanseníase	30
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Delineamento e estratégias do estudo.....	38
5.2 Critérios de seleção dos pacientes	39
5.2.1 Critérios de inclusão	39
5.2.2 Critérios de exclusão	39
5.3 Coleta e preservação das amostras de biópsia de pele.....	39
5.4 Hematoxilina e eosina (HE)	40
5.5 Imuno-histoquímica (IHQ)	41
5.6 Variáveis do estudo	42

5.7 Análises estatísticas	43
5.8 Aspectos éticos	45
5.9 Pesquisa Bibliográfica	45
6 RESULTADOS	47
6.1 Descrições dos resultados demográficos, laboratoriais e clínicos.	47
6.1.1 Classificação dos casos.....	47
6.1.2 Índice Baciloscópico (IB)	48
6.1.3 ML Flow	50
6.1.4 Relação IB e ML FLOW	50
6.2 Descrição e comparação dos resultados histopatológicos	51
6.3 Descrição e comparação dos resultados imuno-histoquímicos	56
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES.....	71
9 REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	79

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O projeto intitulado “Caracterização histo-imunopatológica das lesões cutâneas e pele contralateral em casos novos de hanseníase” foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa Epidemiologia e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias e está inserido no grupo de pesquisa Hanseníase, que desenvolve trabalhos na grande área do conhecimento das ciências biológicas e da saúde, como imunologia da hanseníase.

Os pacientes incluídos no estudo foram atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, onde foram realizados o diagnóstico e a classificação clínica inicial. A classificação histopatológica foi posteriormente confirmada pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Durante o desenvolvimento do estudo, a discente Karina de Sousa Paula participou de todas as etapas: seleção dos pacientes, acompanhamento das biópsias, realização do teste de ML Flow, imuno-histoquímica e análises das lâminas e dados.

A presente dissertação teve como objetivo apresentar os resultados obtidos durante o mestrado, na qual foi avaliada a resposta imune dérmica em biópsias com lesão e sem lesão cutânea de pacientes hansenianos. Para tanto, foram avaliadas as características histológicas e o padrão imuno-histoquímico de Foxp3 e das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 e IL-17 por cada forma clínica.

A dissertação foi estruturada em sete partes principais: i) Introdução ii) Revisão da literatura; iii) Objetivos; iv) Métodos; v) Resultados, vi) Discussão; vii) Anexos, contendo artigo derivado da dissertação parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2 INTRODUÇÃO

2 INTRODUÇÃO

A hanseníase, ou mal de Hansen (MH), é uma doença infectocontagiosa de evolução lenta, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, que se manifesta por danos na pele e nervos periféricos (RIDLEY; JOPLING, 1966; MIRANDA *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2013).

A doença ainda é um grande problema de saúde em vários países em desenvolvimento, devido ao surgimento de casos novos todos os anos (SILVA *et al.*, 2013). Somente no Brasil, em 2014, foram notificados 24.612 casos novos, sendo 1.187 casos em Minas Gerais (WHO, 2014).

A hanseníase é caracterizada por apresentações clínicas, patológicas e imunológicas distintas, sendo essencial seu estudo imunopatológico para compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença (RIDLEY; JOPLING, 1966). Essa diversidade se associa à capacidade do hospedeiro de desenvolver diferentes respostas imunológicas frente ao *M. leprae*, particularmente na pele e nervos periféricos, devido ao tropismo por macrófagos dérmicos e células de Schwann (SCOLLARD *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2013; RICHMOND; HARRIS, 2014).

Um dos principais sinais da doença são lesões cutâneas com alterações de sensibilidade (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Consequentemente, biópsias de lesões cutâneas são usadas para o diagnóstico histológico da doença, a partir de análises de características clínicas da doença. A pele representa um ambiente ideal para se estudar as respostas imunes inatas e adaptativas às lesões locais e sistêmicas desencadeadas pelo *M. leprae*. Um crescente número de trabalhos sustenta, de um lado, a importância das funções imunológicas essenciais da pele, tanto durante a homeostase do tecido quanto em condições patológicas, e, de outro, o potente papel das citocinas na resposta imunológica do microambiente dérmico (NESTLE *et al.*, 2009).

Considerando que a resposta imune do hospedeiro é fundamental para a determinação da evolução das lesões, da complexidade das manifestações clínicas e da dificuldade para se estabelecer critérios para o diagnóstico correto e precoce da doença, este estudo objetivou caracterizar o padrão imuno-histopatológico nas lesões cutâneas e da pele contralateral, sem lesão aparente, em casos novos de hanseníase, dando ênfase aos aspectos imunológicos.

Existe uma grande lacuna na literatura no que diz respeito à resposta imune dérmica na pele considerada normal ou sem lesão cutânea clinicamente evidente, no paciente hanseniano. Após buscas em diversos sites de pesquisas não foram encontrados trabalhos que avaliassem a resposta imunológica na pele normal de pacientes hansenianos.

Então, diante do problema apresentado e considerando-se tanto a história natural da infecção pelo *M. leprae* quanto à resposta imune sistêmica desencadeada, a seguinte hipótese foi formulada: existe resposta imune dérmica na pele considerada normal, que se assemelha à resposta imune dérmica da lesão cutânea do paciente hanseniano.

Dentro deste contexto, o presente estudo avaliou a expressão imuno-histoquímica de Foxp3 e das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 e IL-17 em biópsias de pele, com o intuito de investigar, ainda que preliminarmente, esses biomarcadores nas biópsias contralaterais nas diferentes formas clínicas da hanseníase e correlacioná-los com alterações histológicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Conceitos da hanseníase

A hanseníase, ou mal de Hansen (MH), é uma doença crônica, granulomatosa, causada pelo bacilo *M. leprae*, um patógeno intracelular obrigatório (SHEPARD, 1962; SCOLLARD *et al.*, 2006; KOWALSKA; KOWALIK, 2012). O *M. leprae* tem tropismo por macrófagos da pele e pelas células de Schwann dos nervos periféricos. A doença tem grande potencial de causar danos em diversos órgãos e sistemas do corpo humano, podendo se manifestar de forma sistêmica (LOWY; RIDLEY, 1954; MIRANDA *et al.*, 2012; TELES *et al.*, 2013).

A hanseníase tem alto poder de causar incapacidades físicas decorrentes, principalmente, da resposta inflamatória crônica e granulomatosa. Essas deficiências podem dar origem a limitações de atividades que envolvem o uso das mãos, pés e olhos e restrições na participação social (VAN BRAKEL *et al.*, 2012).

3.2 Agente etiológico

A primeira descrição do *M. leprae* foi feita em 1873, pelo bacteriologista e dermatologista norueguês Gerhard Armauer Hansen (HANSEN, 1874; LOWY; RIDLEY, 1954). O *M. leprae* pertence à ordem taxonômica dos *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, sendo seu genoma totalmente sequenciado por Stewart Thomas Cole, em 2001 (SCOLLARD *et al.*, 2006; KOWALSKA; KOWALIK, 2012). Trata-se de um bastonete reto ou ligeiramente curvo, que mede de 18 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro, e que, como as outras micobactérias, se replica por fissão binária (GULIA; FRIED; MASSONE, 2010; EICHELMANN *et al.*, 2013). Essa replicação é extremamente lenta, levando em média 14 dias, o que favorece um período de incubação longo, que pode variar de três a 10 anos (KOWALSKA; KOWALIK, 2012; BHAT; PRAKASH, 2012). O bacilo é Gram-positivo e fortemente álcool-ácido resistente, quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen, característica que o define como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). O bacilo não é cultivável em meios de cultura artificiais, mas camundongos timentomizados e irradiados são utilizados para seu estudo e reprodução (SHEPARD, 1962; KIRCHHEIMER; STORRS, 1971; TALHARI; TALHARI; PENA, 2015). Pesquisas recentes baseadas na resposta imune

tanto humoral quanto celular na hanseníase têm indicado vários antígenos, proteínas recombinantes e peptídeos, com potencial aplicação diagnóstica. Embora o número de proteínas recombinantes do *M. leprae* testadas esteja aumentando, há uma longa lista de candidatos a ser avaliada, antes de se escolher o antígeno mais eficiente (STEFANI; 2008; SILVESTRE; LIMA, 2016).

A parede celular do bacilo é composta por cadeias alternadas de peptídicos N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) ligados por pontes cruzadas que estão ligadas à camada de galactano por arabinogalactano. O lipídio dominante na parede celular do *M. leprae*, que confere especificidade imunológica, é o glicolípido fenólico-I (PGL-1). Estudos recentes sugerem que o PGL-1 esteja envolvido na interação do *M. leprae* com a laminina das células de Schwann, sugerindo um papel para as interações entre PGL-1 do bacilo e nervos periféricos (NG *et al.*, 2000; SCOLLARD *et al.*, 2006; STEFANI; 2008; ITO; OHTA, 2015).

Em esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, é possível observar os bacilos isolados em agrupamentos diversificados ou em disposições especiais, denominados globias, que derivam da sólida união de bacilos por meio de uma substância chamada gléia (REES, 1985; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). O *M. leprae* é propenso a infectar áreas frias do corpo, como a pele, mucosa nasal e os nervos periféricos (especialmente os superficiais), pois cresce melhor em temperaturas entre 27°C e 30°C (SHEPARD, 1965; GULIA; FRIED; MASSONE, 2010; EICHELMANN *et al.*, 2013).

Fatores genéticos humanos podem influenciar a aquisição e evolução clínica da hanseníase. Evidências acumuladas de diversos estudos indicam claramente que a exposição ao *M. leprae* é necessária, mas não suficiente, para levar à doença, sendo que vários genes e regiões genômicas já foram relacionados como participantes do complexo mecanismo genético relacionado com a susceptibilidade do hospedeiro à doença (GULIA; FRIED; MASSONE, 2010; BHAT; PRAKASH, 2012).

Embora ainda não exista completo conhecimento sobre o modo de transmissão da hanseníase, a hipótese mais aceita é que a transmissão se dê através das vias aéreas superiores de pessoa a pessoa, pelo contato prolongando entre doentes bacilíferos não tratados e pessoas susceptíveis (WALKER; LOCKWOOD, 2006; BHAT; PRAKASH, 2012; SILVA *et al.* 2013).

3.3 Epidemiologia da Hanseníase

Desde a introdução da poliquimioterapia (PQT), há cerca de três décadas, a prevalência de hanseníase no mundo, a qual passou a ser considerada uma doença com passível de ser tratada no âmbito da atenção primária à saúde (OMS, 2016).

Várias estratégias foram instituídas para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, enfatizando-se a diminuição do número de novos casos com grau de incapacidade 2, e buscando promover a detecção precoce e a redução da transmissão da doença (OMS, 2016).

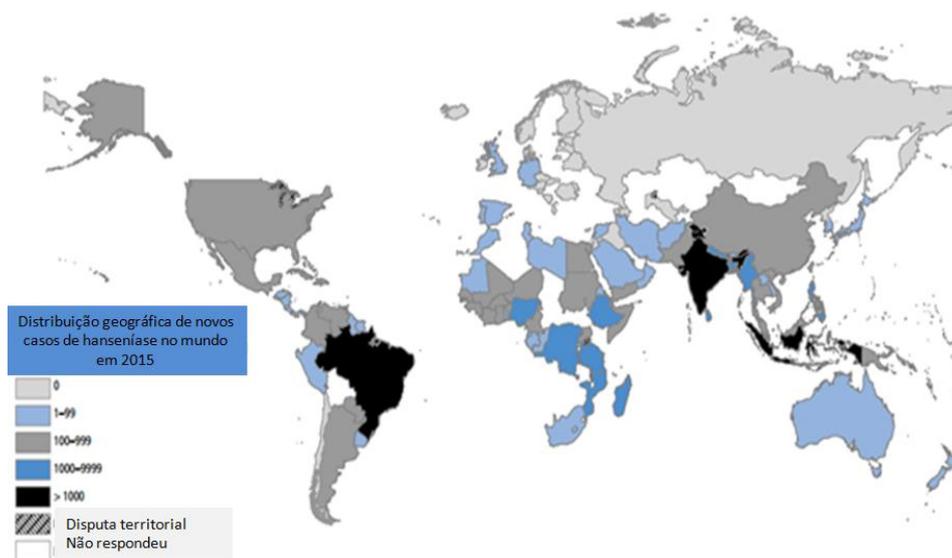
A eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (ou seja, prevalência registrada abaixo de 1 por 10.000 habitantes) foi alcançada, em 2000, em escala mundial, e, até 2005, na maioria dos países (OMS, 2016).

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 138 países de todas as regiões da OMS, a prevalência global registrada no final de 2015 foi de 176.176 casos (0,2 casos por 10.000 pessoas). O número de novos casos notificados no mundo, em 2015, foi de 211.973 (2,9 novos casos por 100.000 pessoas) (OMS, 2016).

As estatísticas globais mostram que 199.992 novos casos de hanseníase correspondentes a 94% do total, foram notificados em 14 países sendo que três deles, com grandes populações - Índia, Brasil e Indonésia - notificam mais de 10.000 novos pacientes anualmente. Juntos, esses três países representam 81% dos pacientes recém-diagnosticados e notificados no mundo (OMS, 2016).

A Figura ilustra a distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no mundo em 2015 (OMS, 2015).

FIGURA 1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no mundo em 2015.



Fonte: OMS, 2015.

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, em 2015, o coeficiente de detecção (por 100.000 habitantes) de novos casos no país foi de 14,07 e a prevalência pontual da doença (por 10.000 habitantes) de 1,01. Esses dados representam, em números absolutos, 28.761 casos novos diagnosticados em 2015 (Brasil, 2015a).

Nos últimos cinco anos houve apenas um pequeno declínio da detecção de novos casos de hanseníase no mundo, enquanto a taxa de grau de incapacidade 2 se manteve quase inalterada (OMS, 2016).

3.4 Classificações da hanseníase

A hanseníase é uma doença espectral cujas manifestações clínicas decorrem de complexa resposta imunológica do hospedeiro à infecção e, dependendo do tipo de linfócitos ativados, apresenta um espectro imunológico, clínico e histológico característico (RIDLEY; JOPLING, 1966; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; NATH; SAINI; VALLURI, 2014). Com o intuito de aperfeiçoar o manejo clínico dos pacientes hansenianos, foram propostas diversas classificações ao longo dos anos (RIDLEY; JOPLING, 1966; WHO, 1982; LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007).

Inicialmente, a Classificação de Madri foi estabelecida no Congresso Internacional de Hanseníase, realizado em Madrid, em 1953, baseada nas características clínicas e no

resultado de baciloscopia, dividindo-se a hanseníase em dois polos estáveis e opostos (virchowiano e tuberculóide) e dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo); (LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a; TALHARI; TALHARI; PENA, 2015).

Em seguida, a classificação de Ridley e Jopling, de 1966, baseando-se em critérios clínicos, histológicos, bacteriológicos e imunológicos, dividiu a hanseníase em cinco formas: formas polares, clinicamente estáveis - tuberculóide (MHT) e virchowiana (MHV) - e formas limítrofes – dimorfa tuberculóide (MHDT), dimorfa-virchowiana (MHDV) e dimorfa-dimorfa (MHDD). Os autores ressaltaram a instabilidade dentro do grupo dimorfo, sendo que os pacientes dimorfo tuberculóides seriam estáveis, enquanto os pacientes dimorfo-dimorfo e dimorfo virchowiano poderiam caminhar no espectro de maneira tórpida ou em surtos, em direção ao polo virchowiano. Essa classificação tem sido adotada em pesquisas científicas, devido sua abrangência de critérios, embora não inclua a forma indeterminada (RIDLEY; JOPLING, 1966; LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007).

Em 1982, a OMS estabeleceu uma classificação simplificada, com fins operacionais e terapêuticos, com base no índice bacilar (IB). De acordo com esta classificação, a hanseníase foi dividida em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). Os pacientes PB são os que apresentam IB menor do que 2+ e pacientes MB são aquelas que possuem um IB maior do que ou igual a 2+ (WHO, 1982; PARKASH, 2009).

Em 1988, a OMS recomendou o uso de uma classificação puramente clínica, a fim de facilitar as ações operacionais e o tratamento, visto que existem regiões onde os exames de microscopia de esfregaço de pele não estão disponíveis. Assim estabeleceram-se como casos PB aqueles pacientes com até cinco lesões de pele e/ou somente um tronco nervoso envolvido, ao passo que os casos MB seriam aqueles com mais de cinco lesões na pele e/ou mais do que um tronco do nervo envolvido (WHO, 1988; BHAT; PRAKASH, 2012).

A classificação operacional deve ser feita pelos critérios clínicos (história clínica e epidemiológica e exame dermatoneurológico). Quando disponível, a baciloscopia e o seu resultado positivo classificam o caso como MB, embora um resultado negativo não exclua o diagnóstico clínico da hanseníase e também não classifique obrigatoriamente o doente como paucibacilar (BRASIL, 2016a). Atualmente recomenda-se que a classificação de Ridley-Jopling seja usada em qualquer estudo que examine os processos imunológicos em hanseníase e em estudos que visem identificar genes de susceptibilidade (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007).

3.5 Formas clínicas e histopatológicas da hanseníase

A Classificação de Madri de 1953 é a única que descreve a hanseníase indeterminada (LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a; TALHARI; TALHARI; PENA, 2015).

1- Indeterminada (MHI): forma precoce, caracterizada por máculas hipocrômicas, mal definidas, com superfície lisa ou escamosa. A partir dessa forma, a doença pode evoluir para cura ou para as formas determinadas da doença. Geralmente, a pesquisa de BAAR mostra-se negativa nesta forma (BHAT; PRAKASH, 2012; TALHARI; TALHARI; PENA, 2015). Na histopatologia, em alguns casos, o infiltrado inflamatório é mais acentuado em torno dos anexos (glândulas sudoríparas e sebáceas e folículos pilosos) do que ao redor dos vasos. Pode-se observar na epiderme degeneração vacuolar focal dos queratinócitos basais e exocitose de linfócitos (LIU *et al.*, 1982; BHAT; PRAKASH, 2012; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014b).

