



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Patologia
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Francisco Bezerra de Almeida Neto

**REGULAÇÃO DA INTERLEUCINA 17, DE CÉLULAS TH17 E INTERFERON- γ EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE HANSENÍASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
PARÂMETROS CLÍNICOS**

Recife
2012

FRANCISCO BEZERRA DE ALMEIDA NETO

**REGULAÇÃO DA INTERLEUCINA 17, DE CÉLULAS TH17 E INTERFERON- γ EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE HANSENÍASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
PARÂMETROS CLÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia

Co-orientadora: Prof^a. Dra Vláudia Maria Assis Costa

**Recife
2012**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A447r Almeida Neto, Francisco Bezerra de.
Regulação da interleucina 17, de células Th17 e interferon-γ em indivíduos portadores de hanseníase e sua associação com parâmetros clínicos / Francisco Bezerra de Almeida Neto. – 2012.
103 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2012.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hanseníase. 2. Linfócitos. 3. Th1. 4. Th17. Interleucina-17. 5. Interferon-γ. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-057)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
Centro de Ciências da Saúde – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE
Fone/Fax: (81) 2126.8529
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) – térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>

***DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.***

AUTOR: FRANCISCO BEZERRA DE ALMEIDA NETO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

NOME DA DISSERTAÇÃO: “REGULAÇÃO DA INTERLEUCINA-17, DE CÉLULAS TH17 E INTERFERON- γ EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HANSENÍASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS”.

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA BERNADETE DE SOUSA MAIA

CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. VLÁUDIA MARIA DE ASSIS COSTA

APROVADO EM: 31 DE AGOSTO DE 2012

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof. Dra. Valdênia Maria Oliveira Souza

Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena

Este trabalho é dedicado à minha mãe, Terezinha de Jesus Araújo Almeida, aos meus avôs maternos, Francisco Bezerra de Almeida e Nita Araújo Almeida (*in memoriam*) e à minha tia, Zilda Maria Araújo Almeida cujos esforços, dedicação e amor de toda uma vida, permitiram-me chegar até a sua conclusão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia, que, em meio a tantas atribuições dedicou alguns momentos de sua vida à minha pessoa, guiando meus passos trôpegos desde o início até a finalização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dra Vláudia Maria de Assis Costa, que transformou em realidade este sonho, sempre paciente e cordata, atendendo a todas as minhas solicitações e prestimosa a esclarecer todas as minhas dúvidas.

À Enf. Erika Virgínia Julião de Lima, que não mensurou esforço para colaborar com o que lhe fosse possível a fim de auxiliar-me na exequividade deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, que, em momentos de dúvidas e incertezas encorajou-me a seguir adiante.

À Prof^a Adriana Di Donato Chaves, que muito contribuiu para a lapidação de minhas apresentações e que em minha pessoa depositou créditos e confiança.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Patologia, meu reconhecimento, agradecimento e admiração eterna.

Ao Mestre Professor Substituto do Departamento de Farmacologia da UFPE Eryvelton de Souza Franco, cujo jovem brilhantismo e todos os prestimosos aconselhamentos, serviram-me de exemplo em minha maturidade, impulsionando-me a seguir em frente.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Patologia-CCS/UFPE, especialmente na pessoa da Sra. Margareth Valdevino, cujo trabalho extrapola as atribuições profissionais em nítidas demonstrações de carinho e humanidade.

À minha prima-irmã, Ana Cristina Neves Almeida por generosamente acolher-me em seu lar e ser sempre prestimosa em colaborar com a minha pessoa em tudo o que possível lhe for.

Aos meus primos-sobrinhos e filhos em meu coração, Frank Coelho Barbosa Júnior e Felipe Augusto Almeida Barbosa, que ora se iniciam em suas vidas profissionais e me complementam a razão de existir.

Ao acadêmico de Biomedicina Antônio Francisco de Oliveira Filho, que se aventurando no mundo novo da iniciação científica, mostrou dedicação, habilidade e comprometimento com a causa que abraçou.

Aos pacientes que, a despeito de serem vítimas da hanseníase, permitiram-se solidariamente participar desta pesquisa, vislumbrando a possibilidade de minimizar o sofrimento de outros, em um inquestionável exemplo de doação ao próximo.

A Adêmiton Mariano Rocha de Lemos Júnior, que, mesmo à distância, esteve sempre prestimoso a ouvir-me e amparar-me, compartilhando alegrias e minimizando desventuras em todos os momentos da minha vida.

A José Amâncio da Silva Sobrinho, cujos prestimosos serviços possibilitam minhas realizações pessoais.

Aos meus amigos particulares, que dedicaram e dedicam suas preciosas horas vagas em meu auxílio.

À espiritualidade amiga e invisível aos meus olhos físicos, mas que sempre me intuiu e me inspirou, permitindo e tornando possível o término de apenas mais uma etapa de minha constante evolução.

Ainda que dos dez, somente um tenha voltado para agradecer, haveria alguém neste mundo que houvesse se importado com os outros nove?

(Francisco Almeida)

RESUMO

Estudos acerca da imunologia da hanseníase são fundamentais para o entendimento das diversas formas de manifestação clínica da doença, bem como para elaborar novas perspectivas no desenvolvimento de futuras estratégias direcionadas a possibilidades de profilaxia. Linfócitos T_H1 são elementos cruciais na resposta imunológica contra micobactérias. Nestas doenças, os linfócitos T_H17 e uma das suas principais citocinas, a interleucina-17 tem demonstrado serem imprescindíveis na elaboração de uma resposta imunológica eficaz, podendo direcionar o padrão de respostas imunológicas para o polo T_H1 ou T_H2 . Na hanseníase, o envolvimento dos linfócitos T_H17 e da interleucina-17 é desconhecido. Este trabalho acrescenta mais um capítulo ainda não investigado nos aspectos imunológicos que envolvem a hanseníase, identificando os linfócitos T_H17 e a interleucina-17 em pacientes portadores de hanseníase antes e durante o tratamento poliquimioterápico, comparando os resultados entre pacientes paucibacilares e multibacilares e também os investigando em relação ao interferon- γ , citocina que reconhecidamente promove efeito imunológico protetor, e que parece estabelecer mecanismos reguladores importantes em relação à frequência de linfócitos T_H17 e de interleucina-17. Foram analisadas amostras de sangue total de pacientes de hanseníase no momento do diagnóstico e ao segundo mês de tratamento. As amostras foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e com o bacilo de Calmete-Guerin (BCG). Posteriormente procedeu-se a detecção das citocinas intracitoplasmáticas e análise das amostras em citômetro de fluxo (FACScalibur™, BD Pharmingen®). Foi observado que, em pacientes com as formas multibacilares da hanseníase, existe uma frequência significativamente menor de células T_H17 . Além disto, percebeu-se uma produção de interferon- γ e de interleucina-17 também significativamente menor em relação aos pacientes portadores das formas paucibacilares, e ainda uma correlação positiva entre os níveis destas mesmas citocinas, após estímulo com a PHA e o BCG em ambos os grupos estudados. Nos pacientes multibacilares após o início da poliquimioterapia, houve uma expansão na frequência de células T_H17 e também um incremento na produção de ambas as citocinas. Nos pacientes paucibacilares, não houve modificação no perfil imunológico encontrado anteriormente à poliquimioterapia. Os resultados sugerem que os linfócitos T_H17 e a IL-17 participam ativamente na elaboração da resposta imune da hanseníase, e a sua frequência está diretamente relacionada a um efeito imunológico protetor, que contribui para a promoção da cura dos pacientes com hanseníase.

Palavras-Chave: Hanseníase. Linfócitos. T_H1 . T_H17 . Interleucina-17. Interferon- γ .

ABSTRACT

Studies on the immunology of leprosy are fundamental to the understanding of the various forms of clinical manifestation of the disease and to develop new perspectives in the development of future strategies aimed at prevention possibilities. T_H1 lymphocytes are crucial elements in the immune response against mycobacteria. In these diseases, lymphocytes T_H17 and one of its key cytokines, interleukin-17 have been shown to be essential in developing an effective immune response, and may direct the pattern of immune responses to T_H1 or T_H2 pole. In leprosy, involvement of lymphocyte T_H17 and interleukin-17 is unknown. This paper adds yet another chapter investigated the immunological aspects involving leprosy; identifying lymphocytes T_H17 and interleukin-17 in leprosy patients before and during chemotherapy treatment, comparing the results between patients paucibacillary and multibacillary and finally, investigating them in relation to interferon- γ , a cytokine known to promote immune protective effect, and it seems important to establish regulatory mechanisms in relation to the frequency of lymphocytes T_H17 and interleukin-17. We analyzed blood samples from leprosy patients at diagnosis and the second month of treatment. Samples were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) and with bacillus Calmete-Guerin (BCG). Subsequently was proceeded intracytoplasmic cytokine detection and analysis of samples at the flow cytometer (FACScalibur, BD Pharmingen). In patients with multibacillary leprosy, there is a significantly lower frequency of T_H17 cells. Besides there is a production of interferon- γ and interleukin-17 also significantly lower compared to patients with paucibacillary forms. A positive correlation between the levels of these same cytokines after stimulation with PHA and BCG in both groups was noted. In multibacillary after the start of polychemotherapy, there was an expansion in the frequency of T_H17 cells and an increase in production of both cytokines. Paucibacillary patients, there was no change in the immunological profile found anteriorly to polychemotherapy. The results suggest that T_H17 lymphocytes and IL-17 participate actively in the development of the immune response of leprosy, and their frequency is directly related to an immune protective effect, which helps to promote the healing of leprosy patients.

Keywords: Leprosy. Lymphocytes. T_H1. T_H17. Interleukin-17. Interferon- γ .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1</i>	<i>Hanseníase indeterminada (I).....</i>	25
<i>Figura 2</i>	<i>Hanseníase tuberculóide polar (TT).....</i>	26
<i>Figura 3</i>	<i>Hanseníase dimorfa-tuberculóide (DT).....</i>	26
<i>Figura 4</i>	<i>Hanseníase dimorfa-dimorfa (DD).....</i>	27
<i>Figura 5</i>	<i>Hanseníase dimorfa-dimorfa (DD).....</i>	27
<i>Figura 6</i>	<i>Hanseníase dimorfa-dimorfa (DD).....</i>	27
<i>Figura 7</i>	<i>Hanseníase dimorfa-virchowiana (DV).....</i>	27
<i>Figura 8</i>	<i>Hanseníase Virchowiana Polar.....</i>	28
<i>Figura 9</i>	<i>Hanseníase Virchowiana Polar.....</i>	28
<i>Figura 10</i>	<i>Hanseníase Virchowiana Polar.....</i>	28
<i>Figura 11</i>	<i>Hanseníase Neural Primária.....</i>	29
<i>Figura 12</i>	<i>Reação Hansênica tipo 1.....</i>	30
<i>Figura 13</i>	<i>Reação Hansênica tipo 1.....</i>	30
<i>Figura 14</i>	<i>Reação Hansênica tipo 2 – Eritema nodoso hansênico.....</i>	32
<i>Figura 15</i>	<i>Reação Hansênica tipo 2 – Eritema polimorfo-like-reaction.....</i>	32
<i>Figura 16</i>	<i>Resposta imune inata. Mecanismo de reconhecimento das micobactérias por células da resposta imune inata e ativação e diferenciação de linfócitos T.....</i>	36
<i>Figura 17</i>	<i>Resposta imune adaptativa na hanseníase.....</i>	37
<i>Figura 18</i>	<i>Cartela do tratamento para adultos paucibacilares.....</i>	42
<i>Figura 19</i>	<i>Cartela do tratamento para adultos multibacilares.....</i>	42
<i>Figura 20</i>	<i>Cartela do tratamento para crianças paucibacilares.....</i>	43
<i>Figura 21</i>	<i>Cartela do tratamento para crianças multibacilares.....</i>	43

<i>Figura 22</i>	<i>Dot plot da aquisição de linfócitos T_H17.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 23</i>	<i>Dot plot da aquisição de linfócitos $TC\text{D}4^+ \text{IFN-}\gamma^+$</i>	<i>59</i>
<i>Figura 24</i>	<i>Novo modelo proposto para a elaboração da resposta imune na hanseníase.....</i>	<i>80</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Perfil dos doentes de Hanseníase.....</i>	63
<i>Tabela 2: Perfil dos contatos intradomiciliares dos doentes de hanseníase.....</i>	64
<i>Tabela 3: Coeficiente de correlação entre as citocinas IL-17 e IFN-γ após estímulo com PHA e BCG em pacientes paucibacilares e multibacilares.....</i>	67

LISTA DE QUADROS

<i>Quadro 1</i>	<i>Tratamento das formas paucibacilares da hanseníase nos adultos.....</i>	<i>42</i>
<i>Quadro 2</i>	<i>Tratamento das formas multibacilares da hanseníase nos adultos.....</i>	<i>43</i>
<i>Quadro 3</i>	<i>Tratamento das formas paucibacilares da hanseníase em crianças.....</i>	<i>43</i>
<i>Quadro 4</i>	<i>Tratamento das formas multibacilares da hanseníase em crianças.....</i>	<i>44</i>

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Frequência de células $CD4^+$ produtoras de $IFN-\gamma$	65
Gráfico 2	Frequência de células $CD4^+IL-17^+$	65
Gráfico 3	Frequência de Células T_H17	66
Gráfico 4	Comparativo de frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$ em pacientes multibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com PHA.....	67
Gráfico 5	Comparativo de frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$ em pacientes multibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com BCG.....	67
Gráfico 6	Comparativo de frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$ em pacientes paucibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com PHA.....	68
Gráfico 7	Comparativo de frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$ em pacientes paucibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com BCG.....	68
Gráfico 8	Comparativo de frequência células $CD4^+IL17^+$ em pacientes multibacilares após o segundo mês de tratamento poliquimioterápico quando estimulados com PHA.....	68
Gráfico 9	Comparativo de frequência de células $CD4^+IL-17^+$ em pacientes multibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com BCG.....	68
Gráfico 10	Comparativo de frequência de células $CD4^+IL17^+$ em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA.....	69
Gráfico 11	Comparativo de frequência de células $CD4^+IL17^+$ em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com BCG.....	69