Considerando-se os aspectos clínicos, histológicos, bacteriológicos e imunológicos, são as seguintes as formas clínicas e histopatológicas da hanseníase: (RIDLEY; JOPLING, 1966).

2- Tuberculóide (MHT): caracterizada pela presença de poucas lesões, de pequena dimensão, distribuição assimétrica, contornos bem definidos e elevados (pápulas e placas). As bordas das lesões são elevadas e eritematosas e os centros são atróficos, com anidrose, podendo haver comprometimento de nervos (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENA, 2015). As lesões são frequentemente anestésicas, escamosas, secas e sem pelos. A anestesia é devida à destruição das fibras nervosas dérmicas (WALKER; LOCKWOOD, 2006). A lesão do nervo é normalmente observada em torno de lesões da pele e está associada com disfunção sensorial e/ou motora quando são afetadas as mãos e pés. A baciloscopia é negativa (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015). Na histopatologia é possível observar infiltrado inflamatório granulomatoso, frequentemente multifocal, perianexial (com envolvimento do músculo eretor do pelo e glândulas sudoríparas) e com distribuição perineural, tanto nas porções superficiais quanto profundas da derme. Os granulomas não são caseosos, formados por células epiteliais maduras, "encapsulados" por muitos linfócitos. Células gigantes multinucleadas podem estar presentes, enquanto que plasmócitos estão ausentes. Não se observa fibrina no centro do granuloma. A epiderme é muitas vezes

atrófica e "corroída" pelos granulomas presentes na derme superficial. Dentro dos granulomas, pequenos nervos podem ser destruídos e o nervo periférico espessado é regularmente palpável na vizinhança de uma lesão (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014b; DE-SOUZA *et al.*, 2016).

3- Dimorfo (MHD): o grupo dimorfo apresenta diferentes manifestações clínicas por causa de vários graus da resposta imune celular ao *M. leprae*. A instabilidade é uma característica predominante (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

A forma dimorfa é subdividida em:

a)- **dimorfa-tuberculóide (MHDT):**- As lesões cutâneas assemelham-se às da forma MHT em termos de aparência e perda de sensibilidade. As lesões são maiores em maior número e, às vezes, podem apresentar placas com limites pouco nítidos em toda a lesão ou em parte dela. O espessamento de nervo tende a ser irregular, menos intenso, e aparece em maior número. A baciloscopia varia de negativa para positiva com IB de até (+2) (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). Na histopatologia, observa-se um infiltrado semelhante ao da forma MHT. As principais diferenças residem nas células epitelioides, menos maturadas e, em particular, pela presença de linfócitos dentro e não apenas em volta dos granulomas. Além disso, os granulomas são menos organizados e a formação do tubérculo é menos proeminente. Células gigantes indiferenciadas são típicas desta forma (MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014);

b)- **dimorfa-dimorfa (MHDD):** as lesões são intermediárias em número e tamanho entre a tuberculóide e a virchowiana, avermelhadas ou acobreadas, com distribuição assimétrica. A presença de placas eritematosas com perda das fronteiras externas e internas e hipopigmentação centro oval são sugestivas desta forma. Geralmente são encontradas máculas, placas, pápulas e nódulos, em associação com as lesões típicas. A hanseníase MHDD é rara, sendo considerada a parte mais instável do espectro, movendo-se rapidamente para uma das formas polares (MHT ou MHV). O envolvimento dos nervos é variável, podendo ser grave durante a reação hansênica do tipo 1. A baciloscopia geralmente é fortemente positiva com IB entre (2+ e 4+) (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015; DE-SOUZA *et al.* 2016). Ao exame histopatológico, o subgrupo MHDD é caracterizado pela formação de granulomas

epitelioides com células imaturas, sem estarem bem definidos. Células gigantes estão ausentes e os linfócitos estão distribuídos difusamente. Os macrófagos representam proporção bastante significativa de células (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014; DE-SOUZA *et al.* 2016).

c)- **dimorfa-virchowiana (MHDV)**: as lesões cutâneas assemelham-se às da forma virchowiana, tendendo a ocorrer em grande número, mas não de forma tão simétrica e com perda de sensação em algumas áreas (LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a). Máculas podem se apresentar como eritematosas e infiltradas. Podem surgir lesões como placas, pápulas e nódulos, simulando hanseníase virchowiana. Pode-se observar alargamento de nervo periférico e a baciloscopia é fortemente positiva (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). À histopatologia, o infiltrado caracteriza-se pela presença de macrófagos misturados com linfócitos, podendo ser encontrado um grupo solitário de células epitelióides entre os macrófagos. O infiltrado pode ser difuso, nodular desigual, perivascular ou perianexial, mas sempre separado da epiderme por uma zona tipicamente estreita de colágeno (banda de Unna). Os macrófagos apresentam forma mais ou menos proeminente, com citoplasma espumoso, especialmente quando da regressão de lesões (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014).

4- Virchowiana (MHV): o polo virchowiano do espectro é caracterizado pela presença de pápulas e nódulos confluentes, infiltração difusa da pele que podem originar a face leonina e madarose. As lesões são geralmente simétricas e bilaterais, mal definidas, hipocrômicas e eritematosas. A pele torna-se brilhante e xerótica, sendo que, inicialmente, apresenta-se infiltrada e cerosa (RIDLEY; JOPLING, 1966; EICHELMANN *et al.*, 2013). Ocorre também infiltração de mãos e pés, dando à pele uma aparência brilhante e succulenta. Lentamente, aparecem na pele infiltrada pápulas e nódulos solitários ou numerosos (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). Os danos nos nervos periféricos geralmente são bilaterais, difusos e simétricos, associando-se, em diferentes graus, com hipertrofia do nervo periférico (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015). Em biópsias, é possível observar macrófagos espumosos na derme, contendo grande número de bacilos e microcolônias, conhecidos como globias (SCOLLARD *et al.*, 2006; BHAT; PRAKASH, 2012). Os linfócitos são escassos e dispersos e a epiderme é plana e está separada do infiltrado inflamatório por banda de fibras de colágeno, conhecida como banda de Unna, correspondendo à derme papilar retificada. O infiltrado pode se estender até a derme profunda e gordura

subcutânea. Os macrófagos presentes com citoplasma cinzento assemelham-se às células espumosas (células de Virchow). Lesões precoces apresentam-se com células em quantidade variável de aspecto espumoso e com grandes vacúolos em lesões mais velhas ou regredindo em células gigantes multinucleadas (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; BELACHEW; SCHETTINI, 2014; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014b).

3.6 Reações Hansênicas

Os estados reacionais são eventos imuno-inflamatórios que se expressam por manifestações cutâneas ou neurológicas, podendo ser localizados ou sistêmicos (RIDLEY; JOPLING, 1966; NERY *et al.*, 2006). As reações hansênicas são classificadas em dois tipos: reação hansênica tipo I ou reversa (RR), quando está envolvida a imunidade celular, e a reação hansênica tipo II ou eritema nodoso hansênico (ENH) (RIDLEY; JOPLING, 1966; NERY *et al.*, 2006).

A reação tipo I ou reação reversa (RR) ocorre principalmente nos pacientes em que ocorrem as formas clínicas da hanseníase dimorfa-tuberculóide (MHDT), dimorfa-dimorfa (MHDD) e dimorfa-virchowiana (MHDV), devido à instabilidade imunológica (NERY *et al.*, 2006). A reação tipo I tende a surgir precocemente no tratamento, entre o 2º e o 6º meses, caracteristicamente na hanseníase dimorfa. É considerada reação mediada pela imunidade celular e representa melhora (up-grading) ou piora (down-grading). Clinicamente são indistinguíveis e se caracterizam por exacerbação das lesões pré-existentes, que se tornam edemaciadas, eritematosas, brilhantes, podendo chegar à ulceração. Os sintomas sistêmicos variam. Surgem lesões novas à distância e as neurites mostram-se frequentes, podendo ser a única manifestação clínica. As neurites podem ser silenciosas, ou seja, o dano funcional do nervo se instala sem quadro clínico de dor e espessamento do nervo. Os nervos mais comprometidos são os ulnares e medianos nos membros superiores, fibular comum e tibial posterior nos membros inferiores e facial e grande auricular no segmento cefálico (NERY *et al.*, 1999).

Clinicamente, as reações tipo I são caracterizadas por um aumento da inflamação em lesões da pele, nervos ou ambos. Há uma exacerbação considerável de manifestações neurológicas, como exemplo a polineurite com inflamação acentuada dos nervos (WALKER; LOCKWOOD, 2008).

A reação hansênica tipo II ou ENH tem a participação mais efetiva da imunidade

humoral demonstrando efeitos de acentuada formação de imunocomplexos (TELES *et al.*, 2013). Essa reação é observada nas formas virchowiana e dimorfas, em geral, após seis meses de tratamento. Trata-se de síndrome desencadeada por imunocomplexos, mas a imunidade celular possui importância em etapas iniciais do processo. Há aumento de citocinas séricas, como o fator de necrose tumoral alfa e o interferon gama sem, contudo, haver mudança definitiva da condição imunológica do paciente (FOSS 1999; NERY *et al.*, 1999; NERY *et al.*, 2006).

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico é baseado na história epidemiológica, sinais e sintomas clínicos. Os dados clínicos, complementados por técnicas semiológicas, como avaliação da sensibilidade da pele e testes de baciloscopia, geralmente conclui o diagnóstico. Atualmente, em virtude das dificuldades de realização de exames laboratoriais nas Unidades Básicas de Saúde, o diagnóstico em campo, para fins de tratamento, é realizado baseando-se unicamente no critério de contagem do número de lesões. O paciente que apresenta até cinco lesões é considerado com a forma paucibacilar da doença, enquanto que pacientes com mais de cinco lesões, são considerados com a forma multibacilar (BARRETO *et al.*, 2007). Alguns testes laboratoriais são utilizados para confirmação diagnóstica de hanseníase, tais como a baciloscopia e exame histopatológico e os testes de Mitsuda e o ML Flow que auxiliam na classificação.

A baciloscopia é o método universalmente aceito de avaliar a carga de BAAR em um paciente de hanseníase definido por Ridley e Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966). Em pacientes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade, a coleta deverá ser feita em lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e lesão (L). Nas lesões planas, a coleta deverá ser feita no limite interno. Nos nódulos, tubérculos e placas eritematosas marginadas por microtubérculos, a coleta deverá ser no centro (BRASIL, 2010).

O exame histopatológico, geralmente, é realizado em fragmentos de lesões de pele ou nervos. É utilizado para diagnóstico, classificação das formas clínicas e das reações hansênicas (LASTÓRIA, J.C.; DE-ABREU M.A. 2014b).

O ML Flow é um teste sorológico, imunocromatográfico simples, rápido que auxilia na classificação da forma clínica da hanseníase (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015). O teste detecta anticorpos da classe IgM

contra o antígeno PGL-1 do *M. leprae*. É utilizado para classificação da hanseníase em PB ou MB (OSKAM; SLIM; BUHRER-SÉKULA, 2003). Geralmente a sensibilidade do teste, considerada como a capacidade de classificar corretamente os pacientes MB, foi igual a 97,4% e a especificidade, baseada nos resultados dos grupos controle foi de 90,2% (BÜHRER-SEKULA *et al.*, 2003).

O teste de Mitsuda é um método de avaliação da resposta imune celular do hospedeiro (OPROMOLLA, 2000), pela inoculação de solução contendo antígeno do bacilo na face anterior do antebraço. A finalidade do teste é auxiliar na classificação de pacientes portadores de hanseníase dos grupos indeterminados e dimorfos. O seu valor é prognóstico e não diagnóstico. Pacientes com teste positivo tendem a desenvolver as formas PB e os negativos MB (SCOLLARD *et al.*, 2006; LASTÓRIA, J.C.; DE-ABREU M.A. 2014a).

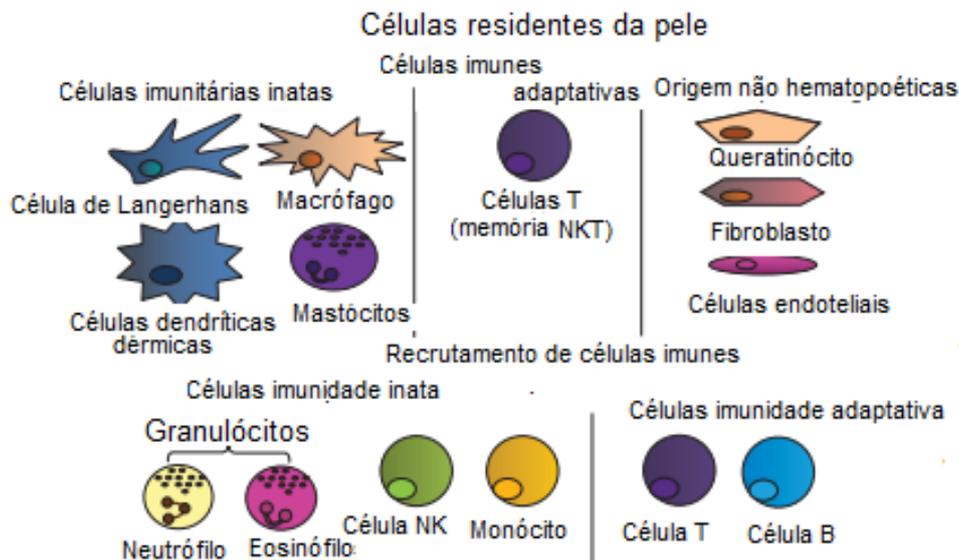
O teste de intradermoreação de Mitsuda baseia-se na resposta imunológica do indivíduo através de reação de hipersensibilidade tardia do tipo celular, de alta especificidade, frente ao bacilo *M. leprae*, inoculado por via intradérmica. A leitura deve ser realizada entre 21° e 28° dia após a inoculação. A formação de pápula igual ou superior a cinco milímetros confirma a positividade do teste. A positividade do teste de Mitsuda aumenta com a idade do indivíduo, razão pela qual não se valoriza o resultado do teste em menores de 07 anos. Na idade adulta 90 a 95% da população reage apresentado diferentes graus de positividade ao teste (BRASIL, 2010).

3.8 Regulação imune dérmica

A pele é um órgão complexo que, além de proporcionar uma forte barreira contra agressões externas, serve como ambiente para extensa variedade de processos inflamatórios, incluindo imunidade contra infecções (SALMON; ARMSTRONG; ANSEL, 1994; RICHMOND; HARRIS, 2014). A pele humana tem dois compartimentos principais: epiderme e derme. A epiderme apresenta histologia simples, composta principalmente de queratinócitos, que mantêm junções e formam o estrato córneo, crucial para a função de barreira da epiderme. Esta também pode contribuir para a inflamação, visto que pode expressar MHC II (*Major Histocompatibility Complex* - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II) e secretar citocinas (NESTLE *et al.*, 2009; RICHMOND; HARRIS, 2014).

A derme subjacente pode ser dividida em camada papilar (mais superficial) e camada reticular (mais profunda). É composta principalmente por proteínas da matriz extracelular que proporcionam a estrutura e elasticidade da pele e possui maior diversidade celular. A derme contém muitas células imunológicas especializadas, incluindo células dendríticas (CDs), células T auxiliares [T helper (Th) CD4⁺], e células “matadoras naturais” – *natural killer* (NK). Além disso, macrófagos, mastócitos, fibroblastos e células nervosas estão também presentes. A derme é drenada por condutores vasculares e linfáticos, pelos quais as células migram e trafegam (NESTLE *et al.*, 2009; RICHMOND; HARRIS, 2014).

No processo de resposta imune, as células residentes na pele são ativadas e secretam citocinas pró-inflamatórias que promovem o recrutamento de células efetoras, incluindo neutrófilos, monócitos e células NK (FIGURA 2). Estas células podem começar o “ataque” ao agente patogênico; no entanto, uma resposta imune eficaz geralmente requer o envolvimento subsequente do sistema adaptativo, com a interação e reconhecimento das células infectadas (RICHMOND; HARRIS, 2014). As células eucarióticas têm a capacidade de reconhecer o agente patogênico específico através de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern* – Padrões Moleculares Associados a Patógenos, que incluem lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos, flagelina e ácidos nucléicos e que conduzem à ativação de vias de sinalização da célula hospedeira e às respostas imunes inatas e adaptativas subsequentes. O reconhecimento dos PAMPs inclui os receptores *Toll-like* (TLRs) e receptores *NOD-like* (NLRs), que são expressos por CDs (NESTLE *et al.*, 2009; RICHMOND; HARRIS, 2014).

FIGURA 2- Populações celulares da pele.

Legenda: Células de Langerhans, CDs, macrófagos dérmicos, outras células inatas (mastócitos, células NK, células NKT, e células T de memória compreendem o sistema imune residente da pele - sob o estado estacionário). Células de Langerhans, células dendríticas dérmicas e macrófagos iniciam uma resposta inata rápida, que inclui o recrutamento de células efetoras. Populações de células do estroma, tais como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, também participam da resposta imune ao detectarem danos nos tecidos e a produção de citocinas inflamatórias. Por ativação do sistema imune, residente da pele, células imunológicas adicionais são recrutadas para ajudar a conter e combater a infecção e/ou para remover os restos celulares. Estes incluem células inatas adicionais, como neutrófilos e eosinófilos, bem como populações adaptativas, como as células T de memória e as células B.

Fonte: Adaptado de RICHMOND; HARRIS, 2014 (modificado para fins didáticos).

As CDs de pele podem ser classificadas de acordo com sua localização em compartimentos distintos da pele: as células de Langerhans são subconjuntos de CDs na epiderme, onde constitutivamente residem nas camadas suprabasais e são regularmente espaçadas entre queratinócitos, enquanto CDs dérmicas residem na derme, seguidamente abaixo da junção dermo-epidérmica, e são dispersas ao longo de todo o compartimento dérmico. Podem ter propriedades funcionais específicas, tais como a secreção de mediadores pró-inflamatórios (CDs inflamatórias), a produção IFNs do tipo I [células dendríticas plasmocitóides (PDCs)] (NESTLE *et al.*, 2009).