Gráfico 12	<i>Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes multibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA.....</i>	70
Gráfico 13	<i>Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes multibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com BCG.....</i>	70
Gráfico 14	<i>Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA.....</i>	70
Gráfico 15	<i>Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com BCG.....</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
D	Dimorfo
DD	Dimorfo-Dimorfo
DT	Dimorfo-Tuberculóide
DV	Dimorfo-Virchowiano
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
I	Indeterminada
IFN- γ	Interferon-gama
IL-17	Interleucina 17
<i>M. Leprae</i>	<i>Mycobacterium Leprae</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-BSA	<i>Phosphate Buffered Saline With Bovine Serum Albumin</i>
PERCP-CY5.5	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex: CY5.5 Conjugate</i>
PGL 1	<i>Phenolic Glycolipid-1</i>
PHA	Fitohemaglutinina
PQT	Poliquimioterapia
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
ROR γ t	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor γt</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>

T	Tuberculóide
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i>
T _H 1	<i>T Helper 1 (lymphocyte)</i>
T _H 17	<i>T Helper 17 (lymphocyte)</i>
T _H 2	<i>T Helper 2 (lymphocyte)</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TLR1	<i>Toll-Like Receptor 1</i>
TLR2	<i>Toll-Like Receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Virchowiana
VV	Virchowiana-Virchowiana
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	Conceito.....	23
2.2	Hanseníase como agravo de saúde pública.....	23
2.3	Hanseníase e genética.....	24
2.4	Classificação clínica da hanseníase.....	24
2.5	Reações Hansênicas.....	29
2.6	Diagnóstico da hanseníase.....	33
2.7	Hanseníase e imunologia.....	34
2.8	Hanseníase e histopatologia.....	37
2.9	A interleucina-17 e a subpopulação linfocitária T_H17.....	38
2.10	Tratamento da hanseníase.....	41
2.10.1	A dapsona.....	44
2.10.2	A rifampicina.....	45
2.10.3	A clofazimina.....	46
3	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	48
4	HIPÓTESE.....	50
5	OBJETIVOS.....	52
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
6.1	Área de estudo.....	55
6.2	População.....	55
6.3	Período de referência.....	56
6.4	Desenhos de estudo.....	56
6.5	Definição das variáveis.....	56
6.6	Procedimento experimental.....	56
6.6.1	Critérios de inclusão.....	59

6.6.2	Critérios de exclusão.....	60
6.7	Análise estatística.....	60
6.8	Considerações éticas.....	60
6.9	Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	60
7	RESULTADOS.....	61
7.1	Perfil dos doentes de hanseníase (D).....	62
7.2	Perfil dos contatos intradomiciliares de hanseníase (CT)	63
7.3	Resultado das amostras em pacientes virgens de tratamento.....	64
7.3	Resultado comparativo das amostras antes e após o segundo mês de tratamento	67
8	DISCUSSÃO.....	71
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
9.1	Novo modelo proposto para a elaboração da resposta imune da hanseníase em pacientes paucibacilares.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICES.....	94
	APÊNDICE A – Artigo Publicado no JEADV (<i>Journal of the European Academy of Dermatology</i>).....	95
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	103
	APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Menores.....	105
	ANEXOS.....	107
	ANEXO A – Folha de Aprovação do CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).....	108
	ANEXO B – Carta de Anuência.....	109
	ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	110

ANEXO D – Regulamentação da defesa e normas de apresentação de DISSERTAÇÃO (Mestrado) e TESE (Doutorado) dos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.....	111
--	------------

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase permanece como um grave problema de saúde pública em vários países do mundo, destacando-se a Índia e o Brasil, que ocupa o segundo lugar mundial em casos novos registrados da doença. A apresentação clínica da doença é ampla e variável, e depende basicamente dos mecanismos imunológicos definidos mediante a interação do agente etiológico e o seu hospedeiro (SUGITA, 1995).

Até o presente momento, admite-se que a definição para a evolução clínica da doença é dada mediante a capacidade do organismo de elaborar respostas imunológicas dicotômicas, havendo a predominância de uma resposta imune celular, contribuindo para o controle da carga bacilar e conseqüentemente da afecção, levando a apresentação clínica das formas paucibacilares da doença, ou por outro lado, preponderância da resposta imunológica humoral, levando a disseminação e às apresentações clínicas das formas multibacilares da doença. Esta dicotomia é atribuída até então, entre outros fatores, a dois subgrupos populacionais celulares: os linfócitos T_H1 e os linfócitos T_H2 , que através da produção de determinadas citocinas, definiriam o direcionamento clínico para o desenvolvimento da hanseníase em suas variadas apresentações (TALHARI, NEVES, 2006).

Após a descoberta recente de uma terceira subpopulação linfocitária, definida como linfócitos T_H17 , cujo verdadeiro papel protetor ou não ainda não está estabelecido na hanseníase, além da produção da interleucina-17, que é apontada como o principal subproduto desta mesma subpopulação celular, faz-se necessário que os conceitos sobre a imunologia da hanseníase sejam revistos e ampliados. (WINN, 2005).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Conceito

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de evolução crônica, provocada pelo *Mycobacterium leprae* que recebeu esta denominação em homenagem ao seu descobridor Gerhard Hansen, médico norueguês, em 28 de fevereiro de 1873. (GETZ, 1958).

O bacilo tem uma afinidade particular pelas células de Schwann do sistema nervoso periférico (WEDDELL et al, 1959).

A hanseníase além de infecto-contagiosa é uma doença dermatológica, neurológica, imunológica e sistêmica e apresenta várias manifestações clínicas. Este fenômeno é explicado por diferenças encontradas nos hospedeiros susceptíveis para o *Mycobacterium leprae*. Imunologicamente os pacientes apresentam um comprometimento da imunidade celular contra o *Mycobacterium leprae* sem que nenhum outro fenômeno seja detectado. (SUGITA, 1995).

Estudos evidenciam que em várias cepas isoladas não existe variação de virulência, o que pode corroborar que sua evolução depende da interação bacilo *versus* hospedeiro e relacionar este fenômeno às diversas apresentações clínicas da doença (REES, 1965).

2.2 Hanseníase como agravo de saúde pública

A Hanseníase permanece sendo um dos agravos de saúde pública de maior relevância em nosso País. O quantitativo de casos confirmados da doença aumenta a cada ano. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o Brasil ocupa o primeiro lugar de prevalência mundial da doença por cada 100.000 habitantes e o segundo lugar mundial de casos novos confirmados, perdendo apenas para a Índia (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2010).

No Brasil, foram confirmados 39.561 novos casos no ano de 2009. (BRASIL, 2010).

O município de Caruaru em Pernambuco apresenta elevado coeficiente de detecção de casos novos e foi escolhido para a realização do presente estudo.

A doença é altamente incapacitante em sua forma mais grave e a sua eliminação é a meta da OMS, que pleiteia tornar a prevalência mundial da doença em índices menores que 1/10.000 habitantes. A introdução da poliquimioterapia e os estudos científicos que apontam a sua eficácia tornaram-se um marco no combate à doença. No entanto, o aumento no número de casos novos diagnosticados a cada ano, sobretudo nos países endêmicos, incita os pesquisadores

a perscrutarem cada vez mais os complexos mecanismos imunológicos envolvidos na hanseníase, com as atenções voltadas principalmente para as suas formas mais graves, onde não obstante a eficácia da poliquimioterapia, permanecem presentes as irreversíveis incapacidades e deformidades delas decorrentes. (TALHARI, NEVES, 1984).

2.3 Hanseníase e genética

É consensual que a resistência à hanseníase é uma característica genética transmitida por um par de genes autossômicos dominantes. No entanto, apesar da decodificação genômica completa do *M leprae* ter sido realizada, ainda não foi elucidado satisfatoriamente qual o conjunto de genes que estariam envolvidos na susceptibilidade para a hanseníase. Vários estudos realizados em diferentes países demonstram o envolvimento de vários genes pertencentes ao sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), (ESCAMILLA-TILCH M, TORRES-CARRILLO NM, PAYAN RR, et al 2012), ao sistema Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), o qual, regula a atividade de células natural killer pela interação com o sistema HLA classe 1, e ao sistema de antígenos de histocompatibilidade maior de classe 1 relacionado ao gene A (MICA) e ao gene B (MCIB). (TOSH K; RAVIKUMAR M; BELL JT, 2006).

2.4 Classificação clínica da hanseníase

A classificação clínica da hanseníase segue os critérios estabelecidos em Madrid, que considera dois polos imunologicamente estáveis e opostos, o virchowiano polar (V) e o tuberculóide polar (T) e dois grupos instáveis, o indeterminado (I) e o dimorfo (D), que evoluíram para um destes pólos estáveis. (MADRID, 1953).

Ridley e Jopling em 1966 dividiram os portadores de hanseníase em tuberculóides polares (TT) (Fig. 2), subdividiu o grupo dimorfo em dimorfos-tuberculóides (DT) (fig. 3) dimorfos-dimorfos (DD) (Fig. 4 5 e 6) e dimorfos-virchowianos (DV) (fig. 7) e, finalmente, no outro extremo do espectro em virchowianos polares (VV) (Fig. 8, 9 e 10). (RIDLEY, JOPLING, 1966).

No Brasil, admite-se a forma I citada desde Madrid, que representaria a fase de infecção inicial com manifestações peculiares, e que pode evoluir para qualquer uma das formas definidas por Ridley e Jopling. (fig. 1).

Os indivíduos VV e os indivíduos TT representam as formas polares do espectro imunológico e de manifestação clínica, e os indivíduos I, DT, DD e DV correspondem àqueles que são imunologicamente instáveis, podendo desenvolver características que ora se aproximem do pólo virchowiano, ora que se aproximem do pólo tuberculóide, ou ainda localizarem-se no meio do espectro, com manifestações específicas e também medianas dos dois grupos polares.

Existe ainda uma forma clínica de hanseníase onde não se verificam lesões cutâneas. Segundo Pannikar et al (1983), esta forma deve ser classificada à parte como hanseníase neural primária. Nestes casos, o comprometimento neurológico surge na ausência completa de lesões cutâneas, que, contudo, podem surgir tardiamente, sugerindo uma instalação da infecção em alguns nervos periféricos de predileção para o bacilo, que antecederia as lesões dermatológicas ou mesmo seria exclusiva desta localização. Nestes casos surge o desenvolvimento de mononeuropatia simples ou múltipla e/ou polineuropatia. (PANNIKAR, ARUNTHATHI, CHACKO, FRITSCHI, 1983).

Estas situações podem representar um verdadeiro desafio diagnóstico, podendo ser diferenciadas de várias doenças neurológicas e reumatológicas. A sua confirmação pode ser constatada principalmente mediante a realização de biópsia e estudo histopatológico do nervo acometido, e sugerida através da realização de eletroneuromiografia. Clinicamente podem ser observados espessamento neural, dor espontânea e à palpação, com neurite associada. Há casos, contudo, onde estes sintomas encontram-se ausentes evidenciando-se o comprometimento neural pela hanseníase apenas após a subsequente instalação de incapacidades sensitivo-motoras (fig. 11). (ANTUNES, CHIMELLI, JARDIM et al, 2012).

Figura 1- Hanseníase indeterminada (I).



Fonte: acervo particular do autor.

Notas: Mácula hipocrômica de limites pouco precisos com alteração de sensibilidade

Figura 2 - Hanseníase tuberculóide polar (TT).



Figura 3– Hanseníase dimorfa-tuberculóide (DT).



Fonte: acervo particular do autor

Notas: As lesões satélites (setas) extrapolando a lesão principal sugere a forma dimorfa-tuberculóide.

Figura 4 – Hanseníase dimorfa-dimorfa (DD).



Fonte: acervo particular do autor
Notas: As regiões palmo-plantares também podem ser acometidas e não podem ser negligenciadas ao exame físico.

Figura 5 – Hanseníase dimorfa-dimorfa (DD).



Fonte: acervo particular do autor
Notas: Placas foveolares disseminadas em tórax e abdome. O aspecto finamente granuloso dos bordos lesionais neste caso, não é usual.

Figura 6 - Hanseníase dimorfa-dimorfa (DD).



Fonte: acervo particular do autor
Notas: variante clínica. Forma “dimorfa hipocromiante”.

Figura 7 - Hanseníase D.virchowiana (DV).



Fonte: acervo particular do autor
Notas: Extensa placa coexistindo com hansenomas (setas)

Figura 8 - Hanseníase Virchowiana polar (VV).



Fonte: acervo particular do autor
Notas: Hanseníase Virchowiana: nódulos e tubérculos (hansenomas) disseminados no tegumento.

Figura 9 - Hanseníase Virchowiana polar (VV).



Fonte: acervo particular do autor
Notas: Hanseníase Virchowiana: infiltração característica dos pavilhões auriculares

Figura 10: Hanseníase Virchowiana polar (VV).



Fonte: acervo particular do autor.
Notas: comprometimento neural. Amiotrofias interósseas, osteólise em 5º quirodáctilo esquerdo, ulceração traumática em 2º quirodáctilo direito, hematoma subungueal em 4º quirodáctilo direito e pequena equimose pós-traumática em 5º quirodáctilo direito. Lesões adquiridas em consequência da perda da sensibilidade protetora.

Figura 11: Hanseníase Neural Primária.



Fonte: acervo particular do autor.

Notas: comprometimento neural na ausência de lesões cutâneas. Acentuada amiotrofia, retrações em todos os quirodáctilos com a formação de “garra” neural e a presença de “mão caída”. Mão da paciente amparada pelo examinador para a realização da fotografia. Reflete comprometimento dos nervos ulnar, mediano e radial, último nervo a ser atingido nestes casos. Evolução de longa data (11 anos), sem diagnóstico.