3.9 Regulação imune na hanseníase

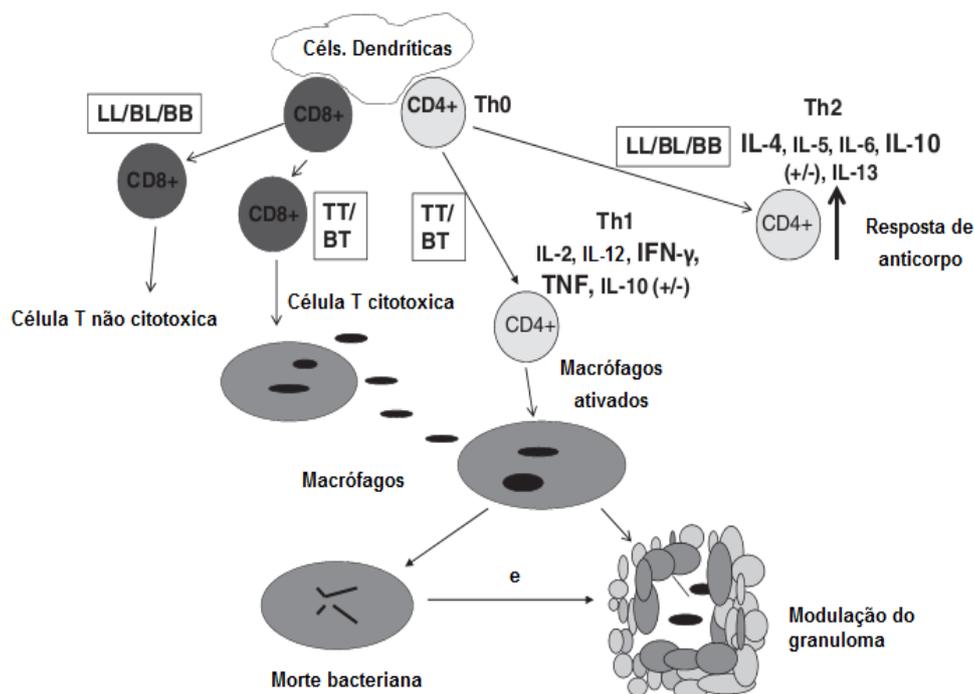
A resposta imune pode ser dividida esquematicamente em inata e adquirida. Uma resposta imune inata efetiva em combinação com a baixa virulência do *M. leprae* está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase. A resposta

imune inata tem a característica de ser mecanismo de defesa não específico, com ação geral sobre os microrganismos, independente de sua natureza. A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares das micobactérias, os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Exemplo desse tipo de receptores, os receptores TLRs são essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta da imunidade inata (SCOLLARD *et al.*, 2006).

O primeiro obstáculo à infecção pelo *M. leprae* é a imunidade inata, representada pela integridade do epitélio e secreção da imunoglobulina de superfície A (IgA). As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células NK e células dendríticas. Essas células não só servem como uma primeira linha de defesa, mas através da liberação de citocinas, também modulam a natureza da resposta imune adaptativa subsequente ao influenciar o padrão de citocinas de células T. A resposta imune inata efetiva é moldada pelas CDs, em combinação com a baixa virulência do *M. leprae*, que pode ser a base para a resistência ao desenvolvimento de manifestações clínicas da hanseníase (LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a).

As CDs provavelmente desempenham papel chave na modulação da resposta imune no início da infecção pelo *M. leprae*. Constituem as primeiras células que encontram os bacilos e, após processarem os antígenos, podem apresentá-los para células TCD8⁺ por meio de moléculas do MHC de classe I, ou para células TCD4⁺, por meio de MHC de classe II. Também produzem citocinas e quimiocinas que regulam a inflamação e conduzem a proliferação células T auxiliares 1 (Th1) ou de células T helper 2 (Th2), que irão promover a resposta imune celular ou humoral ao *M. leprae*, respectivamente. Isto irá determinar, em grande parte, a evolução da doença para a forma tuberculóide ou virchowiana (FIGURA 3) (SCOLLARD *et al.*, 2006; GULIA; FRIED; MASSONE, 2010; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a).

FIGURA 3- Regulação imune dérmica na hanseníase.



Legenda: Células dendríticas podem estimular células T *naive* para se diferenciarem em subpopulações efectoras distintas. Células CD4⁺ podem se diferenciar em células Th1 ou Th2 dependendo do tipo de citocina que as estimulou, acarretando diferentes respostas imunológicas frente ao bacilo.

Fonte: Adaptado de DE SOUZA *et al.*, 2016.

Além das CDs, os macrófagos residentes na derme exercem importante papel na patogênese da hanseníase, já que participam do processamento e apresentação de antígenos a linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e também contribuem para a formação do granuloma, estrutura importante para a contenção da disseminação do bacilo (SCOLLARD *et al.*, 2006; RAMAKRISHNAN, 2012) (FIGURA 3).

Estudos *in situ* por técnicas de imuno-histoquímica sugerem diferenças entre a taxa de células CD4:CD8 (T-auxiliar:T-supressor) nos polos da hanseníase (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MODLIN *et al.*, 1988). Pacientes MHT exibiram predominância de células CD4⁺, com a relação CD4⁺/CD8⁺ de 1.9:1; em contraste, as lesões de MHV que exibiram a relação CD4⁺/CD8⁺ de 0.6:1 (MODLIN *et al.*, 1988; MENDONÇA *et al.*, 2008). As taxas CD4:CD8 nas lesões são distintas das encontradas no sangue dos pacientes, indicando uma possível migração seletiva para o interior das lesões, proliferação ou mesmo retenção nas lesões (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MODLIN *et al.*, 1988). A resposta imune adaptativa é caracterizada

pela interação altamente específica dos linfócitos, CDs, macrófagos, e fatores solúveis, tais como os anticorpos liberados pelas células B, que capturam microrganismos livres, e citocinas secretadas pelas células T, que atravessam as membranas celulares e danificam patógenos (MENDONÇA *et al.*, 2008; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a).

A resposta adaptativa pode ser categorizada em celular ou do tipo 1, e humoral ou do tipo 2. A habilidade dos linfócitos CD4⁺, em induzir as respostas celular ou humoral está relacionada com os tipos de citocinas secretadas e proporcionará o desenvolvimento das já conhecidas respostas Th1 ou Th2 (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Na resposta de células Th1, há secreção de interleucina 2 (IL-2), IL-12 e interferon γ (IFN- γ) resultando na ativação de macrófagos; células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimulam a produção de anticorpos e inibem a ativação de macrófagos; ou células Th17 que produzem IL-17 e IL-22 e estão envolvidos na inflamação e autoimunidade (DE-SOUZA *et al.* 2016).

Neste contexto, o predomínio de resposta imune celular ou humoral, frente à infecção pelo bacilo, pode influenciar a evolução da doença e estar associado, pelo menos em parte, com as características clínicas observadas nos pacientes com as formas MHT e MHV, respectivamente (MENDONÇA *et al.*, 2008). Isso se deve a que pacientes MHV mostram uma dicotomia em respostas de células B e T, têm anticorpos abundantes e baixa resposta imune mediada por células T, enquanto os doentes MHT mostram anticorpos indetectáveis e boas respostas de células T (NATH; SAINI; VALLURI, 2014).

Recentemente, foi identificada uma população de células com fenótipo regulador no infiltrado inflamatório de pacientes com hanseníase, células T reguladoras (T_{REG}), capazes de desempenhar papel imunossupressor na atividade de outros linfócitos e de controlar os efeitos exagerados ou extravio do sistema imunológico. Esta modulação envolve diferentes mecanismos, como a supressão da proliferação de células T, produção e secreção de citocinas supressoras - IL-10 e TGF- β - (BLUESTONE; ABBAS, 2003). Assim, com a identificação desses novos mecanismos imunológicos frente à infecção pelo *M. leprae*, ampliam-se as perspectivas de estudo quanto à patogenia da doença.

Em síntese, sugere-se que os pacientes MHT tenham um padrão de resposta imune protetora mediada pelas células T parcialmente eficiente, com produção de citocinas que contribuem na maturação e ativação dos macrófagos, culminando no controle da multiplicação dos bacilos e a sua subsequente eliminação (HALL, 2011).

Neste contexto a interleucina-12 (IL-12) e IFN- γ são importantes citocinas envolvidas na ativação de macrófagos. IL-12 é um regulador fundamental das respostas Th1 e essencial para a promoção da imunidade mediada por células (IMC) contra agentes patogênicos microbianos intracelulares (KIM *et al.*, 2001). Estimula células NK a liberarem IFN- γ que ativa macrófagos, que liberam mais IL-12, mantendo a IMC. Na hanseníase, a IL-12 é produzida em lesões tuberculóide; já em pacientes virchowianos, a falta de capacidade de resposta a IL-12 parece se dever a uma falta de resposta antígeno-específica ao *M. leprae* e à inadequada diferenciação de células T helper (KIM *et al.*, 2001; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014a).

O IFN- γ é produzido e secretado pelos linfócitos CD4⁺ e células NK, ativando macrófagos e levando à produção de substâncias microbidas como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossomais, culminando na eliminação de patógenos intracelulares. Além disso, o IFN- γ atua na formação do granuloma, eficiente mecanismo para isolamento e contenção da infecção na hanseníase (SCOLLARD *et al.*, 2006). Nas formas MHT/MHDT a forte reatividade de células T contra o *M. leprae* associam-se com a produção de IFN- γ , enquanto os pacientes MHDV/MHV, chamados de anérgicos, com a forma disseminada da doença, demonstram resposta das células T desviada para produção de citocinas anti-inflamatórias (SADHU *et al.*, 2016).

Os pacientes do polo virchowiano, parecem possuir um perfil de citocinas que induz a redução da resposta inflamatória, com inibição de macrófagos e perfil característico da resposta humoral, que adicionados a outros fatores, seriam insuficientes para conter o *M. leprae* (HALL, 2011). A interleucina-10 (IL-10) está associada à inibição de macrófagos ativados, devido inibir a produção de IL-12. IL-10 é secretada principalmente por linfócitos, macrófagos e monócitos e exibe uma importante atividade de imunomodulação, que regula a secreção de anticorpo ou, principalmente, a inflamação, que, se sustentada, pode provocar lesão tissular durante doenças crônicas (ALVARADO-ARNEZ *et al.*, 2015). A IL 10 está envolvida na produção de IL-4, responsável pela expansão de células T, proliferação e diferenciação de células B. (AGGARWAL *et al.*, 2011).

No entanto, muitos pacientes podem exibir um perfil de resposta mista, produzindo citocinas do perfil Th1 e Th2. Isso mostra que o predomínio de uma resposta não implica na anulação da outra, e pode sugerir ainda que, a resposta imune ao *M. leprae* possa não satisfazer completamente o modelo Th1/Th2. Sendo assim, vale destacar que novos subgrupos de células T auxiliares já foram descritos, como as células

T reguladoras (T_{REG}) e as células T produtoras de IL-17 (Th17), indicando que a resposta celular não é tão dicotômica como se pensava (HALL, 2011).

As células T_{REG} são linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Caracteristicamente expressam CD25 e o fator de transcrição Foxp3, que é o marcador mais específico disponível das T_{REGS} (BLUESTONE; ABBAS, 2003; PARENTE *et al.*, 2015). As células T_{REG} são essenciais para a homeostase e tolerância imunológica (BLUESTONE; ABBAS, 2003; NG *et al.*, 2013). Na presença das citocinas IL-10 e TGF-β, as células T_{REG} que se acumulam no local da infecção são ativadas e podem inibir a proliferação e produção de citocinas Th1 por células T efectoras, favorecendo a sobrevivência do parasita, bem como a susceptibilidade do hospedeiro à doença (BLUESTONE; ABBAS, 2003). Essas células são críticas para a manutenção da tolerância e desempenham diferentes mecanismos, como supressão da proliferação e produção de citocinas pelas células T efectoras (SADHU *et al.*, 2016).

As células Th17 produzem IL-17A (também referida como IL-17), citocina envolvida na neutrofilia, remodelação e reparação de tecidos, e a produção de proteínas antimicrobianas (SADHU *et al.*, 2016). A IL-17 é produzida por células CD4⁺, CD8⁺, NK, macrófagos e neutrófilos. E compõe importantes células do processo inflamatório que acionam a inflamação tecidual e são responsáveis pela infiltração de outras células inflamatórias, como os neutrófilos. No entanto, a produção excessiva de IL-17 pode manter um extenso recrutamento de neutrófilos, levando a dano tecidual. Isso sugere que a adequada regulação da resposta Th17 durante a infecção seja essencial para eliminar o patógeno e evitar consequências imunopatológicas (TORRADO *et al.*, 2010).

O papel das células T_{REGS}, bem como das células Th17 na hanseníase ainda não foi completamente estabelecido. Assim, a participação da resposta imune na hanseníase ainda é uma questão importante a ser investigada (QUARESMA *et al.*, 2014).

A participação de componentes imunológicos na patogênese da hanseníase constitui, ainda, ponto de grande importância a ser investigado. A produção de citocinas e quimiocinas, a partir da pele, amplifica a própria resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. Isso resulta em uma rede reguladora complexa e afinada de biomarcadores, destacadamente IFN-γ, Foxp3 e interleucinas 10, 12 e 17, que auxiliam no curso clínico da infecção (DE-SOUZA *et al.*, 2016).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar o padrão imuno-histopatológico da regulação imune dérmica nas lesões cutâneas e em pele contralateral aparentemente indene em casos novos de Hanseníase.

4.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características demográficas e laboratoriais em casos novos de Hanseníase;
- Caracterizar as alterações histopatológicas das lesões cutâneas e da pele contralateral em casos novos de Hanseníase;
- Caracterizar o padrão de expressão imuno-histoquímico de Foxp3 e das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-17 nas lesões cutâneas e na pele contralateral em casos novos de Hanseníase;
- Comparar os resultados histopatológicos e imunopatológicos das lesões cutâneas com os da pele contralateral.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

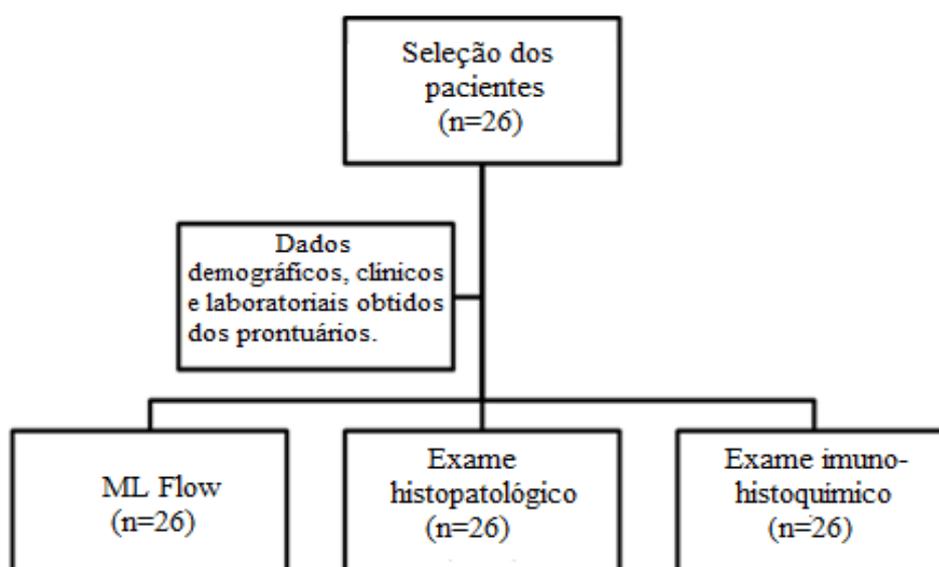
5.1 Delineamento e estratégias do estudo

Trata-se de estudo observacional transversal e comparativo dos aspectos imunohistopatológicos de lesões cutâneas e de amostras de pele contralateral, esta com aspecto normal ou sem evidência clínica de alterações, de 26 casos novos de hanseníase, em pacientes maiores de 18 anos, no período de maio de 2014 a outubro de 2015, todos atendidos no Hospital Eduardo de Menezes (HEM) da Fundação Hospitalar de Minas Gerais (FHEMIG).

O cálculo amostral, elaborado com nível de confiança de 95%, erro máximo de 2,5% e prevalência da hanseníase em Minas Gerais de 0,44 casos/10.000 habitantes, definiu tamanho amostral mínimo de 25 casos.

Após a seleção dos pacientes, foram coletados dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos prontuários e realizados o teste sorológico ML Flow, biópsia de pele em dois sítios (lesão cutânea e pele contralateral sem lesão clinicamente evidente) e exames histopatológico, com a coloração por hematoxilina e eosina (HE), e imuno-histoquímico, de acordo com o esquema abaixo.

FIGURA 4- Delineamento e estratégias do estudo



Legenda: Fluxograma do estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais com dados referentes ao período entre 2014 e 2015.

5.2 Critérios de seleção dos pacientes

Para compor o grupo deste estudo foram selecionados 26 pacientes, de acordo com diagnóstico clínico de hanseníase, realizado entre o primeiro semestre de 2014 e segundo semestre de 2015, por dermatologistas especializados do Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes.

5.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- (a) Idade superior a 18 e inferior a 75 anos;
- (b) Caso novo de hanseníase diagnosticado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2014 e 2015, sem tratamento poliquimioterápico.
- (c) Consentimento, voluntário e por escrito, para participação dos estudos realizados após esclarecimento de suas finalidades.

5.2.2 Critérios de exclusão

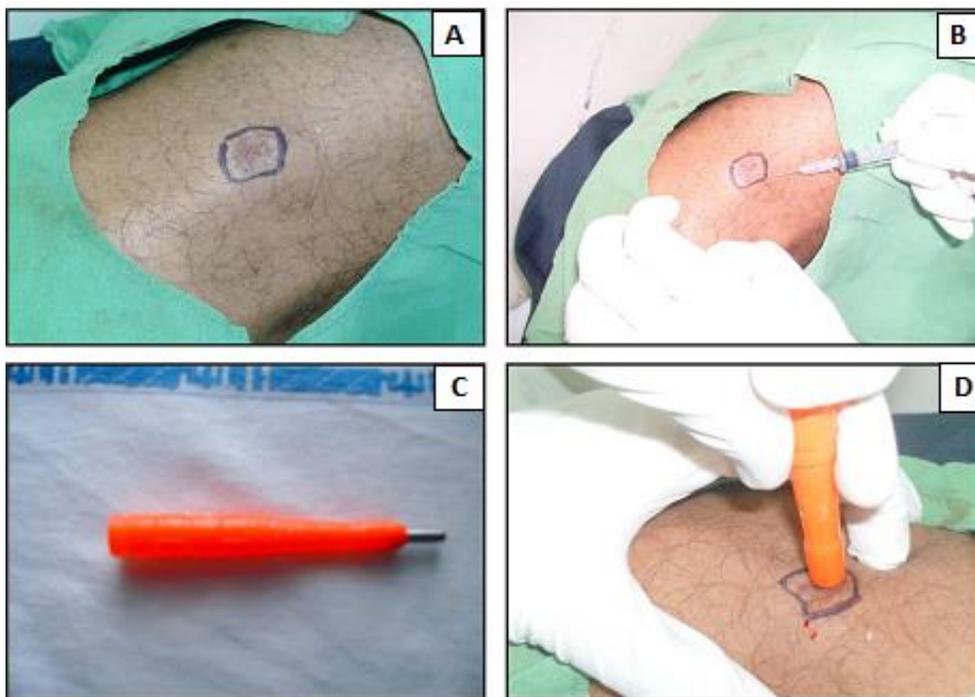
- (a) pacientes que já tenham iniciado o tratamento para hanseníase;
- (b) pacientes imunocomprometidos ou com diagnóstico de infecção por HIV/AIDS, tuberculose ou doenças auto-imune.

5.3 Coleta e preservação das amostras de biópsia de pele

Foram coletadas duas biópsias de pele em cada paciente, sendo uma em área de lesão e outra em área contralateral, sem lesão aparente (FIGURA 5). O procedimento foi realizado por médico dermatologista, com antissepsia e anestesia locais, após infiltração de lidocaína na concentração de 2%. Para a retirada dos fragmentos de pele, empregou-se *punch* de 5 mm de diâmetro; posteriormente, realizou-se sutura com um ponto simples. As amostras, devidamente identificadas com o número de prontuário, foram enviadas ao Centro Especializado em Anatomia Patológica (CEAP) para confecção de blocos de parafina, posteriormente encaminhados ao Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, onde foram cortados em secções de 5 µm para os exames histopatológicos e imuno-histoquímico.

Para o grupo “Controle” constituído por biópsias de pele negativas para hanseníase foram selecionadas 5 biópsias durante a rotina do Laboratório de Medicina Molecular.

FIGURA 5- Procedimento para realização de biópsia.



Legenda: A) Representa a região delimitada para a realização da biópsia. B) Representa a aplicação da anestesia local. C) Representa o *punch*. D) Representa a incisão com *punch* para retirada do fragmento da lesão.

5.4 Hematoxilina e eosina (HE)

O estudo histopatológico das lâminas coradas em HE permitiu a classificação histológica dos casos de hanseníase. O estudo morfológico permitiu avaliar o estado da pele contralateral.

Resumidamente, as lâminas contendo cortes seriados de 5 μm das amostras parafinadas foram incubadas *overnight*, a 60°C, em estufa. Posteriormente, realizou-se a desparafinização em três banhos de xilol, cinco minutos cada. Em seguida, foi realizada a hidratação em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90% e 80%), cinco minutos cada e lavagem em água corrente durante cinco minutos. Logo após, as lâminas foram coradas pela hematoxilina por três minutos, lavadas em água corrente por cinco minutos. Depois, foram coradas pela eosina durante 40

segundos e lavadas em água corrente. Em seguida, foram para a bateria de álcool I, II e III para retirar o excesso de corante. Por fim, foram imersas em Xilol I, para montagem. As lâminas foram montadas com etellan e lamínula para exame por microscopia óptica convencional.

5.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

Lâminas histológicas contendo cortes seriados de 5 µm das amostras parafinadas foram incubadas *overnight*, a 56°C, em estufa. Posteriormente, as amostras foram submetidas a etapas de desparafinação e reidratação, com três lavagens em xilol, por cinco minutos cada, e três lavagens em álcool etílico (PA), por cinco minutos. Após a reidratação, foi realizada a recuperação antigênica induzida pelo calor, em solução de citrato de sódio a 0,01 M (pH 6,0) a 90°C por 20 minutos no vapor e resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos. A peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas nas diferentes etapas. A marcação para imuno-histoquímica foi feita separadamente com os seguintes anticorpos primários: anti-IL-12 (monoclonal de coelho ab131039, 1.847 mg/mL), anti-IL-10 (monoclonal de mouse ab134742, 1 mg/mL), anti-IL-17 (monoclonal de mouse ab178568, 0.500 mg/mL), anti-Foxp3 (monoclonal de mouse ab22510, 1.000 mg/mL), anti-IFN- γ (policlonal de coelho ab9657, 200 µl), ambos da ABCAM. Vários testes, com amostras de pele doadas pelo Laboratório de Patologia Molecular, foram realizados para padronização dos anticorpos primários. Foram definidas as diluições de 1:75 para o anticorpo primário anti-Foxp3, 1:100 para os anticorpos primários anti-IL-10 e anti-IL-17, 1:300 para o anticorpo primário anti-IFN- γ e 1:500 para o anticorpo primário anti-IL-12. Para detecção dos anticorpos primários, foi utilizado o kit NovoLink Max Polymer Detection NovocastraTM (Leica Microsystems). Os cortes foram incubados com o sistema universal de detecção por polímeros do kit NovoLink por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 µL da solução reveladora fornecida pelo kit contendo o cromógeno diamino-benzidina 3,3 (DAB) e a reação incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. A contra coloração foi realizada mergulhando as lâminas em solução de hematoxilina de Harris (Cód. 248, Vetec) por 30 segundo. As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX, conforme variáveis do estudo (TABELA 3). A análise semi-quantitativa das células positivas foi realizada

em 10 campos em aumento do microscópio (40x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação.

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada por dois observadores (Professor Marcelo Antônio Pascoa Xavier, mestrandia Karina de Paula), independentes e cegos para as condições clínicas dos participantes, sendo a avaliação padrão-ouro realizada pelo patologista responsável do estudo. As diferenças encontradas foram solucionadas por consenso entre os observadores.

5.6 Variáveis do estudo

As variáveis clínicas do estudo, classificadas nas categorias discreta ou nominal, bem como as suas respostas esperadas estão descritas no TABELA 1 abaixo:

TABELA 1- Variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais do estudo.

Variável	Categoria	Resposta
Idade	Discreta	>18 anos/ <75 anos
Sexo	Nominal	Masculino ou Feminino
Diagnóstico Clínico	Nominal	MHT, MHDT, MHDD, MHDV e MHV.
Diagnóstico Histopatológico	Nominal	MHT, MHDT, MHDD, MHDV e MHV.
Índice baciloscópico	Discreta	De 0 a 6
ML Flow	Nominal	Positivo ou Negativo
Contato de MH	Nominal	Sim ou Não

As variáveis histopatológicas estão descritas no TABELA 2 abaixo:

TABELA 2- Variáveis histopatológicas do estudo.

(Continua)

Variável	Categoria	Resposta
Hipotrofia	Dicotômica	Ausente ou presente
Hipertrofia	Dicotômica	Ausente ou presente
Degeneração hidrópica	Dicotômica	Ausente ou presente
Infiltrado na derme papilar	Dicotômica	Ausente/leve ou moderada/acentuada
Infiltrado na derme reticular	Dicotômica	Ausente/leve ou moderada/acentuada
Infiltrado perineural	Dicotômica	Ausente ou presente
Infiltrado perimuscular	Dicotômica	Ausente ou presente
Infiltrado periglandular	Dicotômica	Ausente ou presente

TABELA 2- Variáveis histopatológicas do estudo.

(Conclusão)

Variável	Categoria	Resposta
Dano neural	Dicotômica	Ausente ou presente
Macrófago	Dicotômica	Ausente ou presente
Granuloma	Dicotômica	Ausente ou presente
Número de granuloma	Discreta	Contagem do número de granuloma

As variáveis imuno-histoquímicas estão descritas na TABELA 3:

TABELA 3 - Variáveis imuno-histoquímicas do estudo.

Variável	Categoria	Resposta
Intensidade de marcação	Discreta ordinal	Imunorreatividade ausente, basal (+), moderado (++) e acentuado (+++).
Porcentagem de células positivas no epitélio	Discreta ordinal	Imunorreatividade negativa ou em <25%, 25-50%, 50-75%, >75% do epitélio.
Número de células positivas no infiltrado inflamatório	Discreta ordinal	Imunorreatividade negativo ou em <10, 10-50, 50-100, >100 células no infiltrado inflamatório.

5.7 Análises estatísticas

Os dados qualitativos das características histológicas foram avaliadas conjuntamente por dois examinadores e os resultados foram decididos a partir do censo comum.

A análise semi-quantitativa das células marcadas na IHQ foi realizada em 10 campos em aumento do microscópio (40x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação. A distribuição e intensidade da imunomarcção de cada célula foram avaliadas conjuntamente por dois examinadores. O número de células marcadas por lâmina corresponde ao número de células nos campos avaliados.

Para controle e monitoramento da qualidade das reações imuno-histoquímicas, foram utilizados controles externos e internos (intra-lâmina). O controle externo utilizou cinco amostras de peles saudáveis, doadas pelo serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Minas Gerais, provenientes de mamoplastia (pele basal) (ANEXO A). O controle interno utilizou o próprio compartimento epitelial das amostras, conforme orientações dos fabricantes dos anticorpos primários.

Para as análises qualitativas, foram classificadas, para cada anticorpo primário ou biomarcador, a intensidade e o percentual da imunorreatividade celular da marcação imuno-histoquímica do epitélio e do infiltrado inflamatório, de acordo com a seguinte escala, modificada a partir do trabalho de Lockwood e colaboradores (2011), conforme demonstrado no QUADRO 1 (LOCKWOOD *et al.*, 2011):

QUADRO 1- Escala para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica

Intensidade		Percentual	
0	Ausente	0	Ausente
1	Leve ou uma cruz (+)	1	1-25%
2	Moderada ou duas cruces (++)	2	25-50%
3	Intensa ou três cruces (+++)	3	50-75%
		4	75-100%

Legenda: % percentual.

Fonte: modificado de LOCKWOOD *et al.*, 2011.

Para as análises semiquantitativas, foi estabelecido um escore da expressão imuno-histoquímica, de acordo com Takano e colaboradores (2016). Foram categorizadas, para cada anticorpo primário ou biomarcador, a multiplicação dos parâmetros intensidade e percentual da imunorreatividade celular da marcação imuno-histoquímica do epitélio e infiltrado inflamatório em “expressão elevada” (1) ou “expressão baixa” (0). De acordo com esses critérios, descritos no QUADRO 2, produto maior ou igual a 4 (destaque vermelho) foi considerado “expressão elevada” e produto menor ou igual a 3 (destaque azul) foi considerado “expressão baixa” (TAKANO *et al.*, 2016).

QUADRO 2 - Escores de intensidade e distribuição das reações de IHQ.

INTENSIDADE	DISTRIBUIÇÃO			
	0	1	2	3
0	0	0	0	0
1	0	1	2	3
2	0	2	4	6
3	0	3	6	9

Fonte: TAKANO *et al.* (2016).

Os dados e informações obtidos no estudo foram organizados em banco de dados para viabilizar a realização da análise estatística. As variáveis categóricas foram apresentadas como números e porcentagens. As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão. Para análise da diferença entre os grupos, utilizou-se o teste exato de *Fisher*. Para análise dos dados quantitativos foi realizado teste *t* de *Student*. Foi considerado significativo valor $P < 0,05$.

5.8 Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo COEP da UFMG sob o parecer n° CAAE: 14887414.0.0000.5149 (ANEXO A), atendendo aos aspectos fundamentais da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas que envolvem seres humanos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os participantes do estudo, com intuito de esclarecer sobre os aspectos da pesquisa, bem como assegurar a confidencialidade das informações obtidas, cuja utilidade dar-se-á apenas para fins científicos (ANEXO C).

5.9 Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada a partir de consulta à base de dados MedLine/PubMed, disponível na internet. Os Descritores em saúde/ MeSH *terms* utilizados nessas bases foram: “leprosy”, “cytokine”, “skin lesions”, “histology of leprosy”, “immunohistochemistry and leprosy”.

Os filtros utilizados foram: artigos indexados nas áreas de interesse nos idiomas português e inglês, no período dos diversos estudos aqui relatados. Outras referências complementares importantes foram obtidas em endereços eletrônicos da OMS e MS. Para as citações e lista de referências, foram observadas as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para elaboração de trabalhos acadêmicos, que usam o sistema de citação autor/data. Para o artigo, adotou-se o formato Vancouver.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

Para melhor demonstração e compreensão dos resultados, os mesmos foram subdivididos em dois subtítulos: características demográficas.

6.1 Descrições dos resultados demográficos, laboratoriais e clínicos.

A população foi composta por 26 casos novos de hanseníase, diagnosticados e atendidos no HEM/FHEMIG, no período de maio de 2014 a outubro de 2015. A idade média dos pacientes foi de 50,12 anos e variou de 25 a 75 anos (TABELA 2). Os casos foram predominantemente do sexo feminino (n=14 ou 53,85% do total). A caracterização da população do estudo está apresentada na TABELA 4:

TABELA 4- Análise descritiva da população do estudo.

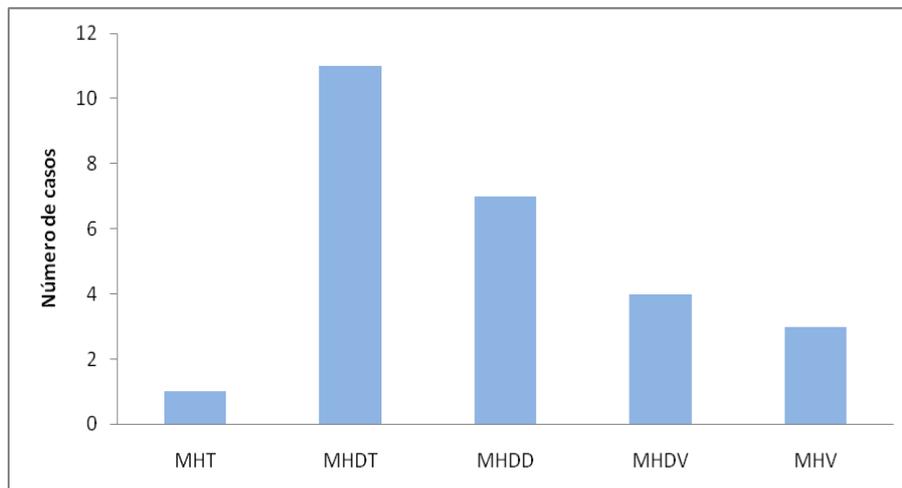
Variável	Número	Percentual
Sexo		
Masculino	12	46,15
Feminino	14	53,85
Idade (anos)		
18-30	3	11,53
31-45	6	23,07
46-60	12	46,15
61-75	5	19,23
Número de lesões cutâneas		
≤5	14	53,84
>5	12	46,15
Número de nervos acometidos		
≤1	12	46,15
>1	14	53,84

Fonte: tabela elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2012 e 2015.

6.1.1 Classificação dos casos

A classificação dos pacientes baseou-se na classificação de Ridley e Jopling (1966). Essa classificação foi realizada a partir de aspectos clínicos, como contagem do número de lesões, nervos acometidos e avaliação da sensibilidade. E aspectos laboratoriais como resultados de IB, ML Flow e dados histológicos. As formas clínicas foram definidas por dermatologistas do HEM/FHEMIG. A distribuição da classificação dos casos é apresentada na FIGURA 6.

FIGURA 6- Classificação dos casos novos de hanseníase, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2014 e 2015 (n =26).



Legenda: MHT (Hanseníase Tuberculóide); MHDT (Hanseníase dimorfa-tuberculóide); MHDD (Hanseníase dimorfa-dimorfa); MHDV (Hanseníase dimorfa-virchowiana); MHV (Hanseníase virchowiana).

Fonte: Figura elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2014 e 2015.

Quanto à forma clínica, o maior número de indivíduos foi classificado como MHDT (11 casos ou 42,31% do total); seguidos por casos de MHDD (7 ou 26,92%) e de MHDV (4 ou 15,38%), três casos de MHV (11,54%), e um caso de MHT (3,85%).

6.1.2 Índice Baciloscópico (IB)

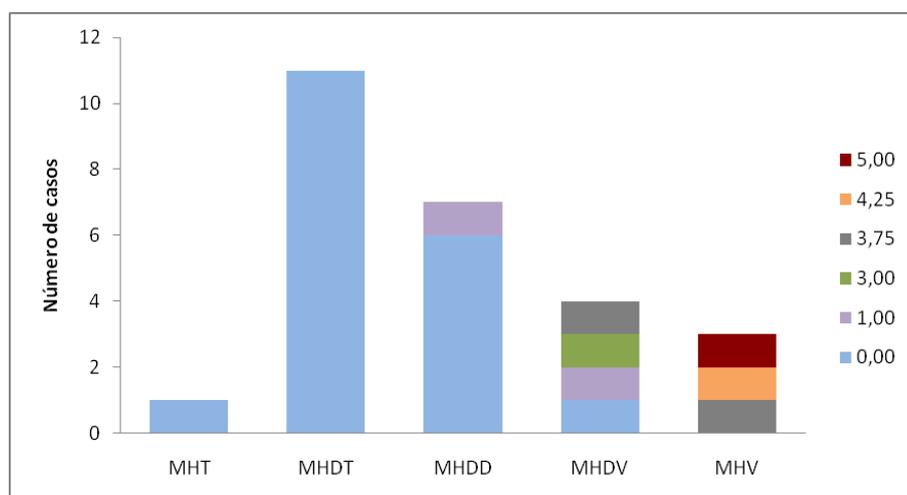
A análise do IB identificou 73,08% (n=19) dos casos com resultado negativo, enquanto 26,92% (n= 7) tiveram IB positivo. Os resultados do IB dos pacientes estão apresentados na TABELA 5:

TABELA 5- Índice Baciloscópico dos casos novos de hanseníase do estudo.