2.5 Reações Hansênicas

As reações hansênicas, podem ser definidas como estados clínicos inflamatórios agudos, relacionados com uma rápida mudança na resposta imunológica do hospedeiro, que interrompe o curso crônico usual e a estabilidade clínica de pacientes com hanseníase. Trata-se de resposta imunológica frente aos antígenos bacilares do *Mycobacterium leprae*. Todas as formas clínicas de hanseníase podem desenvolver reações hansênicas, menos a forma indeterminada. (MASTRANGELO, MARCER, CEGOLONE et al, 2008).

As reações hansênicas podem acontecer antes da poliquimioterapia (10% dos pacientes), durante a poliquimioterapia (50% dos pacientes) e após a poliquimioterapia (30%) dos pacientes. Classicamente são divididas em reação do tipo 1 ou reação reversa e reação do tipo 2. Vários fatores podem ser considerados precipitantes para a ocorrência destes surtos reacionais: gravidez, parto, puberdade, infecções intercorrentes, em especial a tuberculose, vacinações, cirurgia, medicamentos iodados (por exemplo, o iodeto de potássio) além do estresse físico e emocional. A reação do tipo 1 acontece por exacerbação da imunidade celular e clinicamente corresponde a uma exacerbação das lesões pré-existentes ou mesmo o surgimento de novas lesões que passam a assumir aspectos inflamatórios: eritema, edema

aumento da temperatura local e em algumas ocasiões, hiperestesia que pode ser traduzida por sensação dolorosa paradoxal. Acomete preferencialmente os indivíduos tuberculóides, dimorfos tuberculóides e dimorfos-dimorfos, podendo levar a uma melhora do quadro clínico ou ser catastrófica, levando a grave comprometimento neural e à ocorrência súbita de incapacidades permanentes. Podem perdurar durante meses, até anos (Figuras 12 e 13). (TALHARI, NEVES et al, 2006).

Análises de biópsias antes, durante e após a ocorrência das reações hansênicas em estudos conduzidos por RIDLEY & RADIA no ano de 1981 em 12 indivíduos dimorfos, permitiram subdividir as reações hansênicas tipo 1 em “up-grading”, quando o fenômeno foi acompanhado por decréscimo do índice baciloscópico em relação ao inicial e o estudo histopatológico após a ocorrência do surto reacional evidenciou que as lesões passaram a apresentar padrões semelhantes à histopatologia dos indivíduos tuberculóides; e em “down-grading”, quando ocorre piora do índice baciloscópico e a biópsia pós-reacional exibe histopatologia tipicamente dimorfa, alternando entre padrões tuberculóides e virchowianos. (RIDLEY, RADIA, 1981).

O tratamento da reação tipo 1 inclui desde o uso de anti-inflamatórios não-hormonais como o ácido acetilsalicílico, até o uso de corticoterapia sistêmica com a prednisona. (URA, 2007).

Figura 12 - Reação hansênica tipo 1 – Face anterior do tórax.



Fonte: acervo particular do autor.
Notas: Paciente dimorfo, com intensa infiltração das lesões prévias de hanseníase que assumiram aspectos inflamatórios.

Figura 13 - Reação hansênica tipo 1. Mesmo paciente da figura anterior – Dorso.



Fonte: acervo particular do autor.
Notas: Reação exacerbada que levou à formação de bolhas (setas) em duas das lesões.

Wemambu e cols., demonstra o primeiro mecanismo imunológico para as reações hansênicas do tipo 2, identificando o depósito de imunoglobulinas e de frações do sistema complemento nas paredes dos vasos de lesões de eritema nodoso, considerada a principal, mas não a única, manifestação deste estado reacional (WEMAMBU, TURK, WATERS, 1969).

A partir desta observação, foi sugerido que os mecanismos envolvidos em sua etiopatogenia seriam semelhantes àqueles descritos por Arthus em 1903.

Estes estudos foram posteriormente contestados por outros autores, que perceberam a deposição de imunocomplexos extra-vasculares como o resultado da ruptura de pequenos granulomas virchowianos, divergindo do clássico fenômeno descrito por Arthus.

Mais recentemente, evidenciou-se este depósito de imunocomplexos tanto no interior dos vasos quanto nos tecidos, a depender da intensidade do processo inflamatório. Clinicamente, consideram-se três variantes clínicas: o eritema nodoso hansênico, a reação eritema-polimorfo-like e o fenômeno de Lúcio. O eritema nodoso hansênico trata-se do surgimento de nódulos eritematosos ou purpúricos, dolorosos, disseminados pelo corpo, com tendência à distribuição simétrica ao longo dos membros inferiores e superiores (Fig. 14). Durante os episódios, os pacientes podem sofrer sintomatologia geral: febre, dores nas articulações, miosite, linfadenite, iridociclite, orquite, glomerulonefrite, hepato-esplenomegalia e edema doloroso de nervos. Após uma a duas semanas, os nódulos podem regredir, embora as recorrências sejam frequentes. Situações exacerbadas podem ocorrer, levando à ulceração e necrose destas lesões, podendo vir a ser considerado de ocorrência grave, sobretudo quando acomete a face, quando a reparação final das lesões pode resultar em cicatrizes inestéticas desfigurantes e indeléveis. Na reação eritema polimorfo-like, as lesões cutâneas são menos nodulares que as do eritema polimorfo. Tratam-se de placas e máculas eritematosas ou purpúricas com localização preferencial em face, tronco e extremidades. As placas podem desenvolver vesículas, bolhas e também ulcerar e necrotizar. Histopatologicamente a reação hansênica tipo 2 comporta-se como uma vasculite leucocitoclástica. (NOGUEIRA, 1995).

O fenômeno de Lúcio ocorre principalmente na forma de hanseníase descrita por Rafael Lúcio e Ignacio Alvarado em 1852, no México, que recebeu a denominação de hanseníase de Lúcio que se trata de forma difusa e peculiar de hanseníase onde os pacientes apresentam altos índices baciloscópico e são anérgicos do ponto vista imunológico. As lesões cutâneas são múltiplas manchas purpúricas e dolorosas e bolhas hemorrágicas que evoluem para lesões necróticas e ulceradas. Este fenômeno mais raramente pode também ocorrer em outras formas mais graves de hanseníase virchowiana (CUEVAS, RODRÍGUEZ-PERALTO, CARRILLO, 2007).

As ulcerações têm os bordos irregulares e envolvem deixando cicatrizes atróficas. Histopatologicamente existem áreas de vários infartos cutâneos representada por uma intensa vasculite necrotizante de pequenos vasos capilares e artérias de médio até grande calibre na derme e no panículo adiposo. Apesar de raro, existem casos do fenômeno descritos no Brasil, cuja primeira descrição do fenômeno deveu-se a Souza, em 1951. (SOUZA, 1951).

A droga de eleição para o tratamento da reação hansênica do tipo 2 é a talidomida. Algumas situações necessitam da combinação desta droga com a corticoterapia sistêmica com a prednisona ou ainda com drogas alternativas para as mulheres em idade fértil, como a pentoxifilina e a própria clofazimina que é utilizada também no esquema poliquimioterápico de tratamento da hanseníase (VAN VEEN, LOCKWOOD, VAN BRAKEL et al, 2009).

Figura 14 - Reação hansênica tipo 2 - Eritema Nodoso Hansênico.



Fonte: acervo particular do autor.

Notas: paciente virchowiano apresentando vários nódulos subcutâneos ao longo dos membros superiores. Reação hansênica tipo 2 durante o tratamento poliquimioterápico.

Figura 15 - Reação hansênica tipo 2 – Eritema polimorfo-like-reaction.



Fonte: acervo particular do autor.

Notas: paciente virchowiano apresentando várias placas e máculas eritematosas e purpúricas, algumas com aparência "em alvo" simulando o eritema polimorfo disseminadas pelo tronco.

2.6 Diagnóstico da hanseníase

Desde 1988, a Organização Mundial de Saúde define como um caso de hanseníase, uma pessoa que apresente sinais clínicos da doença, tais sejam: a) lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; b) acometimento de nervo (s) com espessamento neural; c) baciloscopia positiva para *Mycobacterium leprae* (BRASIL, 2002).

Os exames laboratoriais disponíveis são auxiliares no diagnóstico, destacando-se:

a) Baciloscopia: pesquisa de bacilos realizada em material colhido nos lóbulos auriculares direito e esquerdo, cotovelo direito e em lesão de hanseníase. Aqueles pacientes que não apresentam lesões dermatológicas visíveis devem ter a coleta também realizada no cotovelo esquerdo. A coloração do esfregaço é realizada pelo método de Ziehl-Neelsen a frio e o encontro de bacilos determinará a positividade do teste, em uma avaliação quantitativa proposta por Ridley em 1962, fundamentada em uma escala logarítmica com variação entre 0 e 6. Nos pacientes com suspeita de recidiva e resistência medicamentosa, a baciloscopia permite ainda determinar o índice morfológico, onde os bacilos apresentar-se-ão íntegros, fragmentados ou granulosos, sendo o aspecto íntegro considerado a forma viável e definindo a doença em atividade. (BRASIL, 2010)

b) Reação de Mitsuda: avalia a capacidade lisogênica dos macrófagos. Tem utilidade para avaliação de estado de relativa resistência ao *Mycobacterium leprae*. É realizado mediante a injeção intradérmica de 0,1ml de lepromina que se trata de um antígeno obtido num cocto-extrato de hansenoma. O antígeno frequentemente utilizado é o antígeno de Mitsuda-Hayashi, que deu origem ao nome da reação. A leitura é realizada em duas etapas sucessivas onde na primeira, também chamada de reação de Fernandez, após a injeção antigênica verifica-se a formação do tipo tuberculínico, a qual atinge seu pico em 48-72h. A segunda fase, que constitui a reação de Mitsuda propriamente dita, é geralmente lida após 3 semanas com critérios de avaliação que levam em consideração o tamanho, aspecto e evolução da infiltração, sendo assim interpretada:

- Reação negativa (-): ausência de infiltração
- Reação duvidosa (+/-): infiltrado < 3mm
- Reação fracamente positiva (+): infiltrado de 3-5mm
- Reação positiva (++) : infiltrado com mais de 5mm
- Reação fortemente positiva (+++): quando ocorre ulceração.

A reação de Mitsuda pode ser positiva em áreas não-endêmicas, em pacientes sem histórico de contato prévio com o bacilo, não sendo possível, desta forma relacionar a sua positividade à exposição pregressa. No entanto, nos doentes com diagnóstico estabelecido, a negatividade pode ser interpretada como indicador de baixa resistência ao *Mycobacterium leprae* e ao consequente desenvolvimento de formas multibacilares de hanseníase. A positividade indica certo grau de resistência e relaciona-se com indivíduos que tendem a desenvolver as formas clínicas paucibacilares da doença (BIER, 1990).

c) Testes sorológicos: são utilizados para detectar a presença de anticorpos contra o glicolípido fenólico específico do *Mycobacterium leprae* (PGL-I), sobretudo IgM. A partir da identificação deste antígeno, vários derivados semissintéticos do PGL-I (2, 10, 14 e 15) vêm sendo utilizados no desenvolvimento e utilização de testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium leprae*-específicos. Os principais são o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), o teste de aglutinação de partículas gelatinosas e o ML-Flow (teste imunocromatográfico). Este último trata-se de um teste mais rápido e de fácil utilização. Vários estudos têm sido realizados para se avaliar a fidedignidade dos resultados obtidos com estes testes, com resultados variáveis (BÜHRER-SÉKULA, SMITS, GUSSENHOVEN, 2003).

Um estudo comparativo entre os testes sorológicos ML-Flow e ELISA (PGL-I) em áreas endêmicas e não endêmicas de hanseníase foi conclusivo para a semelhança dos resultados obtidos com os dois métodos de detecção de anticorpos anti-PGL-I e sugere que ambos os testes podem contribuir para a alocação de pacientes com hanseníase para o tratamento adequado, apesar da positividade do teste sorológico ML-Flow em indivíduos sem hanseníase ter variado significativamente de acordo com o nível de endemicidade da doença na área geográfica em que o teste foi utilizado (DA SILVA, LYON S, LYON AC, 2010).

2.7 Hanseníase e Imunologia

A hanseníase, provocada por um patógeno intracelular, oferece um atrativo modelo para a investigação da regulação de respostas imunológicas frente a infecções (MODLIN RL, 2010).

Sob a ótica da Imunologia, podemos esquematizar a resposta imune em inata e adaptativa. A resistência do hospedeiro à hanseníase está associada ao desenvolvimento da resposta imune inata em associação com a baixa virulência do *Mycobacterium leprae* (SCOLLARD, ADAMS, GILLIS et al, 2006).

A resposta imune inata (Fig. 16) caracteriza-se por ser representada por mecanismo de defesa inespecífico, que apresenta ação frente às mais diversas agressões e microorganismos,

independentemente de sua natureza. As micobactérias apresentam em sua superfície estruturas de reconhecimento de padrões (PRR). A presença dos PRRs é identificada pelas células do hospedeiro, e se constituem na primeira detecção por parte do organismo frente à presença do *Mycobacterium leprae*. Em se tratando de PRRs, existem receptores denominados de Toll-Like (TLRs), que demonstram serem primordiais para o reconhecimento de patógenos pelas células dendríticas e pelos macrófagos. Destes, parece que os heterodímeros TLR2-TLR1 e os homodímeros TLR2 e TLR4 são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune inata frente às agressões provocadas por micobactérias (BRIGHTBILL, LIBRATY, KRUTZIK, et al, 1999).

Lipoproteínas do *Mycobacterium leprae* ligam-se aos receptores TLRs, sobretudo os TLR2, e a capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a secreção de IL-12/23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas (KRUTZIK, TAN, LI, et al, 2004).