IB	Número	Percentual
0	19	73,08
1	2	7,69
3	1	3,85
3,75	2	7,69
4,25	1	3,85
5	1	3,85

Fonte: Tabela elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2014 e 2015.

Na FIGURA 7 pode-se observar a relação entre o IB e a forma clínica. Destaca-se que nenhum paciente dos subgrupos MHT e MHDT tiveram IB positivo. Nos demais subgrupos pelo menos um paciente teve IB positivo.

FIGURA 7- Relação entre diagnóstico clínico e índice baciloscópico.

Legenda: MHT (Hanseníase Tuberculóide); MHDT (Hanseníase dimorfa-tuberculóide); MHDD (Hanseníase dimorfa-dimorfa); MHDV (Hanseníase dimorfa-virchowiana); MHV (Hanseníase virchowiana).

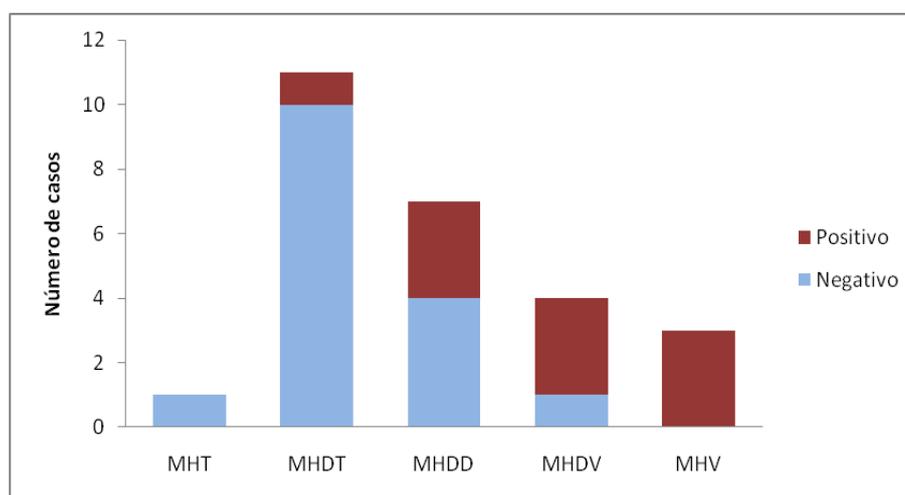
Fonte: Figura elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2014 e 2015.

6.1.3 ML Flow

A realização do teste ML Flow indicou soropositividade anti-PGL-I em 10 pacientes, correspondente à taxa de soropositividade de 38,46%, enquanto 16 pacientes apresentaram resultados negativos no mesmo teste (61,54%).

Ao relacionar o resultado do ML Flow com a classificação clínica, foram observados maiores percentuais de positividade e negatividade, respectivamente, nos grupos MHV e MHDT, como representado na FIGURA 8.

FIGURA 8- Relação entre diagnóstico clínico e o ML Flow.

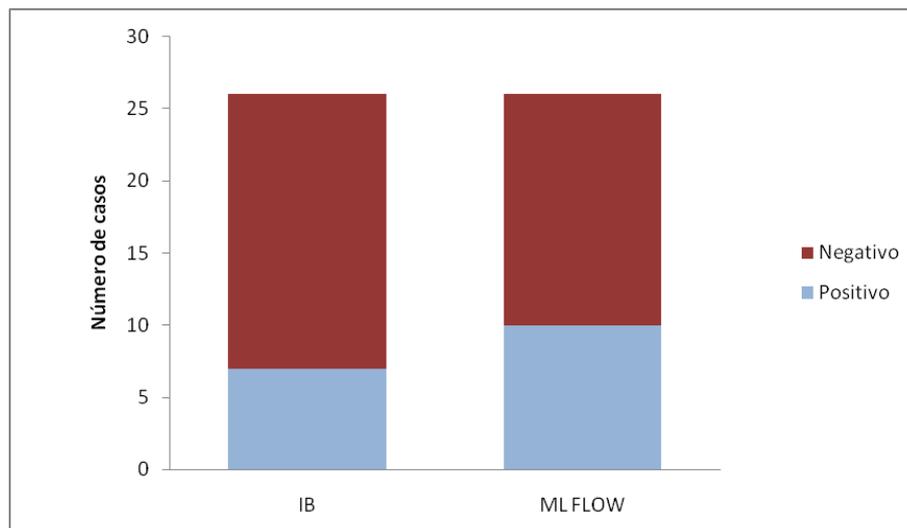


Legenda: MHT (Hanseníase Tuberculóide); MHDT (Hanseníase dimorfa-tuberculóide); MHDD (Hanseníase dimorfa-dimorfa); MHDV (Hanseníase dimorfa-virchowiana); MHV (Hanseníase virchowiana).

Fonte: Figura elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2014 e 2015.

6.1.4 Relação IB e ML FLOW

A relação entre o ML Flow e o índice baciloscópico demonstrou similaridade entre os testes. Como demonstrado, na FIGURA 9 demonstra a proximidade entre as razões ou proporções de casos positivos e negativos dos métodos IB e ML Flow FIGURA 9.

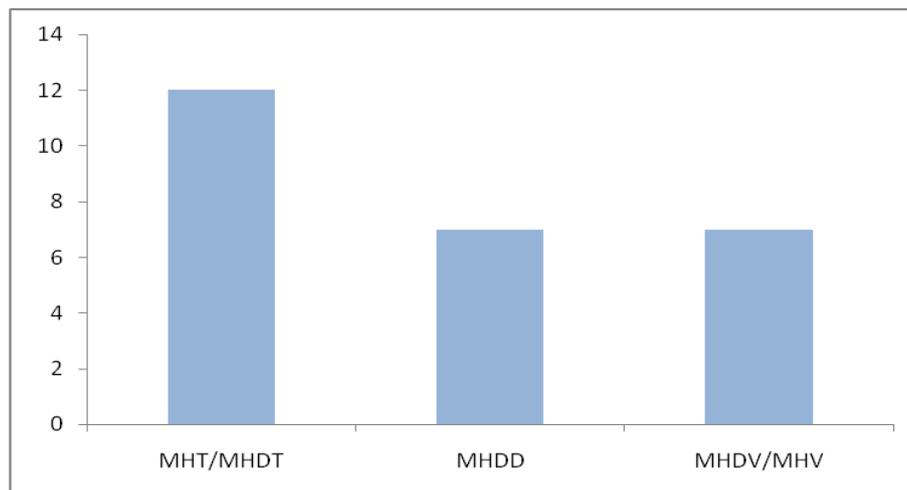
FIGURA 9- Relação entre IB e ML FLOW

Legenda: MHT (Hanseníase Tuberculóide); MHDT (Hanseníase dimorfa-tuberculóide); MHDD (Hanseníase dimorfa-dimorfa); MHDV (Hanseníase dimorfa-virchowiana); MHV (Hanseníase virchowiana).

Fonte: Figura elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2014 e 2015.

6.2 Descrição e comparação dos resultados histopatológicos

Para a descrição e comparação dos resultados histopatológicos e imuno-histoquímicos, as biópsias de pele de cada participante do estudo foram agrupadas. Considerando a origem da amostra, foram estabelecidos os grupos: A) LESÃO e B) CONTRALATERAL (sem lesão). Considerando a classificação histopatológica, foram estabelecidos os subgrupos: 1º) MHT (MHT/MHDT) (n= 12); 2º) MHDD (n=7); e 3º) MHV (MHDV/MHV) (n=7). A FIGURA 10 abaixo apresenta a classificação dos três subgrupos, baseada nos resultados histopatológicos:

FIGURA 10 - Classificação dos casos baseada no diagnóstico histopatológico.

Legenda: MHT (Hanseníase Tuberculóide); MHDT (Hanseníase dimorfa-tuberculóide); MHDD (Hanseníase dimorfa-dimorfa); MHDV (Hanseníase dimorfa-virchowiana); MHDV (Hanseníase virchowiana).

Fonte: Figura elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2014 e 2015.

A análise histopatológica descritiva dos cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) evidenciou alterações nos casos de hanseníase tanto nas amostras de lesão quanto nas contralaterais (QUADRO 3).

Na avaliação entre as amostras de lesão e contralateral de todos pacientes com hanseníase pode-se observar que algumas alterações histopatológicas foram mais evidentes na lesão em relação a contralateral. São elas, hipotrofia ($p=0,26$), degeneração hidrópica ($p=0,029$), a distribuição do infiltrado inflamatório na derme papilar (0,001), na derme reticular ($p=0,000$), localização do infiltrado periglandular ($p=0,008$) e quantidade de macrófagos ($p=0,001$).

Nos casos de MHT foram evidenciadas alterações epidérmicas moderadas e focais. Com destaque para presença de células do infiltrado inflamatório na derme reticular, onde o infiltrado foi acentuado nas amostras do grupo A, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,020$) em relação ao grupo B. Já na derme papilar, o infiltrado inflamatório moderado/acentuado foi observado em todas as amostras do grupo A. As amostras do grupo B apresentaram infiltrado inflamatório discreto. (FIGURA 11).

O infiltrado inflamatório linfocítico perivascular e perianexial, superficial e profundo, presente em todos os casos, estavam presentes também, com sugestiva

tríplice distribuição, nas localizações perineural, periglandular e perimuscular.

Também no subgrupo MHT o dano neural e a presença de macrófagos e granuloma foram observados em amostras do grupo A e B. Em relação ao número de granulomas, a quantidade de 1 a 5 granulomas predominou no grupo A. Essas mesmas alterações não foram encontradas no grupo B.

Os casos classificados como forma MHDD demonstraram ao estudo anátomo-patológico, infiltrado inflamatório periglandular e perimuscular. O infiltrado com distribuição perineural foi significativamente maior no grupo A ($p=0,022$) em relação ao grupo B (FIGURA 12).

A presença de células do infiltrado inflamatório na derme papilar foi mais evidente nas amostras do grupo A em relação às amostras contralaterais (Grupo B), com diferença significativa ($p=0,008$). Também se pode perceber essa mesma diferença no infiltrado na derme reticular com diferença estatisticamente ($p=0,008$).

Notou-se que a presença de macrófagos foi significativamente maior no grupo A ($p=0,002$) comparado ao grupo B. Demais alterações como hipotrofia, degeneração hidrópica e hipertrofias foram evidenciadas em alguns casos, porém sem diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

Nas amostras de pacientes MHV foram observadas características como hipotrofia em amostras tanto do grupo A quanto do grupo B. A degeneração hidrópica somente em uma amostra do grupo B e a presença de macrófagos em todos os casos do grupo A. Não foram observadas diferenças significativas entre as características citadas.

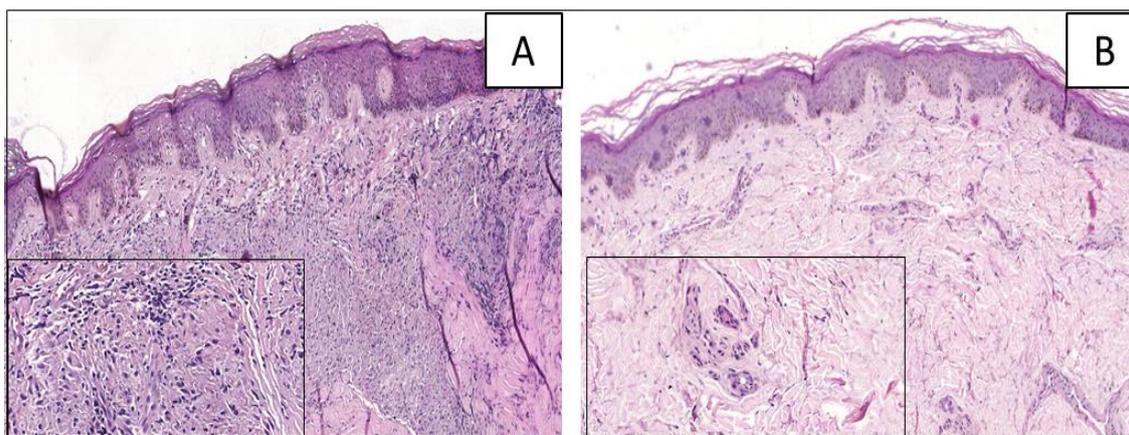
As amostras tanto do grupo A quanto do grupo B apresentaram infiltrado inflamatório difuso constituído predominantemente por linfócitos e com localização perivascular. Contudo, houve uma diferença na presença células do infiltrado inflamatório na derme reticular com diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$). No grupo A o infiltrado se encontrava mais profundo e com maior celularidade (FIGURA 13).

QUADRO 3- Valores estimados de p das alterações histopatológicas nas formas clínicas da hanseníase.

VARIÁVEL	TODOS	MHT	MHDD	MHV
HIPOTROFIA	0,026	0,275	0,094	0,094
HIPERTROFIA	0,976	1,000	1,000	1,000
DEG. HIDRÓPICA	0,029	0,118	0,280	0,280
DERME PAPILAR	0,001	0,113	0,008	0,076
DERME RETICULAR	0,000	0,020	0,008	0,000
PERINEURAL	0,007	0,216	0,022	0,076
PERIMUSCULAR	0,071	0,477	0,094	0,280
PERIGLANDULAR	0,008	0,065	0,139	0,212
DANO NEURAL	0,066	0,435	0,094	0,280
MACRÓFAGO	0,001	0,119	0,002	0,061
GRANULOMA	0,065	0,294	0,280	0,280
NÚM. GRANULOMAS	0,066	0,296	0,280	0,280

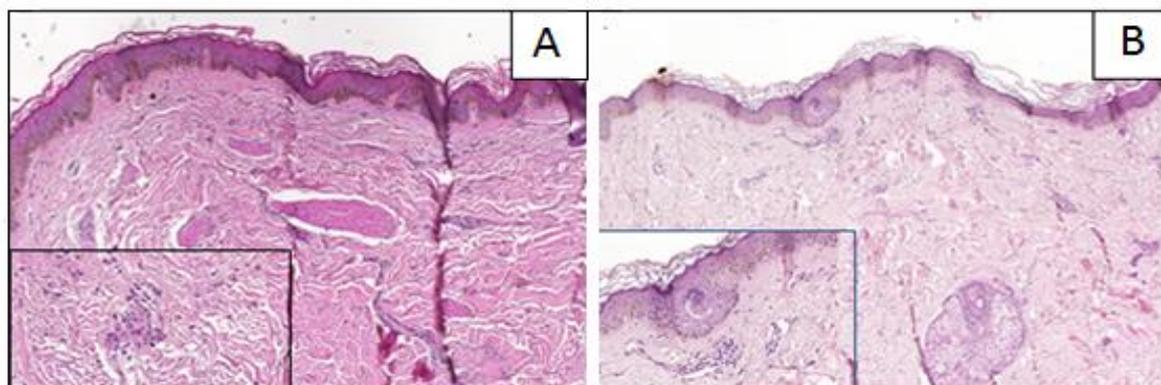
Morfologicamente, o infiltrado inflamatório nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV, podem ser observados, em detalhe, nos painéis das FIGURAS 11 a 13.

FIGURA 11- Infiltrado inflamatório dérmico de casos MHT



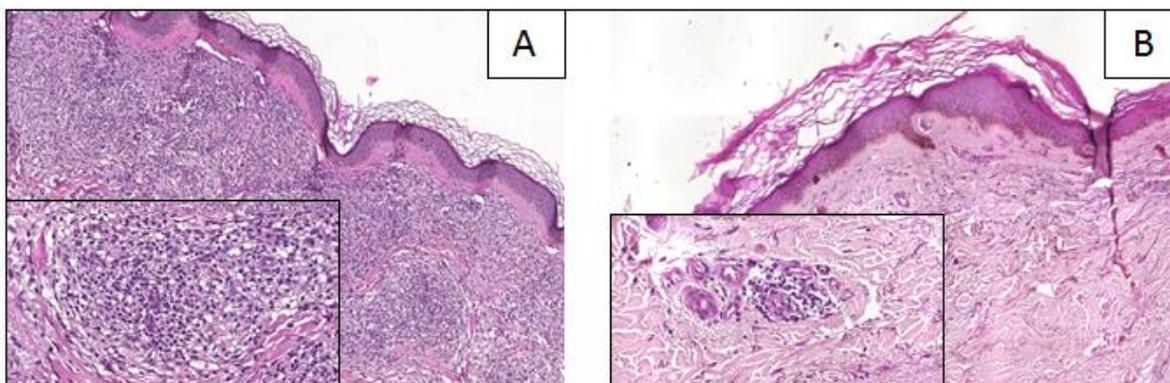
Legenda: A) LESÃO: denso e difuso infiltrado inflamatório na derme reticular, constituído por linfócitos e macrófagos, por vezes formando granulomas (detalhe); B) CONTRALATERAL: discreto infiltrado inflamatório perivascular na derme reticular.

FIGURA 12 - Infiltrado inflamatório dérmico de casos MHDD.



Legenda: A) Grupo LESÃO e B) Grupo CONTRALATERAL mostram pele com focos perivascularares de infiltrado inflamatório linfocitário, com maior celularidade no grupo LESÃO.

FIGURA 13- Infiltrado inflamatório dérmico de casos MHV.



Legenda: A) LESÃO: denso e difuso infiltrado inflamatório na derme reticular, separado da epiderme por faixa de colágeno e constituído por linfócitos e macrófagos; B) CONTRALATERAL: discreto infiltrado inflamatório perivascular na derme reticular.

Os dados histológicos evidenciaram que, na comparação dos grupos A (lesão cutânea) e B (pele contralateral), as amostras de A apresentaram maiores alterações e infiltrado inflamatório abundante. Em relação, ao enfoque quantitativo, as características observadas nas lesões cutâneas foram mais acentuadas que as observada na pele contralateral.

6.3 Descrição e comparação dos resultados imuno-histoquímicos

Foram avaliadas as imunomarcações dos biomarcadores Foxp3, IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-17 quanto à intensidade e distribuição de expressão nos compartimentos epitélio, endotélio e infiltrado inflamatório. Os critérios utilizados para a semi-quantificação da distribuição das células imunorreativas e da intensidade da imunorreação, estão demonstrados na TABELA 6.

TABELA 6- Semi-quantificação da Reatividade Específica do Antígeno.

Intensidade	0	1	2	3
	Negativo	Fracamente Positivo	Moderadamente Positivo	Fortemente Positivo
	Nenhuma coloração celular.	Fraca coloração celular.	Moderada coloração celular.	Forte coloração em celular.
Distribuição	0	1	2	3
	Negativo	Fracamente Positivo	Moderadamente Positivo	Fortemente Positivo
	Nenhuma célula corada.	10-50 células coradas.	50-100 células coradas.	>100 células coradas.

Os resultados da imuno-histoquímica dos biomarcadores Foxp3, IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-17 nos grupos MHT, MHDD e MHV, conforme os critérios da distribuição das células imunorreativas no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio e da intensidade da imunorreação, estão demonstrados nas TABELAS 7 a 11. Nessas tabelas, para cada resultado do nível, são apresentados os valores numéricos inteiros ou contagem para cada grupo, com seus respectivos percentuais no próprio nível (linha) e no próprio grupo (coluna). Escore 0 são resultados basais e 1 de hiperexpressão do biomarcador de interesse.

TABELA 7– Imuno-histoquímica do biomarcador Fox-P3 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.

LOCAL	ESCORE	GRUPO							
		MHT		MHDD		MHV		TODOS	
		n		n		n		n	
		% linha		% linha		% linha		% linha	
% coluna		% coluna		% coluna		% coluna			
		A	B	A	B	A	B	A	B
Epitélio	0	1	0	1	4	0	1	2	5
		100	0	20	80	0	100	28,57	71,43
		8,33	0	14,29	57,14	0	14,29	7,69	19,23
	1	11	12	6	3	7	6	24	21
		47,83	52,17	66,67	33,33	53,85	46,15	53,33	46,67
		91,67	100	85,71	42,86	100	85,71	92,31	80,77
Infiltrado inflamatório	0	6	9	4	3	1	3	11	15
		40	60	57,14	42,86	25	75	42,31	57,69
		50	75	57,14	42,86	14,29	42,86	42,31	57,69
	1	6	3	3	4	6	4	15	11
		66,67	33,33	42,86	57,14	60	40	57,69	42,31
		50	25	42,86	57,14	85,71	57,14	57,69	42,31
Endotélio	0	8	4	4	5	5	4	17	13
		66,67	33,33	44,44	55,56	55,56	44,44	56,67	43,33
		66,67	33,33	57,14	71,43	71,43	57,14	68,38	50
	1	4	8	3	2	2	3	9	13
		33,33	66,67	60	40	40	60	40,91	59,09
		33,33	66,67	42,86	28,57	28,57	42,86	34,62	50

Conforme a TABELA 7 acima, Fox-P3 foi expresso em todas as amostras.

No epitélio houve hiperexpressão de Fox-P3 em 91,67%, 85,71% e 100% dos casos MHT, MHDD e MHV, respectivamente nas amostras A.

No infiltrado inflamatório houve predomínio de células marcadas intensamente nas amostras A dos casos MHV com 85,71%. Já em casos MHT a expressão de Fox-P3 foi basal em 75% das amostras B.

Já no endotélio a expressão de Fox-P3 teve predomínio basal nas amostras A de pacientes MHT (66,67%) e MHV (71,43) e nas amostras B de casos MHDD (57,14%).

Nos critérios “Intensidade” e “Distribuição” não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras A e B em nenhuma forma clínica.

TABELA 8– Imuno-histoquímica da citocina IL-10 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.

LOCAL	SCORE	GRUPO							
		MHT		MHDD		MHV		TODOS	
		n		n		n		n	
		% linha % coluna							
		A	B	A	B	A	B	A	B
Epitélio	0	4	1	1	1	3	1	8	3
		80	20	50	50	75	25	72,73	27,27
		33,33	8,33	14,29	14,29	42,86	14,29	30,77	11,54
	1	8	11	6	6	4	6	18	23
		42,11	57,89	50	50	40	60	43,9	56,1
		66,67	91,67	85,71	85,71	57,14	85,71	69,23	88,46
Infiltrado inflamatório	0	9	8	4	6	3	4	16	18
		52,94	47,06	40	60	42,86	57,14	47,06	52,94
		75	66,67	57,14	85,71	42,86	57,14	61,54	69,23
	1	3	4	3	1	4	3	10	8
		42,86	57,14	75	25	57,14	42,86	55,56	44,44
		25	33,33	42,86	14,29	57,14	42,86	38,46	30,77
Endotélio	0	10	5	4	5	5	7	19	17
		66,67	33,33	44,44	55,56	41,67	58,33	52,78	47,22
		83,33	41,67	57,14	71,43	71,43	100	73,08	65,38
	1	2	7	3	2	2	0	7	9
		22,22	77,78	60	40	100	0	43,75	56,25
		16,67	58,33	42,86	28,57	28,57	0	26,92	34,62

De acordo com a TABELA 8 acima, a citocina IL-10 teve intensa marcação epitelial nas amostras B dos casos MHT (91,67%), MHDD (85,71) e MHV (85,71%).

Já no infiltrado inflamatório a expressão de IL-10 foi predominante basal tanto nos casos A e B de todos os grupos clínicos.

No endotélio destaca-se a marcação basal de 100% das amostras B de pacientes MHV.

Não houve diferença estatística entre a expressão das amostras A e B nos grupos clínicos estudados.

TABELA 9– Imuno-histoquímica do biomarcador IFN- γ nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.

LOCAL	SCORE	GRUPO							
		MHT		MHDD		MHV		TODOS	
		n		n		n		n	
		% linha	% coluna						
		A	B	A	B	A	B	A	B
Epitélio	0	0	0	0	0	1	0	1	0
		*	*	*	*	100	0	100	0
		0	0	0	0	14,29	0	3,85	0
	1	12	12	7	7	6	7	25	26
		50	50	50	50	46,15	53,85	49,02	50,98
		100	100	100	100	85,71	100	96,15	100
Infiltrado inflamatório	0	9	9	4	5	2	4	15	18
		50	50	44,44	55,46	33,33	66,67	45,45	54,55
		75	75	57,14	71,43	28,57	57,14	57,69	69,23
	1	3	3	3	2	5	3	11	8
		50	50	60	40	62,5	37,5	57,89	42,11
		25	25	42,86	28,57	71,43	42,86	42,31	30,77
Endotélio	0	11	11	5	6	6	5	22	22
		50	50	45,45	54,55	54,55	45,45	50	50
		91,67	91,67	71,43	85,71	85,71	71,43	84,62	84,62
	1	1	1	2	1	1	2	4	4
		50	50	66,67	33,33	33,33	66,67	50	50
		8,33	8,33	28,57	14,29	14,29	28,57	15,38	15,38

Conforme a TABELA 9 acima, a citocina IFN- γ apresentou, hiperexpressa em 100% das amostras A e B dos casos de MHT e MHDD na marcação do epitélio.

No infiltrado inflamatório a expressão basal teve predomínio em MHT (75%) e MHDD (71,43%) das amostras B. Em MHV a expressão de IFN- γ foi intensa em 71,43% das amostras A.

A marcação endotelial por IFN- γ foi prevalentemente basal tanto nos casos A e B de todos os grupos clínicos.

Não foram observadas diferenças significativas da expressão de IFN- γ nas amostras A e B nas formas clínicas MHT, MHDD e MHV.

TABELA 10- Imuno-histoquímica da citocina IL-12 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.

LOCAL	SCORE	GRUPO							
		MHT		MHDD		MHV		TODOS	
		n		n		n		n	
		% linha	% coluna						
		A	B	A	B	A	B	A	B
Epitélio	0	3	4	2	4	4	2	9	10
		42,86	57,14	33,33	66,67	66,67	33,33	47,37	52,63
		25	33,33	28,57	57,14	57,14	28,57	34,67	38,46
	1	9	8	5	3	3	5	17	16
		52,94	47,06	62,5	37,5	37,5	62,5	51,52	48,48
		75	66,67	71,43	42,86	42,86	71,43	65,38	61,54
Infiltrado inflamatório	0	8	11	5	5	3	5	16	21
		42,11	57,89	50	50	37,5	62,5	43,24	56,76
		66,67	91,67	71,43	71,43	42,86	71,43	61,54	80,77
	1	4	1	2	2	4	2	10	5
		80	20	50	50	66,67	33,33	66,67	33,33
		33,33	8,33	28,57	28,57	57,14	28,57	38,46	19,23
Endotélio	0	12	12	6	7	7	6	25	25
		50	50	46,15	53,85	53,85	46,15	50	50
		100	100	85,71	100	100	85,71	96,15	96,15
	1	0	0	1	0	0	1	1	1
		*	*	100	0	0	100	50	50
		0	0	14,29	0	0	14,29	3,85	3,85

De acordo com a TABELA 10 acima, no epitélio a citocina IL-12 teve a maioria das amostras B do grupo MHT (57,14%) e MHDD (66,67%), expressas de forma basal. No grupo MHV, a maioria das amostras, equivalente a 66,67%, também teve expressão basal, porém nas amostras A.

Já no infiltrado inflamatório houve prevalência de expressão basal de IL-12 nos grupos MHT, MHDD e MHV nas amostras A e B.

A expressão endotelial da citocina foi de 85,71% basal nas amostras A dos pacientes MHDD e MHV e 100% basal nos casos MHT.

Quanto à expressão de IL-12 nas amostras A e B não houve diferença estatística.

TABELA 11- Imuno-histoquímica da citocina IL-17 nas amostras dos grupos MHT, MHDD e MHV.

LOCAL	SCORE	GRUPO							
		MHT		MHDD		MHV		TODOS	
		n		n		n		n	
		% linha	% coluna						
		A	B	A	B	A	B	A	B
Epitélio	0	0	0	0	0	0	0	26	26
		*	*	*	*	0	0	50	50
	1	0	0	0	0	0	0	100	100
		7	7	12	12	7	7	26	26
		50	50	50	50	50	50	50	50
		100	100	100	100	100	100	100	100
Infiltrado inflamatório	0	0	0	0	0	0	0	26	26
		*	*	*	*	0	0	50	50
	1	0	0	0	0	0	0	100	100
		7	7	12	12	7	7	26	26
		50	50	50	50	50	50	50	50
		100	100	100	100	100	100	100	100
Endotélio	0	0	0	0	0	0	1	0	1
		*	*	*	*	0	100	0	100
	1	0	0	0	0	0	14,29	0	3,85
		7	7	12	12	7	6	26	25
		50	50	50	50	53,85	46,15	50,98	49,02
		100	100	100	100	85,71	100	96,15	

Como demonstrado na tabela 11 acima, observa-se predominância absoluta de hiperexpressão celular de citocina IL-17, em todos os compartimentos e grupos avaliados.

Demonstrando que não ocorreu diferença entre a expressão da citocina nas amostras A e B nos grupos clínicos.

Após a categorização dos níveis de expressão dos biomarcadores Foxp3, IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-17, as proporções dos níveis basal e elevado foram comparadas entre os grupos pele com lesão (A) e pele contralateral (B) dos próprios biomarcadores QUADRO 4.

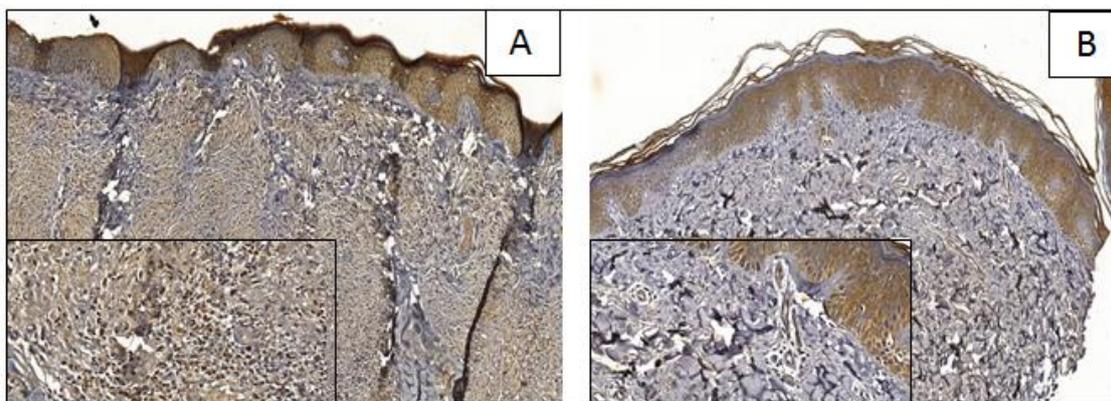
QUADRO 4- Escores de intensidade e distribuição das reações de IHQ.

	TODOS	MHT	MHD	MHV
EP FOX	0,216	0,296	0,061	0,28
II FOX	0,402	0,19	0,589	0,212
EN FOX	0,256	0,083	0,573	0,573
EP IL10	0,081	0,113	1	0,212
II IL10	0,559	0,652	0,212	0,589
EN IL10	0,546	0,02	0,573	0,094
EP IFN	0,308	1	1	0,28
II IFN	0,384	1	0,573	0,259
EN IFN	0,303	1	0,508	0,508
EP IL12	0,734	0,652	0,259	0,259
II IL12	0,071	0,113	1	0,259
EN IL12	0,637	1	0,28	0,28
EP IL17	1	1	1	1
II IL17	1	1	1	1
EN IL17	0,308	1	1	1

Como demonstrado no QUADRO 4 verificou-se que não houve diferenças estatísticas na expressão das citocinas IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ e da proteína Fox-P3 nos diferentes compartimentos, com exceção da marcação endotelial pela IL-10.

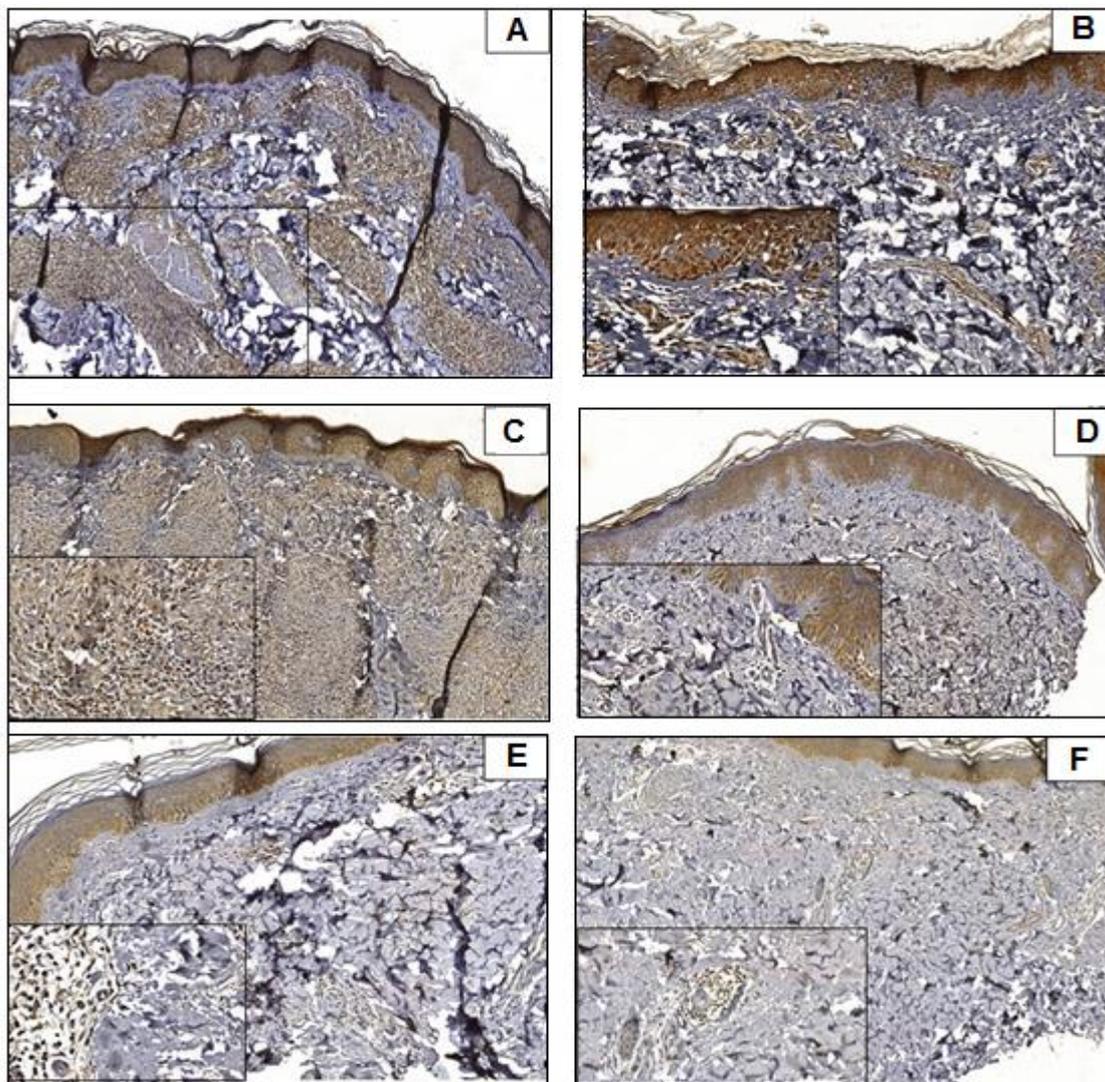
Na comparação dos grupos A e B a imuno-histoquímica não demonstrou diferenças significativas quanto à intensidade da expressão dos biomarcadores estudados, como demonstrado nas FIGURAS 14 e 15.