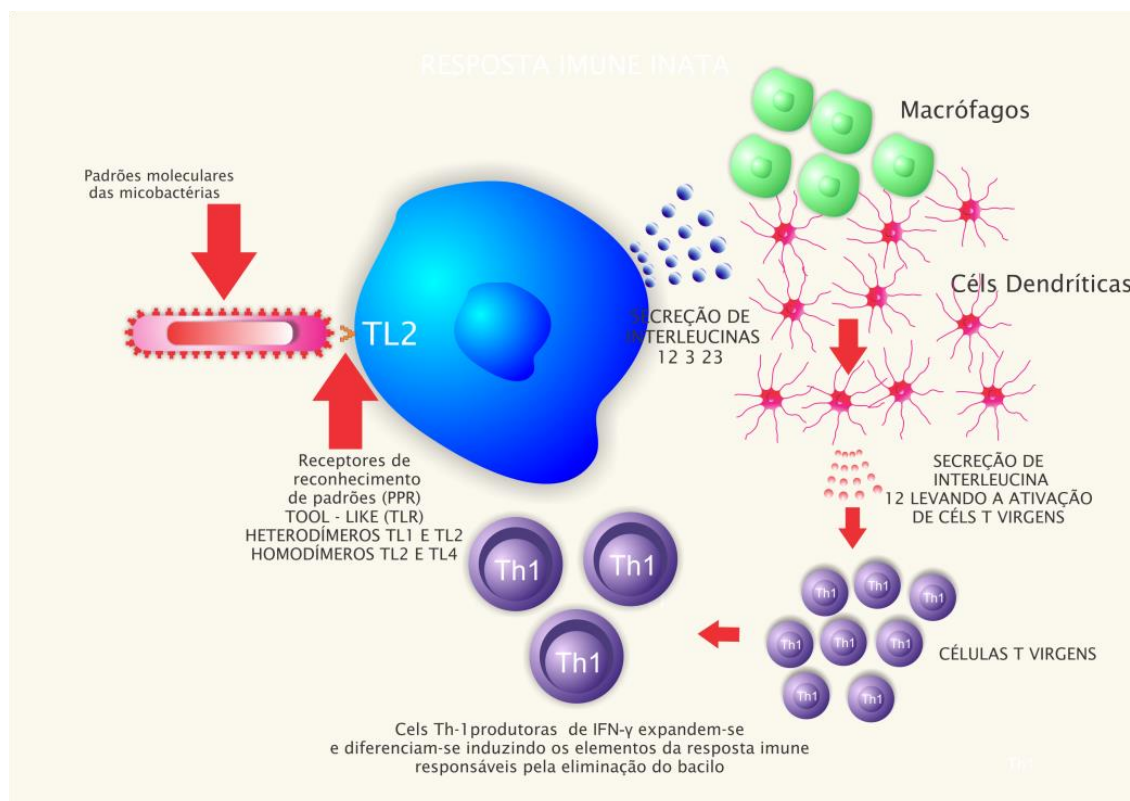
A capacidade do sistema imune inato para induzir a resposta adaptativa das células T é parte de um exército efetivo de defesa contra patógenos intracelulares. Este instrutivo papel do sistema imune inato é mediado principalmente por células dendríticas, que são células especializadas em apresentar antígenos altamente eficientes na ativação de respostas de células T, que por sua vez, irão induzir imunidade celular contra o patógeno (SIELING, 1999).

As células dendríticas promovem a ativação de células T virgens através da secreção de interleucina 12 (DEMANGEL, BRITTON, 2000).

Lesões virchowianas são caracterizadas por um déficit acentuado nas células dendríticas, tanto na derme quanto na epiderme, reduzindo significativamente o desenvolvimento da resposta imune mediada por células nestas lesões (SIELING, 1999).

Se ocorrer a expansão e a diferenciação de células T_H1 produtoras de IFN- γ haverá a promoção dos mecanismos responsáveis pela eliminação do bacilo e a progressão da doença será efetivamente controlada (BRIGHTBILL, LIBRATY, KRUTZIK et al, 1999).

Figura 16 – Resposta imune inata na hanseníase. Mecanismo de reconhecimento das micobactérias por células da resposta imune inata e ativação e diferenciação de linfócitos T.



Fonte: Ilustração concebida pelo autor

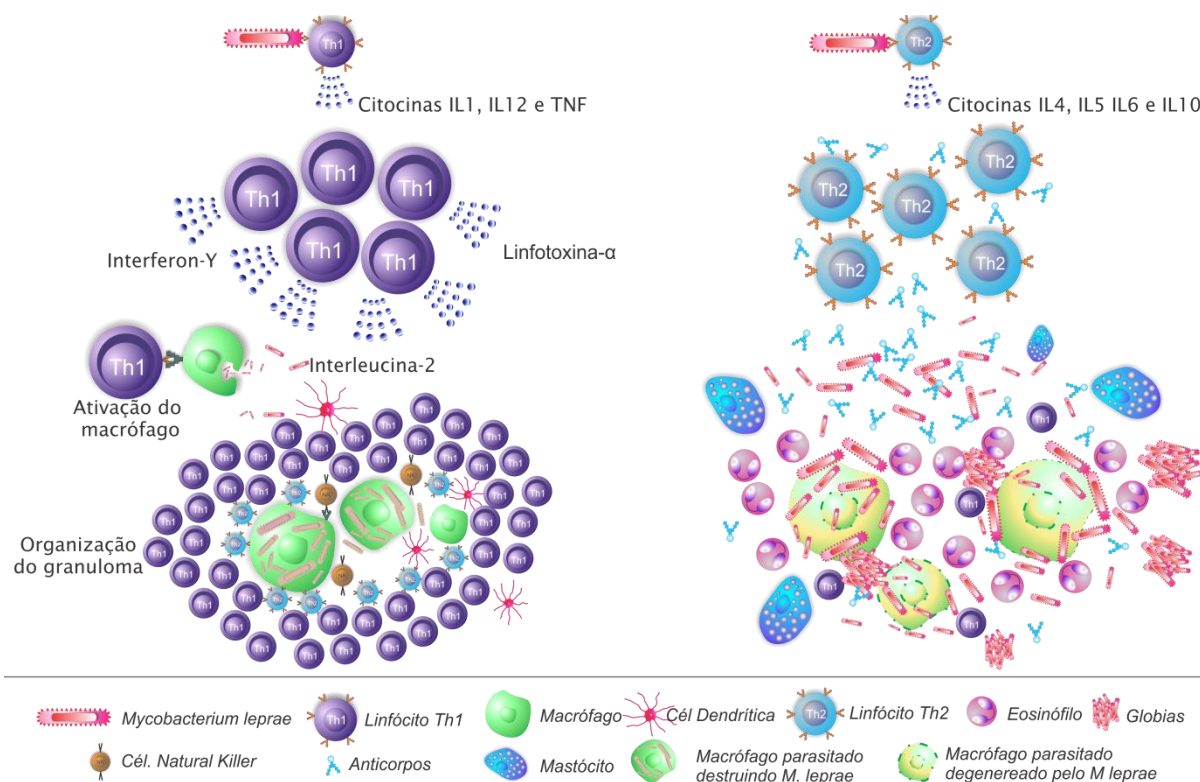
Textos: BRIGHTBILL et al, 1999; KRUTZIK et al, 2004.

Na resposta imune adaptativa (fig. 17), os mecanismos imunológicos de defesa estão fundamentados no reconhecimento específico de antígenos através de receptores de membrana presentes nos linfócitos T e B. Didaticamente se subdivide a resposta imune adaptativa em celular ou do tipo 1, e humoral ou do tipo 2.

A capacidade de os linfócitos auxiliares ($CD4^+$), também conhecidos como linfócitos T helper (T_H), em induzir resposta celular ou humoral relaciona-se entre outros fatores com os tipos de citocinas secretadas e proporcionará o desenvolvimento das respostas T_H1 ou T_H2 (TALHARI, NEVES, 2006).

As células T_H1 produzem uma grande quantidade de $IFN-\gamma$, induzem reações de sensibilidade tardia, ativam macrófagos e são essenciais para a defesa contra patógenos intracelulares. Células T_H2 produzem principalmente IL-4 e são importantes na indução da produção de IgE, recrutando eosinófilos para sítios de inflamação, e auxiliando na erradicação de infecções por parasitas (BI, LIU, YANG, 2007).

Figura 17– Resposta Imune Adaptativa na hanseníase



Fonte: ilustração concebida pelo autor.

Notas: A interação e o reconhecimento do *Mycobacterium leprae* pelo sistema imunológico do indivíduo suscetível, levará a respostas antagônicas, via ativação de imunidade celular predominantemente do tipo T_H1 (à esquerda) com elaboração de granulomas e contenção parcial da doença, ou do tipo T_H2 , via ativação de imunidade do tipo humoral, propiciando a multiplicação bacilar com globias e levando à ocorrência da disseminação da doença.

influenciar a evolução da doença e estar associado, pelo menos em parte, com as manifestações clínicas e alterações teciduais observadas nos pacientes portadores das formas TT e VV, respectivamente (GOULART, PENNA, CUNHA, 2002).

2.8 Hanseníase e histopatologia

Histologicamente, na forma I existe escassa infiltração de linfócitos ou histiócitos em torno de vasos e anexos. Podem ser encontrados escassos bacilos em torno de nervos dérmicos ou nos arredores do músculo eretor do pelo, que sela o diagnóstico. Nas formas T há a ocorrência de granulomas de células epitelióides, com células gigantes de Langerhans circundados por linfócitos. Estes granulomas são vistos na derme, e às vezes podem invadir a epiderme. Na forma DT, os granulomas são mais difusos que na forma T. Nervos e anexos são invadidos por granulomas sem necessariamente serem destruídos. Bacilos são encontrados raramente nas fibras nervosas dérmicas. Na forma DD, a zona subepidérmica é clara (Zona de

Grenz), os granulomas epitelióides são difusos, no entanto não se visualizam células gigantes. As fibras nervosas dérmicas são espessadas. Encontram-se bacilos na derme em fibras nervosas. Na forma DV, ocorre também a zona de Grenz, os granulomas são compostos principalmente por macrófagos, que por vezes exibem citoplasma espumoso. Podem ser encontrados pequenos focos de células epitelióides e infiltração difusa de linfócitos. Não se observam células gigantes. Há também espessamento neural e infiltração de linfócitos. Na forma V, há atrofia variável da epiderme, zona de Grenz claramente estabelecida. Os granulomas são malformados, predominantemente macrofágicos com infiltração escassa de linfócitos. São visualizados numerosos bacilos isolados e agrupados constituindo globias.

Já foi demonstrado que existe uma relação da subpopulação linfocitária CD4⁺ e CD8⁺ de 1.9 a 1 nas lesões de pacientes tuberculóides, onde as células CD4⁺ se distribuem por toda a lesão e as células CD8⁺ se encontram na periferia. Nos indivíduos virchowianos, esta relação é de 0.6 a 1 e os linfócitos CD8⁺ se distribuem no interior da lesão (MODLIN, HOFMAN, TAYLOR, et al, 1983).

2.9 A interleucina 17 e a subpopulação linfocitária T_H17

As citocinas são representadas por glicoproteínas de baixo peso molecular produzidas por vários tipos celulares, sobretudo as células do sistema imunológico, que atuam como sinalizadores moleculares de comunicação entre estas mesmas células que em seu conjunto compõem o sistema imune do indivíduo (ROBINS, 2010).

Classicamente células CD4⁺ efetoras têm sido divididas em duas distintas linhagens, baseadas no perfil de citocinas produzidas: células T_H1 cuja função está relacionada à destruição de patógenos intracelulares (por exemplo bactérias, vírus e alguns protozoários), além de serem potentes ativadores da imunidade do tipo celular; e as células T_H2, envolvidas no auxílio ao combate das infecções parasitárias (por exemplo helmintíase intestinal). As células T_H1 produzem as citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α . A IL-2 irá ativar receptores dos linfócitos CD4⁺, propiciando o desenvolvimento de clones celulares, responsáveis pela manutenção da produção de citocinas e, paralelamente, estimulam células natural killer (NK), que por sua vez irão potencializar a produção de IFN- γ .

O IFN- γ tem sua ação sobre macrófagos, estimulando a fagocitose e ativando estas células levando a uma maior produção de TNF- α . Este por sua vez, através de um mecanismo de retroalimentação cíclico, estimulará a atividade macrofágica. A subpopulação T_H2 produz as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, que são supressoras da atividade macrofágica,

produzindo bloqueio da estimulação de macrófagos. Há estímulo da imunidade humoral, sobretudo pela produção de IL-4, que estimula linfócitos B e mastócitos. Os linfócitos B produzirão imunoglobinas, e os mastócitos, produzirão mais IL-4, incrementando a resposta supressora macrofágica (MURRAY, SPITALNY, NATHAN, 1985).

Importante ressaltar que as interleucinas IL-4, IL-10 e IL-12 são importantes ativadores da produção de imunoglobulina E (IgE) pelas células B, além de recrutarem eosinófilos e auxiliarem na expulsão de microorganismos pelas mucosas por estimularem a produção de muco e a hipermotilidade celular, sendo um bom mecanismo na erradicação de infecções parasitárias (HARRINGTON, HATTON, MANGAN et al., 2005).

Todavia, por este padrão de resposta humoral não se relacionar com ativação macrofágica, não confere proteção em infecções provocadas por micobactérias. Pode ainda levar à ocorrência de dano tecidual pela extensa produção de complexos antígenos-anticorpos, fato demonstrado pela ocorrência da denominada reação hansênica tipo 2 (SIELING, ABRAMS, YAMAMURA, 1993).

A partir de experimentos realizados com o *Herpesvirus saimiri* gene 13 (HVS13) em 1995, foi descoberto um receptor desconhecido e identificado como *interleucin-17-receptor* (IL17-R) e a molécula por ele decodificada denominada de interleucina-17 (IL-17). (YAO, FANSLOW, SELDIN et al., 1995).

Foi demonstrado que a sua expressão acontece em células de diferentes órgãos, incluindo fígado, baço, pulmão, e que, células capazes de responder a IL-17 incluem macrófagos, linfócitos, células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos (LIN, RITCHEA, LOGAR, et al., 2009).