FIGURA 14- Intensidade da expressão de Foxp3 no infiltrado inflamatório do subgrupo MHT.



Legenda: Intensidade acentuada de expressão de Foxp3 na LESÃO e moderada na pele contralateral (B), porém sem diferença estatística.

FIGURA 15- Expressões de IL-17 no infiltrado inflamatório e Foxp3 e da citocina IFN γ no epitélio em amostras do subgrupo MHV.



Legenda: A) LESÃO com intensa imunoreatividade da IL-17. B) CONTRALATERAL com moderada imunoreatividade da IL-17. Observaram-se em amostras de LESÃO (C e E) inúmeras células marcadas por Foxp3 e IFN- γ , respectivamente. No grupo CONTRALATERAL (D e F) discretas células marcadas por Foxp3 e IFN- γ .

Em síntese, os resultados da imuno-histoquímica não demonstraram diferenças estatisticamente significativas, na comparação dos grupos A (lesão cutânea) e B (pele contralateral) quanto à expressão das citocinas IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ e da proteína Fox-P3 no endotélio, epitélio e infiltrado inflamatório. Ou seja, do ponto de vista imunofenotípico, as características observadas nas lesões cutâneas foi também observada na pele contralateral.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença caracterizada por apresentar formas patológicas, clínicas e imunológicas contrastantes. A resposta imunológica é um componente relevante na patogenia e progressão da doença (RIDLEY; JOPLING, 1966; GOULART *et al.*, 2002; NATH *et al.*, 2014).

No presente trabalho, estudaram-se, pacientes hansenianos na fase pré-tratamento, as características da resposta imune dérmica em lesões de pele, clinicamente evidentes, e comparamos com aquelas observadas na pele contralateral. Para tanto, consideramos o infiltrado inflamatório e a presença *in situ* de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ e IL-12), Th2 (IL-10) Th17 (IL-17) e o fator de transcrição Foxp3(T_{REG}), além das características clínicas e laboratoriais associadas.

Como resultados mais relevantes e originais observados na comparação entre as lesões cutâneas e a pele contralateral, destacou a predominância de diferença nas variáveis histopatológicas e, fundamentalmente, a predominância de similaridade nas variáveis imunopatológicas. Ou seja, foram constatadas diferenças quantitativas no infiltrado inflamatório, com maior celularidade nas lesões cutâneas, e semelhanças qualitativas na ativação imune desse infiltrado inflamatório na pele.

Para obtenção dos resultados, foram utilizados protocolos padronizados dos métodos HE e imuno-histoquímica, seguindo todas as orientações do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG e todas as recomendações dos fabricantes dos insumos dos experimentos, particularmente os anticorpos primários. Entretanto, ao longo da realização dos experimentos, algumas adaptações protocolares foram necessárias para contornar limitações não planejadas, como desprendimentos dos cortes teciduais das lâminas histológicas e ligações inespecíficas dos anticorpos primários.

Os resultados apresentados com relação às avaliações do índice baciloscópico e ML Flow demonstraram 26,92% e 37,04% dos pacientes com IB e ML Flow positivos, respectivamente. Essa soropositividade analisada ao teste de ML Flow foi inferior aos resultados publicados por Lyon (70%) e Grossi (50,8%) em estudos realizados no mesmo centro. A correlação entre o ML Flow e o índice baciloscópico evidenciou associação entre os testes. Esses resultados sugerem que a associação da baciloscopia e o ML Flow auxiliam a classificação dos casos de hanseníase ou, que na carência da baciloscopia, a sorologia pode ser utilizada

Esses dados, corroboram os resultados de Bühner-Sékula *et al.* (2003), que indicam a utilização do ML Flow como um método auxiliar ao exame convencional de baciloscopia, devido sua elevada especificidade.

Em relação aos objetivos específicos do estudo, ou seja, caracterizações e comparações histo e imunopatológica das lesões cutâneas com a respectiva pele contralateral, os resultados demonstraram ocorrência do mesmo padrão histológico na distribuição das células inflamatórias, nos dois sítios de origem da biópsia dos pacientes hansenianos nas diferentes formas clínicas. Apesar de algumas diferenças quantitativas ou numéricas, foram observadas na resposta inflamatória, tanto pelo método HE quanto pela imuno-histoquímica, características qualitativas e funcionais muito similares dos biomarcadores analisados.

Mais detalhadamente, nas amostras do grupo LESÃO de pacientes hansenianos, foi evidenciado infiltrado inflamatório na derme papilar e reticular com grande quantidade de macrófagos. Já nas biópsias contralaterais, foram originalmente observados infiltrados inflamatórios discretos ao redor de vasos, nervos e glândulas, com leve distribuição na derme papilar e derme reticular.

Em relação ao subgrupo MHT, os casos apresentaram padrão histológico típico com infiltrados inflamatórios granulomatoso ao redor de glândulas, nervos e músculos distribuídos na derme papilar e derme reticular. Também foram observados inúmeros macrófagos formando os granulomas. Esses achados estão de acordo com as características histológicas de MHT descritos na literatura (Ridley; Jopling, 1966; Obadia *et al.*, 2011; Massone; Belachew; Schettini, 2014). Nas biópsias contralaterais, foram observados infiltrados inflamatórios em torno de glândulas, com predomínio na derme papilar, não sendo observada formação de granuloma. Assim evidenciou-se que existe a resposta inflamatória na pele sem lesão aparente de pacientes MHT, porém na lesão a resposta imune é mais intensa.

O polo MHDD é citado como mais instável do espectro com infiltração assimétrica da face e acometimento neural também assimétrico (RIDLEY; JOPLING, 1966; MASSONE; *et al.*, 2015; DE-SOUZA *et al.* 2016). Nas diferenças entre os grupos clínicos os pacientes MHDD foram os que apresentaram maiores diferenças entre as biópsias de lesão e contralateral, sendo que na lesão foi visualizado maior infiltrado inflamatório na derme papilar e reticular ($p=0,008$), infiltrado perineural ($p=0,022$) e quantidade de macrófagos ($p=0,002$). Os dados mostram a assimetria do

infiltrado inflamatório típica do grupo clínico e sugere-se que a abundância de celularidade na lesão desses pacientes, implicam em intensa atividade do sistema imune.

O subgrupo MHV apresentou características semelhantes entre a biópsia com lesão e contralateral, sendo a maior quantidade de células inflamatórias na derme reticular das lesões a mais evidente diferença observada entre as biópsias. Esses dados sugerem que, em pacientes MHV, a resposta inflamatória esteja amplamente distribuída. Apóia essa interpretação os achados histológicos semelhantes em amostra sem lesão de pele.

Nas biópsias contralaterais de todas as formas clínicas foram observados infiltrados predominantemente na derme papilar quando comparado à região com lesão, onde o infiltrado foi mais profundo e com maior quantidade de células inflamatórias. Deste modo, interpretamos que pacientes hansenianos apresentam discreta resposta inflamatória em áreas sem lesões ou clinicamente normais.

Após a constatação dessas evidências quantitativas sobre o padrão inflamatório no curso natural da hanseníase, e com o intuito de ampliar a análise histopatológica, realizou-se a IHQ para avaliar a expressão dos mediadores inflamatórios na lesão e região contralateral.

O painel imuno-histoquímico da expressão da citocina IL-17 no infiltrado inflamatório não demonstrou diferenças significantes entre a expressão em biópsias de lesão e contralateral nos subgrupos clínicos.

Da Motta-Passos *et al.*, (2012) detectaram pouca IL-17A no soro de hansenianos e dos controles, sugerindo que a produção e ação desta citocina está limitada aos tecidos. Outro estudo observou maior expressão e liberação de citocinas Th17 no sobrenadante de cultura de PBMC estimuladas com antígeno de *M. leprae*, em indivíduos contatos de pacientes sem sinais da doença ou na borda de lesão de pele de pacientes com a forma clínica MHT quando comparados a pacientes com a forma clínica MHV (SAINI; RAMESH; NATH, 2013). Assim como Saini *et al.*, (2014) que observou aumento de IL-17 em soro de pacientes MHT e em pacientes com hanseníase com subtipo Th não polarizado.

A expressão de IL-17 tanto em pele com lesão e contralateral demonstra que a citocina está expressa nos tecidos de pacientes hansenianos, sugerindo que a citocina esteja ativando a resposta imune e conseqüentemente influenciando o processo inflamatório e exercendo um papel no desenvolvimento e na manutenção de respostas pró-inflamatória como visto no HE em ambas as formas clínicas.

As citocinas IFN- γ e IL-12 são importantes na ativação de macrófagos e potencializam a resposta imune celular (FOSS, 1997; SCOLLARD *et al.*, 2006). As expressões de IFN- γ e IL-12 não mostraram nenhuma diferença significativa nas biópsias de lesão em relação a contralateral nos grupos avaliados. Abdallah *et al.*, (2014) observaram elevações significativas da IL-12 sérica na comparação entre os pacientes com hanseníase com os controles. E aumento IFN- γ em pacientes MHT também em relação aos controles. Além disso, diversos autores relacionam aumento sérico de IL-12 e IFN- γ em pacientes MHT (KIM *et al.*, 2001; LASTÓRIA; DE-ABREU, 2014^a; SADHU *et al.*, 2016). A presença dessas citocinas pró-inflamatória tanto em lesão e área contralateral infere que ativação imunológica pelo *M.leprae* em todos os pacientes hansenianos e como estas citocinas estavam expressas em pacientes da diferentes formas clínicas sugere-se que IL-12 e IFN- γ desempenham papel expressivo na resposta imune ao longo do espectro da hanseníase. Na área contralateral a presença de IL-12 e IFN- γ indicam a atividade da imunidade mediada por células ocasionando a discreta lesão tecidual evidenciada no HE.

Quanto à expressão de IL-10 também não foi observada diferença quanto a expressão na lesão em relação a contralateral. Dados de Modlin *et al.*, (1988) Palermo *et al.*, (2012), Saini *et al.*, (2014) e Sadhu *et al.*, (2016) destacam elevação sérica na expressão de IL-10 em pacientes MHV, quando comparados aos pacientes MHT, sugerindo que o aumento na expressão de IL-10 em MHV pode estar relacionado com a característica anérgica dessa forma clínica. No entanto, dados de Iyer *et al.*, (2007) mostraram não haver diferenças nos níveis séricos da citocina entre as formas clínicas da hanseníase, classificadas no estudo apenas como paucibacilar e multibacilar.

A IL-10 é importante nos mecanismos supressores pelas T_{REGs} e a presença da citocina é comum em infiltrado inflamatório de pacientes MHV, correlacionando com a persistência bacilar (Palermo *et al.*, 2012). Neste sentido pode sugerir que na pele lesionada o ambiente imunológico esteja mais ativo devido à atividade reguladora de IL-10.

Com relação ao mecanismo de imunorregulação foi avaliada a expressão do fator de transcrição Foxp3 que é o marcador mais específico de células T_{REG}. Essas células estão associadas com a prevenção do dano tecidual induzida pela resposta imune. Em contrapartida, caso a regulação da resposta imune celular seja exacerbado pode contribuir para o crescimento e persistência do patógeno (BELKAID, 2008).

Os dados não demonstraram diferença na expressão de Foxp3 nas amostras de

lesão em relação à área contralateral. Parente *et al.*,(2015) observaram células positivas para Foxp3 presentes em 100% das amostras de pele investigadas e estavam intensamente relacionadas com células do epitélio ou macrófagos, sugerindo uma possível interação funcional entre T_{REG} e histiócitos.

A análise de Foxp3 em sangue periférico demonstra maior frequência de células em pacientes MHV (Palermo *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013; Saini *et al.* 2014; Sadhu *et al.*,). Parente *et al.*, (2015) destacam que maiores expressões de Foxp3 foram observadas em pacientes em surto reacional ou MHV. Em contrapartida estudos de Attia *et al.*, 2010; Abdallah *et al.*, 2014 comparando diferentes subgrupos de pacientes indicou que a frequência de T_{REGs} foi maior em pacientes com MHT e em surto reacional do tipo 1.

O papel de Foxp3 na etiopatogenia da hanseníase ainda não é bem esclarecido, porém sugere-se que células T_{REG} pode ter um papel relevante na patogenia da hanseníase, visto sua presença em todas as amostras das diferentes formas clínicas e que essas células exerçam um papel de regulação da resposta imune contra o *M. leprae* atenuando a ativação imune crônica induzida pelo bacilo.

Todos os biomarcadores analisados apresentaram expressões semelhantes na lesão e área contralateral, indicando que a ativação dessas moléculas se dá de forma generalizada e não apenas circunscrita à lesão.

Em conjunto, os resultados sugerem que a resposta imune cutânea contra a hanseníase parece ser ativa tanto nas áreas lesionadas quanto nas áreas contralaterais aparentemente indenes. Não existe diferença na composição celular da lesão e contralateral, mas há maior número de células ativas e expressando os biomarcadores na lesão. O balanço entre os níveis de expressão de cada biomarcador auxiliam na manutenção e desenvolvimento da resposta imunológica na hanseníase, promovendo a heterogeneidade de cada forma clínica.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

O infiltrado inflamatório pode ser evidenciado em intensidade significativamente maior na lesão em relação a pele contralateral aparentemente indene.

A resposta imune na pele de pacientes com hanseníase apresenta expressão de Foxp3 e IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-17 tanto nas áreas lesionadas quanto nas áreas contralaterais aparentemente indenas.

A resposta imune na pele de pacientes com hanseníase se apresenta tanto nas áreas lesionadas quanto nas áreas contralaterais aparentemente indenas, demonstrando a ocorrência da ativação imune sistêmica pelo *M. leprae* em todas as manifestações clínicas da doença.

9 REFERÊNCIAS

ABDALLAH M, ATTIA EA, SAAD AA, EL-KHATEEB EA, LOTFI RA, ABDALLAH M, EL-SHENNAWY D. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-reg cells. *Exp Dermatol*. 2014 Oct;23(10):742-7. doi: 10.1111/exd.12529. PubMed PMID: 25109693.

AGGARWAL S, ALI S, CHOPRA R, SRIVASTAVA A, KALAIARASAN P, MALHOTRA D, GOCHHAIT S, GARG VK, BHATTACHARYA SN, BAMEZAI RN. Genetic variations and interactions in anti-inflammatory cytokine pathway genes in the outcome of leprosy: a study conducted on a MassARRAY platform. *J Infect Dis*. 2011 Oct 15;204(8):1264-73. doi: 10.1093/infdis/jir516. PubMed PMID: 21917900.

ALVARADO-ARNEZ LE, AMARAL EP, SALES-MARQUES C, M B DURÃES S, C CARDOSO C, NUNES SARNO E, G PACHECO A, C F LANA F, OZÓRIO MORAES M. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A Meta-analysis. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0136282.

ATTIA EA, ABDALLAH M, SAAD AA, AFIFI A, EL TABBAKH A, EL-SHENNAWY D, ALI HB. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol*. 2010 Oct;49(10):1152-8. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04535.x. PubMed PMID: 20883403.

BARRETO JA, CARVALHO CV, CURY FILHO M, GARBINO JA, NOGUEIRA MES, SOARES CT. Hanseníase multibacilar com baciloscopia dos esfregaços negativa: a importância de se avaliar todos os critérios antes de se definir a forma clínica. *Hansenol Int*. 2007; 32(1):75-9.

BELKAID Y. Role of foxp3-positive regulatory T cells during infection. *European Journal of Immunology*. V. 38, p. 901-937, 2008.

BHAT RM, PRAKASH C (2012) Leprosy: an overview of pathophysiology. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012: 181089.

BLUESTONE JA, ABBAS AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):253-7. Review. PubMed PMID: 12658273.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 54p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Situação Epidemiológica - Dados Coeficientes de prevalência e detecção em hanseníase Brasil, 2005 a 2014. Brasília - DF, 2015. Disponível: portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniaze/11298-situacao-epidemiologica-dados

BRATSCHI MW, STEINMANN P, WICKENDEN A, GILLIS TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Lepr Rev.* 2015 Jun;86(2):142-55. Review. PubMed PMID: 26502685.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. *Lancet*, Nova Iorque, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, abr. 2004.

BÜHRER-SÉKULA S, CUNHA MG, FERREIRA WA, KLATSER PR The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;74:197-201.

DA MOTTA-PASSOS I, MALHEIRO A, GOMES NAVECA F, DE SOUZA PASSOS LF, RIBEIRO DE BARROS CARDOSO C, DA GRAÇA SOUZA CUNHA M, PÔRTO DOS SANTOS M, VILLAROUÇO SILVAGA, SILVA FRAPORTI L, DE PAULA L. Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. *Eur J Dermatol.* 2012 Jul-Aug;22(4):488-94. doi: 10.1684/ejd.2012.1741. PubMed PMID: 22641009.

DE SOUZA VN, IYER AM, LAMMAS DA, NAAFS B, DAS PK. Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. *Clin Dermatol.* 2016 Jan-Feb;34(1):82-95. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.013. Epub 2015 Nov 6. PubMed PMID: 26773628.

EICHELMANN K, GONZÁLEZ GONZÁLEZ SE, SALAS-ALANIS JC, OCAMPO-CANDIANI J. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr.* 2013 Sep;104(7):554-63. doi: 10.1016/j.adengl.2012.03.028. Epub 2013 Jul 17. Review. PubMed PMID: 23870850.

FOSS NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1999; 30: 335-9

GOULART IM, PENNA GO, CUNHA G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Jul-Aug;35(4):365-75. Review. Portuguese. PubMed PMID: 12170333.

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

GULIA A, FRIED I, MASSONE C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. *F1000 Med Rep.* 2010 Apr 27;2. pii: 30. doi: 10.3410/M2-30. PubMed PMID: 20948855; PubMed Central PMCID: PMC2948396

HALL A. Conference Scene: T-cell subset phenotype and function. *Immunotherapy.* 2011 Jun;3(6):719-21. doi: 10.2217/imt.11.58. PubMed PMID: 21668307.