A expressão de IL-17, (também chamada IL-17A) tem sido associada a uma crescente lista de doenças autoimunes e inflamatórias, tais como a artrite reumatoide, lúpus, asma e rejeições de enxertos. Acredita-se que a IL-17 contribui para a patogênese dessas doenças agindo como um potente mediador pró-inflamatório. A IL-17 medeia o estímulo para a mobilização de neutrófilos, colocando-os na interface entre resposta imune adaptativa e resposta imune inata (CRUZ, KHADER, TORRADO, et al., 2006).

A interleucina 23 (IL-23) foi estudada por Harrington et al (2005), que investigaram se a mesma estimulava a produção de IL-17 em células T_H1 ou T_H2 plenamente diferenciadas, e perceberam que neste ponto, a IL-23 tinha apenas um pequeno efeito. Esta foi a primeira evidência que a IL-23 influenciava a diferenciação celular em um ponto anterior a diferenciação plena das linhagens T_H1 e T_H2 .

Embora os estudos sugerirem que a secreção de IL-23 estimule linfócitos CD4⁺ T_H1, estas mesmas células são a principal fonte de IL-17. Estes novos dados sugeriram que estas células representavam uma linhagem completamente diferente das células T CD4⁺, que se diferenciavam ao longo de um programa distinto de desenvolvimento, divergindo precocemente das linhagens T_H1 e T_H2 e sendo antagonizada por citocinas e vias de sinalização que regulavam o desenvolvimento de células T_H1 e T_H2. Estas células passaram a ser denominadas de linfócitos T_H17. (WINN, 2005).

Após essas descobertas, uma combinação de TGF- β , (transforming growth factor- β mais IL-6 e os fatores de transcrição STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) e ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor γ t) foram recentemente descritos como sendo essenciais para a diferenciação inicial das células T_H17. A IL-23 mostrou-se importante não somente para a etapa de diferenciação, como também para a estabilização posterior deste subconjunto de células. Observou-se também que, a IL-21 produzida pelas próprias células T_H17, desempenhava um papel importante na sua amplificação. Assim, células T_H17 podem passar por três etapas distintas de desenvolvimento: a diferenciação, a estabilização e a amplificação, na qual diferentes citocinas desempenham um papel distinto. Concluiu-se que, de fato, este grupo de células T não poderia ser classificado de acordo com o esquema T_H1-T_H2. As células T que preferencialmente produzem interleucina 17, mas não IFN- γ ou IL-4, foram denominadas de células T_H17. Uma vez que estas células T_H17 se constituem em uma linhagem celular distinta, atualmente se admite a existência de três tipos de células T efectoras: as células T_H1, T_H2 e T_H17 (BETTELLI, KORN, KUCHROO et al., 2007).

Agentes patogênicos, tais como *Mycobacterium tuberculosis* ou *Borrelia burgdorferi* bem como o componente zymosan da parede celular fúngica, estimulam a expressão de IL-17 sugerindo um importante papel da IL-17 na produção de células T_H17 em uma ampla gama de infecções (STOCKINGER B, VELDHOEN M, 2007).

Segundo Ivanov II, et al (2007), diferentes tipos de respostas imunes adaptativas que ofereçam proteção contra diferentes classes de patógenos são facilitadas pela diferenciação de células T CD4⁺ para os tipos correspondentes de células T efectoras, que atualmente incluem os subconjuntos T_H1, T_H2, e também T_H17.

As células T_H17 são capazes de desencadear potentes respostas inflamatórias, regulando a produção de quimiocinas em células-alvo importantes, tais como fibroblastos. Notavelmente, embora o IFN- γ tenha sido originalmente pensado como sendo o mediador central das doenças autoimunes, os novos dados agora sugerem a interação de IFN- γ e IL-4 no desenvolvimento das células T_H17 que são responsáveis pela destruição patológica tecidual. Uma série de agentes

patógenos é capaz de induzir resposta imune, principalmente do tipo T_H17. Dentre estes, citam-se o *Propionibacterium acnes*, o *Citrobacter rodentium*, a *Klebsiella pneumoniae*, algumas espécies de bacteroides e borrelias, fungos como a *Candida albicans* e micobactérias como o *Mycobacterium tuberculosis* (KHADER SA et al, 2005).

O papel da interleucina-17 e de células T_H17 nas infecções tem sido demonstrado na síndrome de hiper-IgE, em que uma mutação no STAT3, uma subfamília da família de ativadores de transcrição, anula a capacidade de montar respostas T_H17. Os pacientes com essa desordem têm infecções recorrentes por *Candida. albicans* e *Staphylococcus aureus* na pele.

A imunidade mediada por células T_H17 é particularmente importante nas superfícies epiteliais e da mucosa, como indicado pelo padrão de expressão de seus receptores de quimiocinas e citocinas efectoras (MIOSSEC, KORN, KUCHROO, 2009).

Este aspecto poderia sinalizar um mecanismo protetor do tipo resposta imune adaptativa quando da penetração do *Mycobacterium leprae* no organismo, considerando-se que uma das maneiras de transmissão da hanseníase seja a inalação de perdigotos de pacientes multibacilares por via respiratória (NOORDEEN, 1993).

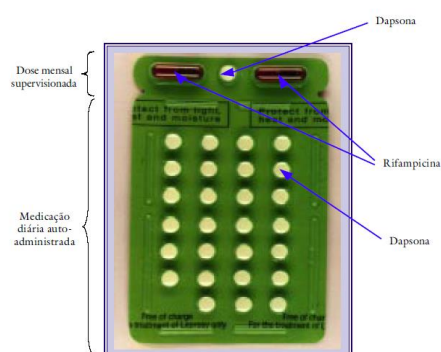
2.10 Tratamento da hanseníase

O tratamento da hanseníase preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1981 é a poliquimioterapia (PQT). (WHO, 1981).

No Brasil, esta modalidade terapêutica foi gradativamente substituindo os antigos tratamentos a partir de 1986, em algumas áreas piloto do País. Nesta mesma época, adotou-se a classificação operacional dos doentes em paucibacilares e multibacilares. Os doentes paucibacilares são aqueles que apresentam até 5 lesões de pele e exame baciloscópico negativo e os doentes multibacilares aqueles com mais de cinco lesões de pele e baciloscopia positiva. Oficialmente, a PQT-OMS foi adotada em 1991 e, aos poucos, antigos conceitos sobre a dependência da baciloscopia para a identificação dos casos bacilíferos e não-bacilíferos bem como da reação de Mitsuda para esta classificação operacional e, sobretudo da duração do tratamento foram se modificando até o consenso da terapêutica dos dias atuais. A situação atual do Brasil sugere que a PQT reduziu as fontes de infecção e preveniu o surgimento de casos novos na comunidade em proporções significativamente diferentes que no período de monoterapia sulfônica ou do anterior tratamento preconizado pela Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. (ANDRADE, 2006).

A poliquimioterapia é constituída pelo conjunto dos seguintes medicamentos: dapsona, rifampicina e clofazimina, com administração associada através de esquema-padrão, de acordo com a classificação operacional do doente em paucibacilar ou multibacilar. A informação sobre a classificação do doente é fundamental para se selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Os esquemas terapêuticos estão resumidos nas figuras 13, 14, 15 e 16 que se seguem:

Figura 18 - Cartela do tratamento para adultos paucibacilares:



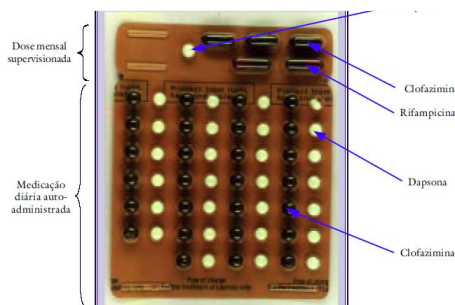
Fonte: Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012). O tratamento é realizado conforme o quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Tratamento das formas paucibacilares da hanseníase nos adultos

DAPSONA		RIFAMPICINA
AUTO-ADMINISTRADA	MENSAL SUPERVISIONADA	MENSAL SUPERVISIONADA
100mg/dia	100mg	600mg
Duração do tratamento: 6 doses mensais supervisionadas. Critério de alta: 6 doses supervisionadas em até 9 meses.		

Fonte: adaptado pelo autor do Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012).

Figura 19- Cartela do tratamento para adultos multibacilares.



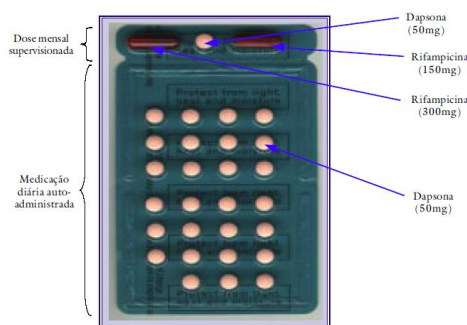
Fonte: Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012). O tratamento é realizado conforme o quadro 2 a seguir.

Quadro 2 - Tratamento das formas multibacilares da hanseníase nos adultos

DAPSONA		RIFAMPICINA	CLOFAZIMINA	
AUTO-ADMINISTRADA	MENSAL SUPERVISIONADA	MENSAL SUPERVISIONADA	AUTO-ADMINISTRADA	MENSAL SUPERVISIONADA
100mg/dia	100mg	600mg	50mg/dia	300mg
Duração do tratamento: 12 doses mensais supervisionadas. Critério de alta: 12 doses supervisionadas em até 18 meses.				

Fonte: adaptado pelo autor do Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012).

Figura 20 - Cartela do tratamento para crianças paucibacilares.



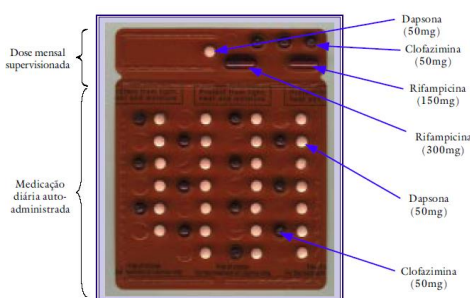
Fonte: Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012). O tratamento é realizado conforme o quadro 3 a seguir.

Quadro 3 - Tratamento das formas paucibacilares da hanseníase em crianças

IDADE EM ANOS	DAPSONA		RIFAMPICINA
	DOSE DIÁRIA	DOSE MENSAL SUPERVISIONADA	DOSE MENSAL SUPERVISIONADA
0 – 5	25mg/dia	25mg	150-300mg
6 – 14	50 – 100mg/dia	50 – 100mg	300-450mg
Duração do tratamento: 6 doses mensais supervisionadas. Critério de alta: 6 doses supervisionadas em até 9 meses.			

Fonte: adaptado pelo autor do Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012).

Figura 21 - Cartela do tratamento para crianças multibacilares



Fonte: Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012). O tratamento é realizado conforme o quadro 4 a seguir.

Quadro 4 - Tratamento das formas multibacilares da hanseníase em crianças

IDADE EM ANOS	DAPSONA		RIFAMPICINA	CLOFAZIMINA	
	DOSE DIÁRIA	DOSE MENSAL SUPERVISI-ONADA	DOSE MENSAL SUPERVISIONADA	DOSE DIÁRIA	DOSE MENSAL SUPERVI-SIONADA
0 – 5	25mg	25mg	150-300mg	100mg/semana	100mg
6 – 14	50 – 100mg	50 – 100mg	300-450mg	150mg/semana	100-200mg
Duração do tratamento: 12 doses mensais supervisionadas de rifampicina. • Critério de alta: 12 doses supervisionadas em até 18 meses.					

Fonte: adaptado pelo autor do Guia de Controle para a Hanseníase (Brasil, 2012).

2.10.1 A dapsona

A dapsona, (4,4-diaminodifenil-sulfona), é um fármaco ativo contra protozoários e bactérias inibindo a síntese de ácido diidrofólico através da competição com o paraamino-benzoato para o sítio ativo da diidropteroate sintetase, quimicamente similar às sulfonamidas em termos de estrutura e atividade antibacteriana. A ação anti-inflamatória da droga não está relacionada com a sua ação antibacteriana e ainda não é totalmente elucidada, mas é uma droga sabidamente eficaz nas doenças inflamatórias caracterizadas por infiltração de grande número de leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos.

Os efeitos colaterais da dapsona podem ser categorizados como dose-dependentes e são incomuns em doses de até 100mg/dia (COLEMAN, 1993).

Eles geralmente incluem anorexia, náuseas, vômitos, taquicardia, cefaléia, nervosismo e insônia.

A “síndrome dapsona” é uma reação de hipersensibilidade que se assemelha a mononucleose infecciosa, trata-se de evento raro e se desenvolve durante as primeiras 6 semanas de administração. Os sintomas são: febre, linfadenopatia, leucopenia, hepatite com icterícia e erupção cutânea exantemática que pode evoluir para síndrome de Stevens-Johnson (HIRAN PANDE, RIZVI, et al., 1994).

Neurites periféricas e psicose são mais comuns em casos de overdose, mas têm sido relatados em pacientes com dermatite herpetiforme tratados com apenas 25 mg /dia. Efeitos colaterais hematológicos incluem hemólise e metahemoglobinemia que são dose-dependentes e são mais comuns e graves em pacientes com glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) (TODD, SAMARATUNGA, PEMBROKE, 1994).

Em longo prazo, administração (100mg/dia) em pacientes normais (com níveis normais de G6PD) pode resultar em significativa metahemoglobinemia, que não é causado pela dapsona em si, mas sim por seu metabólito hidroxilamina (MANFREDI, DE PANFILIS, ZAMPETTI et al., 1979).

Anemia aplástica e agranulocitose também foram relatados. A maioria dos casos de agranulocitose se desenvolveram nos primeiros 8-12 semanas de terapia. Esta condição é geralmente reversível dentro de uma semana, mas também pode ser fatal (MEYERSON, COHEN, 1994; WOODBURY, FRIED, ERTLE et al, 1993).

Há ainda relatos de nefrotoxicidade, traduzidos por necrose de papila renal e síndrome nefrótica e ainda colestase induzida por hipersensibilidade à droga (REVUZ, HORNAC, 1981; HOFFBRAND, 1978.)

Os efeitos colaterais cutâneos são fotossensibilidade, eritema nodoso e até mesmo necrólise epidérmica tóxica (DHANAPPAUL, 1989).

A dapsona não é carcinogênica e nem teratogênica. Há relatos do número aumentado de gestações gemelares por mecanismos desconhecidos (MAURUS, 1978).

Estudos sugerem que o cetoconazol e a cimetidina diminuem os efeitos colaterais sistêmicos da droga (COLEMAN, 1993).

As principais contraindicações são a hipersensibilidade as sulfas ou à própria dapsona, pacientes com doença cardíaca grave ou doença pulmonar, pacientes com deficiência de G6PD, e pacientes com doenças hepáticas graves incluindo hepatite e porfiria cutânea aguda (GRUNWALD, AMICHAH, 1996).

2.10.2 A Rifampicina

A rifampicina é um agente antimicrobiano da família das ansamicinas. Foi isolado em 1959 por Sensi et al a partir das espécies *Amycolatopsis mediterranei* (antigamente chamado de *Streptomyces mediterranei* e da *Nocardia mediterranei*) e foi introduzido como terapêutica a partir de 1962.

A rifampicina foi originalmente testada em pata de camundongo para atividade contra o *M. leprae* in 1967. Ela se mostrou igualmente ativa contra cepas sensíveis e resistentes à dapsona. (REES, 1970).

Os efeitos colaterais mais comuns da rifampicina podem basicamente ser divididos em dois tipos: hepatotoxicidade e imunoalergenicidade. Em relação à hepatotoxicidade, a

rifampicina causa mudanças na função hepática, porém o risco de sérias injúrias hepáticas é baixo em pacientes sem história prévia de dano hepático. (GIRLING, 1977)

Alergia ou reações de hipersensibilidade são relativamente infreqüentes particularmente quando a dose é respeitada à dosagem de 600mg diários, como no tratamento da tuberculose (na hanseníase utilizam-se 600mg mensais de rifampicina). (GROSSET, LEVENTIS, 1993).

No sistema gastrointestinal anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal. Há relatos de hepatite.

A síndrome pseudogripal caracteriza-se por febre, calafrios e mal-estar, bem como, às vezes cefaleia, tontura, ou dor óssea. Os episódios geralmente desenvolvem uma a quatro horas após o tratamento e geralmente desaparecem dentro de algumas horas. A incidência da síndrome pseudogripal com rifampicina está associada com a dose e, especialmente, com a terapêutica intermitente. (BURMAN, GALLICANO, PELOQUIN et al., 2001).

Trombocitopenia, hemólise e insuficiência renal aguda podem ocorrer em alguns pacientes, também associados à terapêutica intermitente com rifampicina. Atualmente são considerados eventos raros. (LAKSHMINARAYAN, SAHN, HUDSONI, 1973).

A rifampicina demonstrou ter propriedades imunomoduladoras. Um estudo mostrou um aumento modesto da IL-1a e liberação de TNF- α em sobrenadantes de monócitos humanos após tratamento com rifampicina. (TUFANO, CIPOLLARO DE L'ERO, IANNIELLO et al, 1992).

Outros estudos em monócitos humanos mostraram que a rifampicina inibiu a produção de IL-1b e TNF- α , mas aumentou significativamente a secreção de IL-6 e IL-10. (ZIGLAM , DANIELS, FINCH et al., 2004).

Além disso, a rifampicina pareceu aumentar as citocinas induzidas pela produção de óxido nítrico.

Um estudo relativamente recente em pacientes com tuberculose acompanhados por vários meses indicou que o tratamento com rifampicina correlaciona-se com o aumento dos níveis de IFN- γ e esta resposta pode estar relacionada também ao resultado do tratamento. (YUHAS Y, 2006).

2.10.3 A Clofazimina

A Clofazimina é utilizada no tratamento da hanseníase desde 1962, e passou a fazer parte do esquema da poliquimioterapia da hanseníase a partir de 1982, conforme determinação da World Health Organization no esquema de tratamento para os pacientes multibacilares.

O seu mecanismo de ação é desconhecido, mas o principal local onde atua parecem ser os neutrófilos e monócitos (NAUSEEF WM, 1998).

Os efeitos colaterais mais comuns da clofazimina são na pele, no sistema gastrointestinal e no globo ocular. (MACKEY, BARNES, 1974).

Uma hiperpigmentação é comum e desaparece poucos meses após o término do tratamento. Ictiose é o segundo efeito mais comum. (GARRELT, 1991; CAVER, 1982).

Outros efeitos cutâneos menos comuns são o *rash*, prurido e a dermatite esfoliativa. (PAVITHRAM, 1985).

No sistema gastrointestinal, náuseas e diarreia podem ocorrer. O efeito colateral mais grave consiste na deposição de cristais ao longo do intestino delgado, o que pode provocar enteropatia severa, mas raramente fatal. Este efeito é raro e acontece no tratamento com altas doses de clofazimina (>100mg/dia) por vários meses. (BELAUBE, DEVAUX, PIZZI, et al., 1983).

Outros efeitos colaterais mais raros são o infarto esplênico e a enterite eosinofílica. (MCDUGALL, HORSFALL, HEDE et al, 1980; RAVI, HOLUBKA, VENERI et al., 1993).

Hiperpigmentação da córnea, conjuntiva e fluidos lacrimais ocorrem com frequência nos pacientes em tratamento com a clofazimina. O exame com lâmpada de fenda revela a deposição de microcristais de clofazimina. Pequenas estrias acastanhadas podem também ser visualizadas na córnea. Estes fatores não afetam a visão e desaparecem após a descontinuidade do tratamento. WÄLINDER GIP, STEMPEL et al., 1976; FONT, SOBOL, MATOBA, 1989).

A clofazimina não é mutagênica e nem teratogênica. Pode ocorrer pigmentação do neonato quando o tratamento é realizado na gravidez. (GANGADHARAM, PERUMAL, JAIRAM et al., 1989).

Devido aos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores da clofazimina, a mesma também é empregada no tratamento dos episódios reacionais do tipo eritema nodoso hansênico (ANDERSON, ZEIS, ANDERSON IF, et al., 1988).

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Em pleno século XXI, a hanseníase ainda se apresenta como importante endemia, tendo no Brasil o segundo maior número de casos novos detectados a cada ano em todo o mundo. É doença predominante entre as classes socioeconômicas menos favorecidas. Apesar do contínuo esforço do Programa Nacional de Combate à Hanseníase e das políticas de descentralização das ações em saúde, os indicadores permanecem mostrando uma crescente detecção de casos novos da doença.

Tornam-se imprescindíveis os avanços científicos no estudo desta patologia, sobretudo aqueles voltados na tentativa de avançar o entendimento dos complexos mecanismos imunológicos e imunogenéticos que norteiam a hanseníase, na tentativa de contribuir futuramente em sua profilaxia, vez que a poliquimioterapia, apesar de ter modificado as perspectivas epidemiológicas, *de per si* não se mostra suficiente para modificação dos indicadores da endemia.

A dicotomia de resposta linfocitária T_H1/T_H2 permanece aceita na literatura mundial como sendo o padrão de resposta imunológica na hanseníase. O direcionamento deste mecanismo para um destes dois polos justificaria o desenvolvimento das formas paucibacilares e multibacilares da doença.

Contudo, a descoberta das células T_H17 como uma população distinta, oriunda diretamente das mesmas células precursoras dos linfócitos T_H1 e T_H2 e que pode também participar ativamente dos mecanismos de defesa frente à agressão por micobactérias, vem estimular a necessidade de se entender a participação deste subconjunto linfocitário na hanseníase, podendo vir a acrescentar mais um capítulo no estudo da imunologia da doença.

Ao despeito do avanço das pesquisas no que concerne às subpopulações linfocitárias, ainda não existe nenhum estudo publicado relacionando as células T_H17 e a hanseníase, doença cujo desenrolar-se depende fundamentalmente da elaboração de adequada (ou não) resposta imunocelular.

Espera-se que o presente trabalho deixe a sua parcela de contribuição científica, servindo de estímulo para que novas pesquisas avancem acerca do tema, que ora se apresenta como de significativo impacto social.

4. HIPÓTESE

Hipótese 0: Existe diferença entre os níveis de IL-17, IFN- γ e a frequência de linfócitos T_H17 entre os pacientes com hanseníase nas formas paucibacilares e multibacilares.

Hipótese 1: Não existe diferença entre os níveis de IL-17, IFN- γ e a frequência de linfócitos T_H17 entre os pacientes com hanseníase nas formas paucibacilares e multibacilares.

Hipótese 2: Existe diferença entre os níveis de IL-17, IFN- γ e a frequência de linfócitos T_H17 nos contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase nas formas paucibacilares e multibacilares.

Hipótese 3: Não existe diferença entre os níveis de IL-17, IFN- γ e a frequência de linfócitos T_H17 nos contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase nas formas paucibacilares e multibacilares.

Hipótese 4: O tratamento poliquimioterápico modifica os níveis de IL-17, IFN- γ e a frequência de linfócitos T_H17 entre os pacientes paucibacilares e multibacilares.

Hipótese 5: O tratamento poliquimioterápico não modifica os níveis de IL-17, IFN- γ e a frequência de linfócitos T_H17 entre os pacientes paucibacilares e multibacilares.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar a população de células T_H17 , a produção de IL-17 e IFN- γ nos indivíduos portadores de hanseníase nas formas paucibacilares e multibacilares antes do tratamento e quando submetidos à poliquimioterapia.

5.2 Objetivos Específicos:

- Verificar a frequência de células T_H1 ($CD4^+ IFN-\gamma^+ IL-17^+$) e T_H17 ($CD4^+ IFN-\gamma^- IL-17^+$) em pacientes portadores de hanseníase com as formas paucibacilares e multibacilares, virgens de tratamento e após o início do tratamento poliquimioterápico.
- Identificar a correlação entre as citocinas IL-17 e IFN- γ nos pacientes portadores de hanseníase com as formas paucibacilares e multibacilares.
- Verificar se o tratamento poliquimioterápico influencia na frequência de células T_H1 e T_H17 entre pacientes portadores de hanseníase com as formas paucibacilares e multibacilares.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Área de Estudo

As amostras sanguíneas e as análises estatísticas foram processadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) localizado no Campus Universitário da Universidade Federal de Pernambuco.

6.2 População

Os pacientes foram selecionados no Centro de Saúde Amélia de Pontes, localizado em Caruaru, Pernambuco, Brasil. Trata-se de serviço de referência municipal em Dermatologia, Hansenologia, Infectologia e Pneumologia que concentra atendimentos nestas áreas médicas de pacientes oriundos do próprio município e de municípios circunvizinhos pactuados da região do agreste do estado de Pernambuco. Os pacientes com suspeição diagnóstica ou com diagnóstico confirmado de hanseníase chegam ao serviço por demanda espontânea ou são encaminhados de outros serviços de atenção primária à saúde. Apesar das políticas de descentralização do Programa Nacional de Controle da Hanseníase, muitos profissionais são inseguros para estabelecer um diagnóstico de hanseníase e iniciar de pronto o tratamento poliquimioterápico. No período estabelecido para as coletas sanguíneas, 23 pacientes chegaram ao serviço e todos aceitaram participar deste estudo. Destes pacientes, 13 foram classificados como multibacilares e 10 como paucibacilares. A classificação clínica considerou a apresentação clínica da doença nos indivíduos diagnosticados, levando-se em consideração a classificação de Madrid modificada por Ridley-Jopling. A classificação operacional estratificou os pacientes portadores de hanseníase em paucibacilares e multibacilares de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde. A análise dos resultados obtidos levou em consideração esta classificação. Para a avaliação clínica destes pacientes foram realizados questionários e registro em prontuários dos seguintes dados: identificação (nome, idade, sexo e grupo étnico), tempo de aparecimento da doença, classificação clínica, classificação operacional, histórico familiar de casos de hanseníase, histórico de contato com doente de hanseníase, histórico de doenças infecciosas crônicas ou doenças autoimunes e uso de medicações. Todos os pacientes diagnosticados com hanseníase neste período foram pacientes sem complicações ou comorbidades que pudessem interferir na evolução esperada da doença. Após o diagnóstico, a realização dos exames necessários e a coleta da amostra

sanguínea, receberam a primeira dose da PQT e foram redirecionados para a unidade de atenção primária a que pertenciam ou de onde eram oriundos.

Todos os pacientes foram orientados a trazer seus contatos intradomiciliares para serem examinados, mas um pequeno número atendeu a esta solicitação, de maneira que houve a participação de 10 indivíduos deste grupo. Após o segundo mês de tratamento poliquimioterápico, os pacientes foram orientados a retornar para a realização de mais uma coleta sanguínea. Sete pacientes atenderam a esta solicitação.

6.3 Período de referência

O presente estudo foi realizado no período compreendido entre o mês de novembro de 2011 e junho de 2012.

6.4 Desenhos de estudo

Trata-se de estudo exploratório, descritivo, longitudinal e analítico, incluindo 23 casos novos de hanseníase (13 multibacilares e 10 paucibacilares) sem tratamento, 7 casos após o segundo mês de tratamento e 10 contatos intradomiciliares destes mesmos doentes.

6.5 Definição das variáveis

As variáveis independentes estão representadas pela frequência de IL-17, de INF- γ , de linfócitos T_H1 e de linfócitos T_H17 . As variáveis dependentes serão representadas pela classificação operacional da hanseníase e pelos contatos intradomiciliares.