HANSEN G. H. A., "Investigations concerning the etiology of leprosy," Norsk Magazin for Lægevidenskaben, vol. 4, pp. 1–88, 1874 (Norwegian)

ITO N, OHTA K. Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Dev Growth Differ.* 2015 May;57(4):305-12. doi: 10.1111/dgd.12209. Epub 2015 Apr 10. Review. PubMed PMID: 25866152.

KIM J, UYEMURA K, VAN DYKE MK, LEGASPI AJ, REA TH, SHUAI K, MODLIN RL. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):779-86. PubMed PMID: 11441083.

KIRCHHEIMER WF, STORRS EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971 Jul-Sep;39(3):693-702. PubMed PMID: 4948218.

LASTÓRIA JC, ABREU MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol.* 2014 Mar-Apr;89(2):205-18. Review. PubMed PMID: 24770495; PubMed Central PMCID: PMC4008049.

LASTÓRIA JC, DE ABREU MA. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. *An Bras Dermatol.* 2014; 89(3): 389-401.

LOCKWOOD DN, SARNO E, SMITH WC. Classifying leprosy patients--searching for the perfect solution? *Lepr Rev.* 2007 Dec;78(4):317-20. PubMed PMID: 18309704.

LOCKWOOD DN, SUNEETHA L, SAGILI KD, CHADUVULA MV, MOHAMMED I, VAN BRAKEL W, SMITH WC, NICHOLLS P, SUNEETHA S. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Dec;5(12):e1327. doi: 10.1371/journal.pntd.0001327. Epub 2011 Dec 13. PubMed PMID: 22180790; PubMed Central PMCID: PMC3236729.

LIU TC, YEN LZ, YE GY, DUNG GJ. Histology of indeterminate leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1982 Jun;50(2):172-6. PubMed PMID: 6749705.

LOWY L, RIDLEY DS. 1954. The acid-fast staining properties of *Mycobacterium leprae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 48:406-410.

LYON S. Estudo comparativo da carga bacilar em casos novos de hanseníase e o resultado do Teste Sorológico MI Flow. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

LYON S, LYON AC, CASTORINA-SILVA R, GROSSI MAF, LYON SH, BÜHRER-SÉKULA S, ROCHA MOC. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. *Leprosy Review* 79: 1-9, 2008

KOWALSKA M, KOWALIK A. Mycobacterium leprae: pathogenic agent in leprosy. Discovery of new species Mycobacterium lepromatosis. Perspectives in research and diagnosis of leprosy. *Int Marit Health*. 2012;63(4):213-8. Review. PubMed PMID: 24595978.

MASSONE, C., BELACHEW, W.A., AND SCHETTINI, A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clin Dermatol*. 2014; 33: 38–45

MENDONÇA, VANESSA AMARAL, COSTA, ROSANE DIAS, MELO, GUSTAVO EUSTÁQUIO BRITO ALVIM DE, ANTUNES, CARLOS MAURÍCIO, & TEIXEIRA, ANTONIO LÚCIO. (2008). Imunologia da hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 83(4), 343-350.

MIRANDA AM, ANTUNES SL, NERY JA, SALES AM, PEREIRA MJ, SARNO EN. Erythema multiforme in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:34-42.

MODLIN RL, MELANCON-KAPLAN J, YOUNG SMM, PIRMEZ C, KINO H, CONVIT J, *et al*. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:1213-7.

NATH, I., SAINI, C., AND VALLURI, V.L. Immunology of human leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol*. 2014; 33: 90–98

NERY JA, VIEIRA LMM, MATOS HJ, GALLO MEN, SARNO EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40: 363-70,1999

NERY JAC, DUPPRE NC, SALES AM, JARDIM MR, ILLARRAMENDI X, MACHADO AM. Contribution to diagnosis and management of reactional states: a practical approach. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 81:367-375, 2006.

NESTLE FO, DI MEGLIO P, QIN J-Z, NICKOLOFF BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(10):679-691. doi:10.1038/nri2622.

NG TH, BRITTON GJ, HILL EV, VERHAGEN J, BURTON BR, WRAITH DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol*. 2013 May 31;4:129. doi: 10.3389/fimmu.2013.00129. eCollection 2013. PubMed PMID: 23755052; PubMed Central PMCID: PMC3668291.

OBADIA DLL, VERARDINO G, ALVES MFGS. Hanseníase: correlação clínico-histopatológica. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2011;10(1):20-23

OPROMOLLA, D.V.A. Noções de Hansenologia. 1. ed. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. 13p.

PALERMO ML, PAGLIARI C, TRINDADE MA, YAMASHITAFUJI TM, DUARTE AJ, CACERE CR, *et al*. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(5):878-83.

PARENTE JN, TALHARI C, SCHETTINI AP, MASSONE C. T regulatory cells (TREG) (TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An Bras Dermatol.* 2015 Jan-Feb;90(1):41-7. doi:10.1590/abd1806-4841.20153311. PubMed PMID: 25672298; PubMed Central PMCID:PMC4323697.

PARKASH O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Jan;55(1):1-5. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00491.x. Epub 2008 Nov 13. Review. PubMed PMID:19040664.

QUARESMA, J.A.S. et al. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. *Microbial Pathogenesis*, Belém, v. 76, n. 1, p. 84-8, nov. 2014.

RAMAKRISHNAN L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 20;12(5):352-66. doi: 10.1038/nri3211. Review. PubMed PMID:22517424.

REES RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed) *Leprosy*, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York, p. 31-52, 1985.

REIBEL F, CAMBAU E, AUBRY A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015 Sep;45(9):383-93. doi: 10.1016/j.medmal.2015.09.002. Epub 2015 Oct 1.

RICHMOND JM, HARRIS JE. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Dec 1;4(12):a015339. doi:10.1101/cshperspect.a015339. Review. PubMed PMID: 25452424.

RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34:255-273

SADHU S, KHAITAN BK, JOSHI B, SENGUPTA U, NAUTIYAL AK, MITRA DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jan 11;10(1):e0004338. doi: 10.1371/journal.pntd.0004338. eCollection 2016 Jan. PubMed PMID: 26751584; PubMed Central PMCID: PMC4709061.

SAINI C, RAMESH V, NATH I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jul 25;7(7):e2338. doi: 10.1371/journal.pntd.0002338. Print 2013. PubMed PMID: 23936569; PubMed Central PMCID: PMC3723566.

SAINI C, RAMESH V, NATH I (2014) Increase in TGF- β Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1): e2639. doi: 10.1371/journal.pntd.0002639

SALMON JK, ARMSTRONG CA, ANSEL JC. The skin as an immune organ. *West J Med.*1994 Feb;160(2):146-52. Review. PubMed PMID: 8160465; PubMed Central PMCID: PMC1022320.

SAUER ME, SALOMÃO H, RAMOS GB, D'ESPINDULA HR1, RODRIGUES RS1, MACEDO WC1, SINDEAUX RH2, MIRA MT3. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. *Clin Dermatol.* 2015 Jan-Feb;33(1):99-107. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.001.

SHEPARD C. 1962 . Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse *International Journal of Leprosy.* 30:291-306.

SHEPARD CC. Temperature Optimum of *Mycobacterium leprae* in Mice. *Journal of Bacteriology.* 1965;90(5):1271-1275.

SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):338-81. Review. PubMed PMID: 16614253; PubMed Central PMCID: PMC1471987.

SILVA CA, DANELISHVILI L, MCNAMARA M, BERREDO-PINHO M, BILDFELL R, BIET F, RODRIGUES LS, OLIVEIRA AV, BERMUDEZ LE, PESSOLANI MC. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013 Jul;81(7):2645-59. doi: 10.1128/IAI.00147-13. Epub 2013 May 13. PubMed PMID: 23670556; PubMed Central PMCID: PMC3697615.

SILVESTRE MPS, AMADOR LLNGC. Hanseníase: considerações sobre o desenvolvimento e contribuição (institucional) de instrumento diagnóstico para vigilância epidemiológica. *Rev Pan-Amaz Saude.* doi.org/10.5123/s2176-62232016000500010.

STEFANI, MMA. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba*, v. 41, n. supl. 2, p. 89-94, 2008.

TAKANO K, KONDO A, KUROSE M, YAMASHITA K, NOMURA K, OBATA K, MURAYAMA K, ITO F, HIMI T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol.* 2016;77:98-104. doi:10.1159/000441884. Epub 2016 Apr 26. PubMed PMID: 27115669.

TALHARI C, TALHARI S, PENNA GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol.* 2015 Jan-Feb;33(1):26-37. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.002. Review. PubMed PMID: 25432808.

TELES DO, SHERLOCK J, MELO EV, ROLLEMBERG KCV, PAIXAO TRS, YASMIN ABUAWAD G, SIMON MV, *et al.* (2013). Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* doi:10.1590/0037-8682-0100-2013

TORRADO E, COOPER AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Dec;21(6):455-62. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.10.004. Epub 2010 Nov 12. Review. PubMed PMID: 21075039; PubMed Central PMCID: PMC3032416.

WALKER SL, LOCKWOOD DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull.* 2006;77-78:103-21. Epub 2006 Nov 7. Review. PubMed PMID: 17090777.

WALKER SL, LOCKWOOD DNJ (2008) Leprosy Type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev* 79:372–386

VAN BRAKEL WH, SIHOMBING B, DJARIR H, BEISE K, KUSUMAWARDHANI L, YULIHANE R, KURNIASARI I, KASIM M, KESUMANINGSIH KI, WILDER-SMITH A. Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. *Glob Health Action.* 2012;5. doi: 10.3402/gha.v5i0.18394. Epub 2012 Jul 20. PubMed PMID: 22826694; PubMed Central PMCID: PMC3402069.

WHO (1982). Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical report series 675. World Health Organization, Geneva.

WHO (1988) Expert Committee on Leprosy: fifth report. Technical report series 678. World Health Organization, Geneva.

WHO (1997). Leprosy elimination campaigns - reaching every patient in every village. *Weekly Epidemiological Record* d, v. 72, n. 28, p. 205–212, 1997.

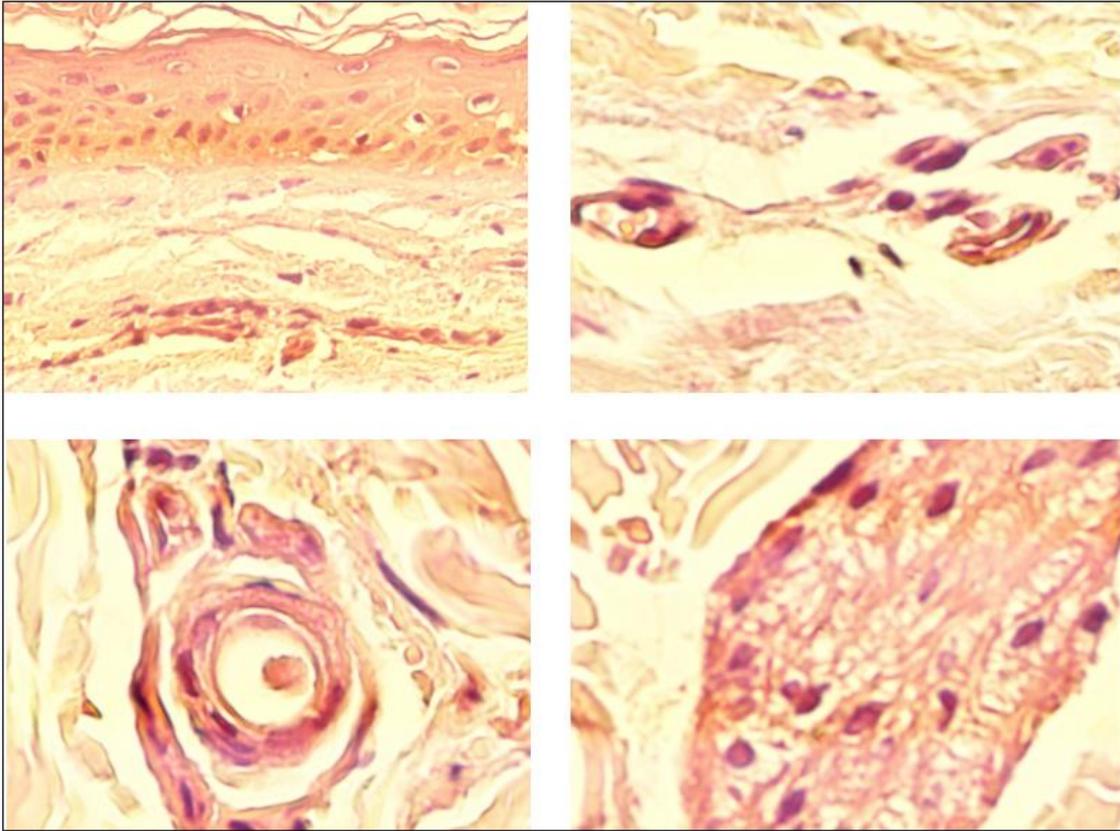
WHO (2014). Global Health Observatory data repository - Neglected tropical diseases. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A1629NTD?lang=en>

ANEXOS

ANEXO A

FOTO CONTROLE HE

He Negativo Para Hanseníase



ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 14887414.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de março de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo Mycobacterium leprae e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa

TÍTULO: “Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae* e sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase”.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário (você pode escolher se quer participar ou não). Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar aos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa. Esta pesquisa irá estudar a Hanseníase, uma doença que acomete pele e nervos e que pode causar grandes deformidades. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, podendo ajudar na prevenção, no tratamento das deformidades provocadas pela doença e melhora da qualidade de vida do paciente. Será colhida uma pequena amostra de sangue (35 mL) em tubos estéreis para as dosagens bioquímicas e imunológicas. E também será realizada uma biópsia de pele. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença. Se você concordar em participar, você estará ajudando diversos pesquisadores a entender melhor a hanseníase e como se pode melhorar seu tratamento e a cura dos doentes. Assim, poderá ajudar muitas pessoas que, como você, hoje estão com essa doença ou que podem vir a ficar doentes no futuro. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento nenhum para participar da pesquisa; a qualquer momento, você poderá desistir de fazer parte dela, sem qualquer prejuízo.

“Depois de ter lido este documento todo e ter resolvido minhas dúvidas com um dos pesquisadores, eu declaro que concordo com seus termos e aceito participar desta pesquisa.”

O TCLE será assinado em duas vias e uma delas, será entregue ao voluntário da pesquisa.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na Hanseníase, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos saudáveis que constituirão o grupo controle.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, supervisor da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você

tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – (31) 3409-9547

Coordenadora_supervisão clínica: Dra. Sandra Lyon (Médica Coordenadora do Serviço de Dermatologia no Hospital Eduardo de Menezes)

Pós-doutoranda: Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG/FIOCRUZ) _ (31) 3349-7778

Colaboradores:

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Ass. do paciente ou responsável: _____

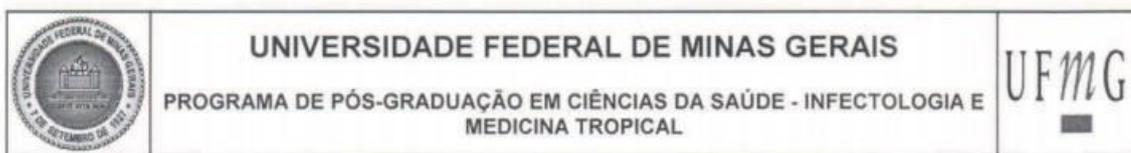
Ass. da testemunha: _____

Ass. do orientando: _____

Ass. do pesquisador responsável (orientador): _____

ANEXO D

CÓPIA DA ATA DA DEFESA



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA
KARINA DE SOUSA PAULA**

Realizou-se, no dia 05 de julho de 2016, às 14:00 horas, Sala 062 - andar térreo de Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 296ª defesa de dissertação, intitulada "*Caracterização imuno-histopatológica das lesões cutâneas e pele contralateral em novos casos de Hanseníase*", apresentada por KARINA DE SOUSA PAULA, número de registro 2014656201, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha - Orientador (UFMG), Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier - coorientador (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves – coorientadora (UFMG), Prof. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG) e Prof. Antonio Carlos Martins Guedes (UFMG).

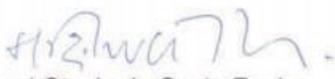
A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

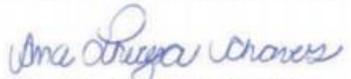
Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 05 de julho de 2016.


Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha

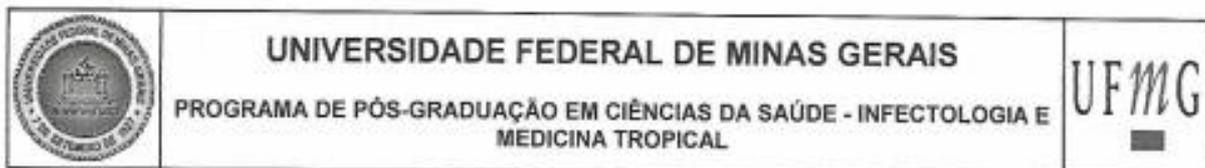

Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier


Dra. Ana Thereza Chaves


Prof. Ricardo Toshio Fujiwara


Prof. Antonio Carlos Martins Guedes

ANEXO E



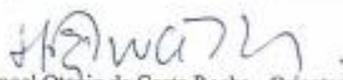
FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Caracterização imuno-histopatológica das lesões cutâneas e pele
contralateral em novos casos de Hanseníase"**

KARINA DE SOUSA PAULA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Infectologia e Medicina Tropical.

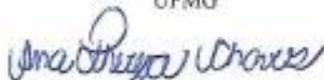
Aprovada em 05 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:



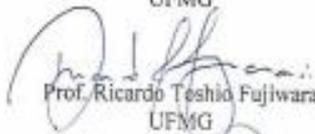
Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha - Orientador
UFMG



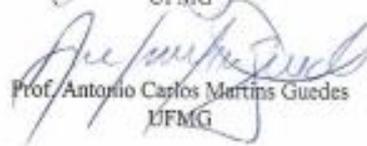
Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier - Coorientador
UFMG



Dra. Ana Thelma Chaves - coorientadora
UFMG



Prof. Ricardo Teshio Fujiwara
UFMG



Prof. Antonio Carlos Martins Guedes
UFMG