6.6 Procedimento experimental

a) Coleta Sanguínea:

As coletas sanguíneas foram realizadas mediante punção de veia periférica cefálica, basílica ou intermédia do cotovelo na fossa cubital de um dos antebraços utilizando-se de "butterfly" (escalpe) ou suporte de coleta para tubos "Vacutainer®".

b) Cultura Celular

As culturas de sangue periférico foram realizadas em tubos de polipropileno de 14 mL (BD System™). Utilizou-se 500µL de sangue total em 1 mL de meio RPMI 1640 com glutamina (2mM), gentamicina 50mg/mL (Sigma®), 10mM HEPES (Sigma®) e 10% soro fetal bovino (Cultilab®). As células do sangue periférico foram estimuladas separadamente com Fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO™/Invitrogen Corporation®) (10 µg/mL) e com o bacilo de Calmete-Guérin (BCG) (1µg/mL), na presença de 0,5µL de BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor™ (BD bioscience®) nas últimas 5 horas. Os tubos foram incubados a 37°C com 5% CO₂ por 24 horas.

c) Detecção das citocinas intracitoplasmáticas

As suspensões celulares foram lavadas com 8 mL PBS-BSA 0,5% (tampão fosfato pH 7,2 com soro albumina bovina) à 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, deixando um volume de aproximadamente 500µL. Foram retirados 100µL do sangue e colocados em tubos de poliestireno (5mL) (tubos Falcon BD System™ N°352059) e acrescentados 2mL de Solução de Lise diluída 1X (2,85% de citrato de sódio, 30% etilenoglicol 54% formaldeído 37%, 0,04% de heparina 100000USP), sob agitação em Vortex, a suspensão foi incubada ao abrigo da luz, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Para bloquear a reação foi adicionado 1 mL de PBS-BSA 0,5%. As suspensões foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. As células lisadas foram lavadas duas vezes com 2mL de PBS-BSA 0,5% à 300 x g por 5 minutos e em seguida, fixadas com 500µL de BD Cytotfix™ (BD Catálogo N° 554655) por 20 minutos e em seguida lavadas duas vezes com PBS-BSA 0,5%.

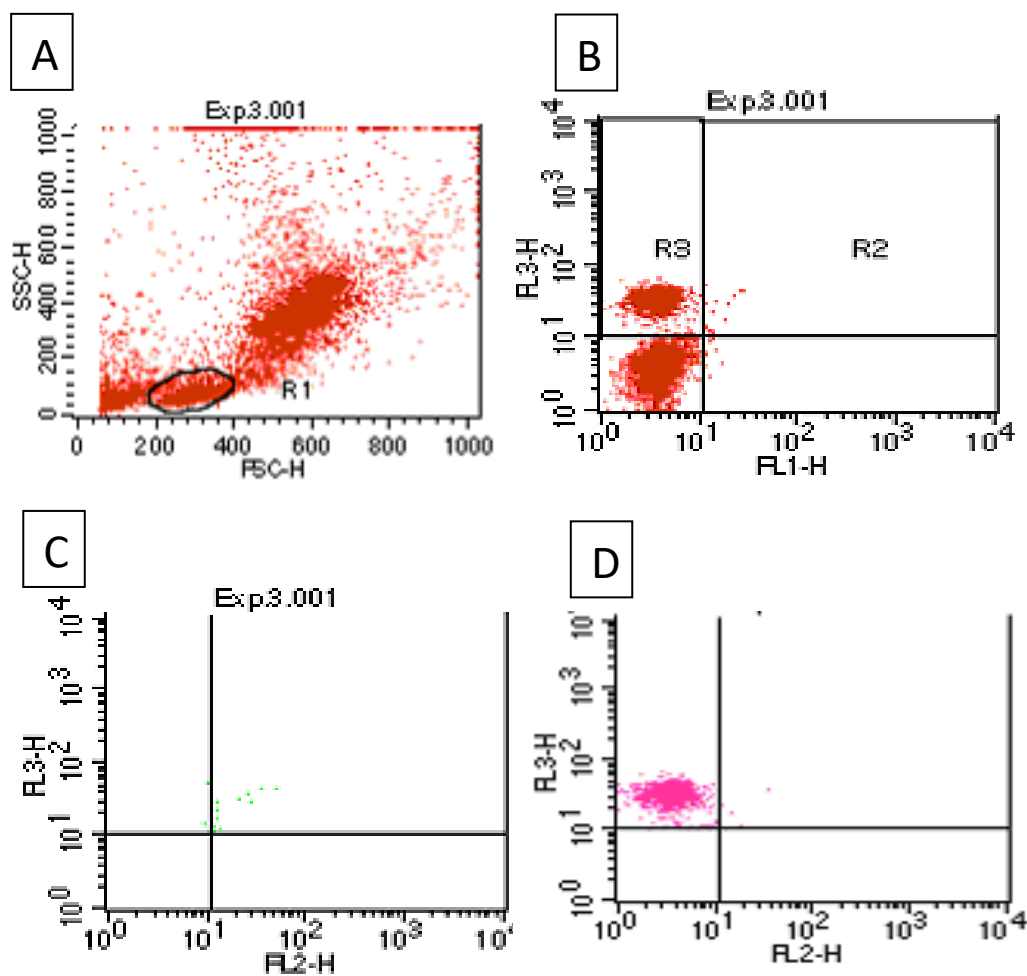
As células fixadas foram permeabilizadas em 1mL de BD Perm/Wash™ (BD Catálogo N° 554723) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas à 300 x g por 10 minutos, removendo-se o sobrenadante. As suspensões celulares foram marcadas com 5µL da mistura de anticorpos CD4 PERCP-CY5.5 (clone SK3) (FL3); IL-17A PE (clone N49-653) (FL2), IFN-GAMA FITC (clone B27) (FL1) por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após coloração as suspensões foram lavadas duas vezes com 1mL de BD Perm/Wash™ e centrifugadas à 300 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas com 400µL de BD Cytotfix™.

e) Aquisição e análise no citômetro de fluxo

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (FACScalibur™, BD Pharmingen®). A aquisição e análise das amostras foram realizadas no Núcleo de Plataformas

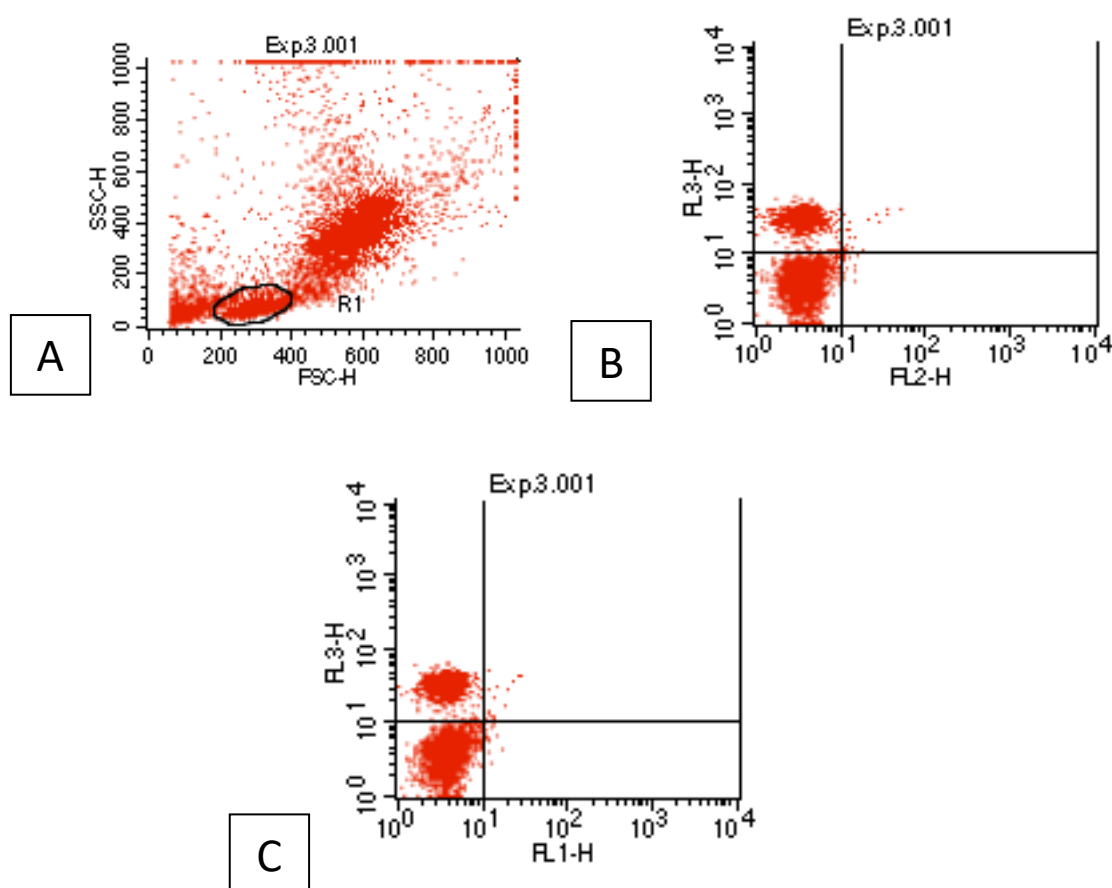
Tecnológicas (NPT) /CPqAM/FIOCRUZ. A população de linfócitos foi selecionada utilizando o dot plot FSC versus SSC, sendo adquiridos 10000 eventos dentro da janela de interesse (R1), onde as subpopulações de linfócitos T e as citocinas intracitoplasmáticas foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Para realizar a análise da expressão de IL-17 em células $CD4^+IFN\gamma^-$ (Células T_H17) foi selecionada a janela de interesse R3 no gráfico FL3 versus FL1 (Fig. 22 e 23).

Figura 22 - Dot plot da aquisição de linfócitos T_H17



Notas: (A) gráfico de granulosidade SSC versus FSC para seleção da população de linfócitos. (B) FL3 Versus FL1, R3 ($CD4^+IFN\gamma^-$) e R2 ($CD4^+IFN\gamma^+$). A partir deste gráfico foram selecionados os linfócitos $CD4^+IFN\gamma^-$ (C), que apresentavam a expressão de IL-17 constituindo a população de células T_H17 (D).

Figura 23 - Dot plot da aquisição de linfócitos T $CD4^+IFN-\gamma^+$.



Notas: (A) gráfico de granulosidade SSC versus FSC para seleção da população de linfócitos (R1). (B) FL3 Versus FL2, para seleção de duplo positivo $CD4^+IL17^+$. (C) FL3 versus FL1 para seleção de duplo positivo $CD4^+IFN-\gamma^+$.

6.6.1 Critérios de inclusão

- Doentes de hanseníase em qualquer forma de classificação clínica espectral levando-se em consideração a classificação de Madrid modificada por Ridley-Jopling e operacionalmente classificados como paucibacilares e multibacilares, virgens de tratamento.
- Contatos intradomiciliares com histórico familiar positivo de casos de hanseníase, porém saudáveis. Segundo a Portaria Conjunta nº 125, de 26 de março de 2009 do Ministério da Saúde do Brasil, “para fins operacionais considera-se contato

intradomiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase nos últimos 5 (cinco) anos”.

6.6.2 Critérios de exclusão

- Doentes de hanseníase que apresentaram no momento do diagnóstico quaisquer coinfeções, doenças de natureza autoimune ou estados reacionais da hanseníase.
- Doentes de hanseníase que tenham apresentado estados reacionais antes do diagnóstico.
- Contatos intradomiciliares coinfectados ou portadores de doenças autoimunes.

6.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados de expressão de citocinas e fenotipagem celular foi realizada através do software GraphPad PRISM 5.0®. Foi realizada análise de variância ANOVA e diante da heterogeneidade das amostras foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns. Para comparar a população de células T_H17 entre indivíduos tratados e não tratados, teste de Wilcoxon para amostras pareadas. A avaliação de correlação entre as produções de citocinas foi realizada pelo teste de correlação de Pearson.

6.8 Considerações Éticas

O presente projeto obedeceu à resolução 196/96 e foi submetido à análise pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco. Os trabalhos de coleta das amostras sanguíneas iniciaram-se após a sua aprovação (protocolo 2081/11). Os pacientes foram tratados com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc. foram enviados para cada um e permaneceram confidenciais. Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está arquivada no Curso “Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco” e outra foi fornecida ao paciente.

6.9 Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Todas as pessoas envolvidas no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (apêndice 1).

7. RESULTADOS

7.1 Perfil dos Doentes de hanseníase (D)

De acordo com os conceitos estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil (2010), um caso de hanseníase é representado por um paciente que apresente um ou mais dos seguintes sinais cardinais:

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

Vinte e três doentes de hanseníase foram avaliados. Este número se refere ao quantitativo total de doentes que chegaram aos serviços por demanda espontânea ou encaminhados de outros serviços no período determinado para as coletas. Não houve recusa por parte de nenhum deles em participar do estudo, apesar de nem todos retornarem conforme solicitado ao segundo mês de tratamento para prosseguimento desta pesquisa, após o início do tratamento poliquimioterápico.

A análise do perfil destes pacientes mostrou que dos 20 pacientes estudados, 10 pacientes (43,4%) foram considerados paucibacilares e 13 pacientes (56,5%) foram considerados multibacilares. A classificação clínica de Madrid modificada por Ridley-Jopling demonstrou que 4 pacientes (17,9%) foram da forma indeterminada, 6 pacientes (26%) foram da forma tuberculóide, 7 pacientes (30,4%) foram da forma dimorfa-dimorfa, 2 pacientes (8,7%) foram da forma dimorfa-virchowiana e 4 pacientes (17,9%) foram da forma virchowiana. Todos os pacientes foram maiores de 15 anos. A idade variou entre 15 e 76 anos, com idade média de 34,8 anos. Nove pacientes foram do sexo feminino (39,1%) e 14 pacientes (60,8%) foram do sexo masculino. A baciloscopia foi realizada em todos os pacientes. Todos os pacientes classificados como paucibacilares tiveram a sua baciloscopia negativa. Todos os pacientes classificados como multibacilares, tiveram a baciloscopia positiva. Os demais exames complementares realizados com o propósito de excluir comorbidades de todos os pacientes não demonstraram alterações. Em relação ao número de troncos nervosos acometidos, 10% apresentaram dois troncos nervosos afetados, 45% apresentaram um tronco nervoso afetado e 45% não tinham comprometimento de troncos nervosos (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil dos doentes de hanseníase

D	N LES	N NERV	FORM CLIN	OPR	IDADE	SEXO	BACIL
D1	1	0	I	PB	26	F	NEG
D2	1	0	I	PB	42	F	NEG
D3	2	0	T	PB	21	F	NEG
D4	1	0	T	PB	20	F	NEG
D5	1	0	I	PB	21	F	NEG
D6	1	0	I	PB	15	M	NEG
D7	1	0	T	PB	48	F	NEG
D8	DISS	2	DV	MB	26	F	POS (IB= 0,75)
D9	1 EXT	1	D	MB	31	M	POS (IB=1,0)
D10	DISS	1	DV	MB	26	M	POS (IB=1,75)
D11	DISS	1	V	MB	29	M	POS (IB=3,5)
D12	1 EXT	1	D	MB	76	M	POS (IB=1,0)
D13	1 EXT	1	D	MB	24	F	POS (IB=1,0)
D14	DISS	1	V	MB	63	M	POS (IB=4,25)
D15	3 EXT	1	D	MB	30	M	POS (IB=1,0)
D16	DISS	0	V	MB	64	M	POS (IB=3,5)
D17	3 EXT	0	D	MB	15	M	POS (IB=1,0)
D18	1	1	T	PB	42	M	NEG
D19	DISS	1	D	MB	34	M	POS (IB=1,0)
D20	DISS	2	D	MB	39	M	POS (IB=1,0)
D21	2	0	T	PB	22	M	NEG
D22	3	0	T	PB	29	F	NEG
D23	DISS	1	V	MB	59	M	POS (IB=3,5)

Notas: D, Doente de hanseníase; N LES, número de lesões cutâneas; N NERV, número de nervos comprometidos; FORM CLIN, forma clínica da hanseníase; OPR, classificação operacional da hanseníase; BACIL, baciloscopia; IB, índice baciloscópico; DISS, disseminadas; EXT, extensa; I, indeterminada; T, tuberculóide; DV dimorfa-virchowiana; D, dimorfa; T, tuberculóide; V, virchowiana; PB, paucibacilar; MB, multibacilar.

7.2 Perfil dos contatos intradomiciliares dos doentes de hanseníase (CT)

A despeito de todas as recomendações, nem todos os doentes de hanseníase atenderam à solicitação para conduzirem os seus contatos intradomiciliares a fim de serem examinados. Dos que conduziram, nem todos aceitaram ser voluntários neste trabalho e ainda, alguns doentes não possuíam contatos intradomiciliares. Os resultados da triagem deste grupo encontram-se expressos na tabela a seguir:

Tabela 2- Perfil dos contatos intradomiciliares dos doentes de hanseníase.

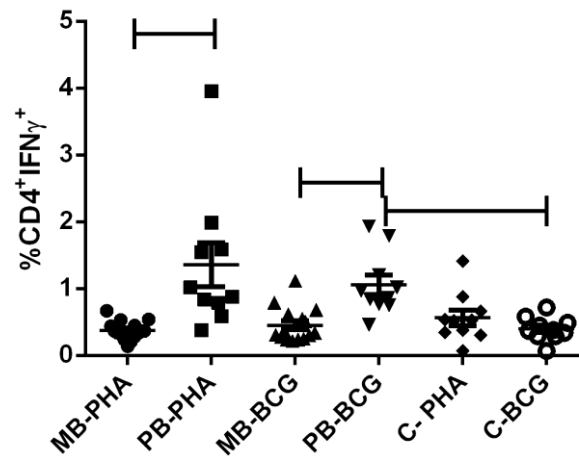
CONTATO	PARENTESCO	FORMA CLÍNICA DO DOENTE	IDADE	SEXO
CT1	FILHA	D	40	F
CT2	FILHO	D	54	M
CT3	PAI	T	53	M
CT4	IRMÃ	T	22	F
CT5	ESPOSA	I	32	F
CT6	FILHO	I	10	M
CT7	FILHO	I	16	M
CT8	IRMÃO	V	52	M
CT9	IRMÃ	V	61	F
CT10	FILHA	V	49	F

Notas: CT, Contato; D, dimorfa; T, tuberculóide; I, indeterminada; V, virchowiana; F, sexo feminino; M, sexo masculino.

Observa-se que neste grupo, 90% dos contatos intradomiciliares apresentaram algum grau de parentesco com o doente de hanseníase, 50% foram do sexo masculino, 50% do sexo feminino. Três contatos examinados tinham parentesco com a forma virchowiana polar, o que é preocupante, pois esta forma é a maior responsável pela disseminação do bacilo na comunidade, apesar de já ter sido demonstrada também a importância na cadeia de transmissão dos pacientes com formas clínicas paucibacilares da doença. (GOULART, BERNARDES SOUZA, MARQUES, et al., 2008)

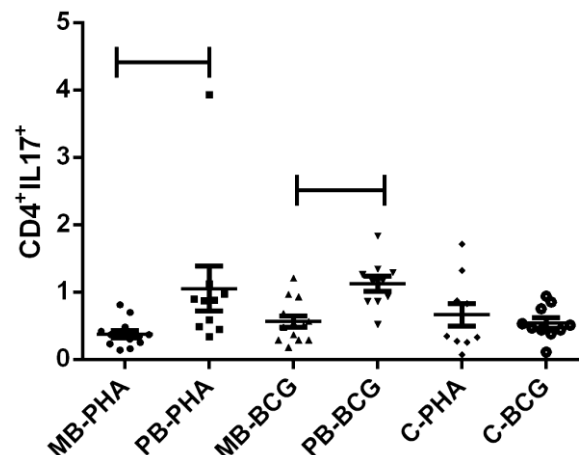
7.3 Resultado das amostras em pacientes virgens de tratamento.

Em relação à expressão de células TCD4^+ $\text{IFN-}\gamma^+$, (T_{H1}) os grupos de pacientes virgens de tratamento, estratificados em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) exibiram resultados distintos. O padrão de resposta foi semelhante quando as células do sangue periférico foram estimuladas com a fitohemaglutinina (PHA) e com o bacilo de Calmete-Guérin (BCG). Os indivíduos portadores de hanseníase considerados multibacilares apresentaram uma baixa expressão de células TCD4^+ $\text{IFN-}\gamma^+$, que se assemelhou ao mesmo padrão obtido em relação aos contatos intradomiciliares, sendo que estes últimos, ao estímulo com PHA apresentaram um discreto aumento em relação ao estímulo com BCG. As diferenças entre os indivíduos paucibacilares estimulados com o BCG (PB-BCG) e com a fitohemaglutinina (PB-PHA) foram significativamente maiores ($p < 0.001$), que os indivíduos multibacilares (MB-BCG e MB-PHA) conforme demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Frequência de células $CD4^+$ produtoras de $IFN-\gamma$.

Notas: Células de sangue periférico de pacientes multibacilares (MB), paucibacilares (PB) e contatos sem a infecção (C) foram estimuladas com PHA (10 μ g/ml) e BCG (1 μ g/ml) por 24 horas. PB-BCG significativamente maior que MB-BCG, PB-PHA significativamente maior que MB-PHA ($p < 0.001$).

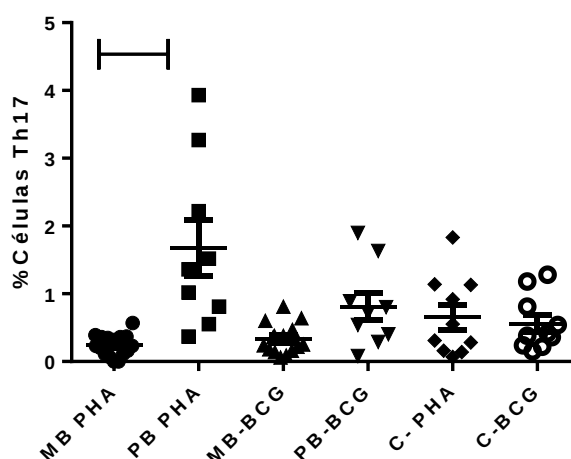
Do mesmo modo, a frequência de células $CD4^+IL-17^+$ (T_H1+T_H17) apresentou comportamento distinto quando comparada com os grupos paucibacilares e multibacilares. O estímulo com PHA demonstrou que o grupo multibacilar teve uma produção consideravelmente menor de IL-17 por células $CD4^+$ em relação ao grupo paucibacilar. Os pacientes paucibacilares apresentaram maior produção de IL-17 após o estímulo com o BCG. O comportamento dos contatos intradomiciliares em relação a esta produção de IL-17 por células $CD4^+$, quando estimulados com PHA apresentaram um padrão aproximado dos indivíduos paucibacilares quando estimulados com o BCG. (Gráfico 2)

Gráfico 2- Frequência de células $CD4^+IL-17^+$.

Notas: Células de sangue periférico de pacientes multibacilares (MB), paucibacilares (PB) e contatos intradomiciliares (C) foram estimuladas com PHA (10µg/ml) e BCG (1µg/ml) por 24 horas. PB-BCG significativamente maior que MB-BCG, PB-PHA significativamente maior que MB-PHA ($p < 0.001$).

As células T_H17 ($CD4^+IL-17^+IFN-\gamma^-$) apresentaram uma resposta ainda mais significativa na comparação entre os grupos de indivíduos doentes de hanseníase, sobretudo quando estimuladas com a PHA. Os indivíduos multibacilares demonstraram uma frequência consideravelmente inferior em comparação com os indivíduos paucibacilares. Mesmo em menor proporção, o estímulo com o BCG também demonstrou significância estatística entre os grupos. Os contatos intradomiciliares em relação aos indivíduos multibacilares, do mesmo modo apresentaram uma maior produção de células T_H17 , tanto quando estimulados com a PHA quanto estimulados com o BCG. (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Frequência de células T_H17 .



Notas: Células de sangue periférico de pacientes multibacilares (MB), paucibacilares (PB) e contatos intradomiciliares sem a infecção (C) foram estimuladas com PHA 10µg/ml e BCG (1µg/ml) por 24 horas. C-BCG aproximado a PB-BCG. PB-BCG significativamente maior que MB-BCG, PB-PHA significativamente maior que MB-PHA ($p < 0.001$).

A correlação entre as citocinas inflamatórias $IFN-\gamma$ e IL-17 após o estímulo com PHA e BCG foi positiva, tanto nos pacientes com a forma paucibacilar da doença quanto nos pacientes multibacilares (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficiente de correlação entre as citocinas IL-17 e IFN- γ após estímulo com PHA e BCG em pacientes paucibacilares e multibacilares.

Coeficiente de correlação		
	Multibacilar IL-17 x IFN- γ	Paucibacilar IL-17 x IFN- γ
PHA	0,84	0,932
BCG	0,959	0,787

7.4 Resultado comparativo das amostras antes e após o segundo mês de tratamento.

Os pacientes multibacilares antes do tratamento (MB-ST) após o segundo mês do tratamento poliquimioterápico (MB-CT), apresentaram uma significativa expansão da população de células CD4⁺IFN γ ⁺, sobretudo quando estimuladas com a PHA ($p < 0,05$). O estímulo com o BCG também apresentou esta mesma tendência à expansão (gráficos 4 e 5).

Gráfico 4 - Comparativo de frequência de células CD4⁺IFN γ ⁺ em pacientes multibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com PHA.

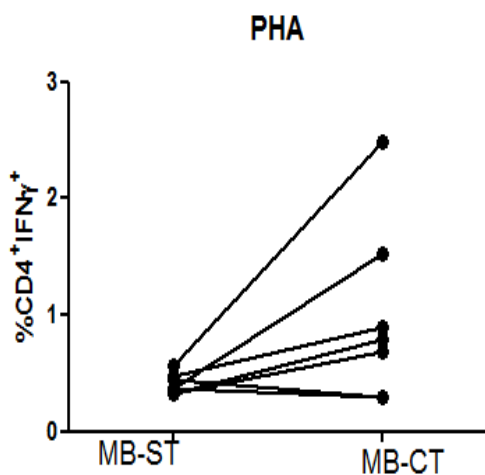
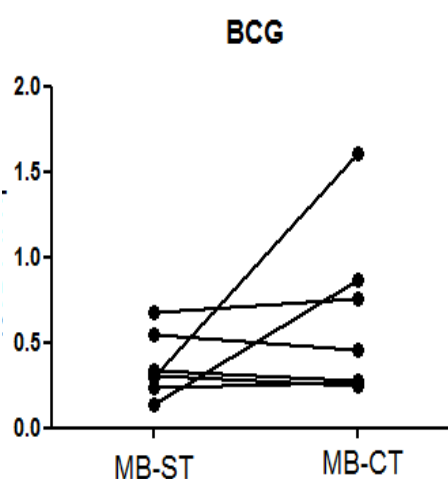


Gráfico 5 - Comparativo de frequência de células CD4⁺IFN γ ⁺ em pacientes multibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com BCG.



Notas: Células de sangue periférico de pacientes multibacilares antes (MB-ST) e após o segundo mês do tratamento poliquimioterápico (MB-CT) foram estimuladas com PHA (10 μ g/ml) e BCG (1 μ g/ml) por 24 horas. Células CD4⁺IFN γ ⁺ de pacientes MB tratados e estimulados com PHA tiveram níveis significativamente maiores que antes do tratamento ($p < 0,05$).

A população de células $CD4^+IFN\gamma^+$ dos pacientes paucibacilares após o segundo mês de tratamento no estímulo com PHA e com o BCG não apresentaram alterações significativas. (gráficos 6 e 7).

Gráfico 6 – Comparativo de frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$ em pacientes paucibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com PHA.

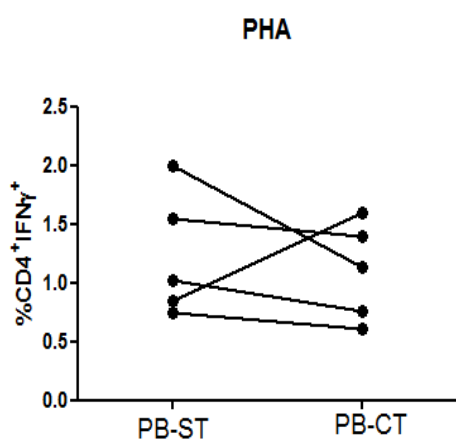
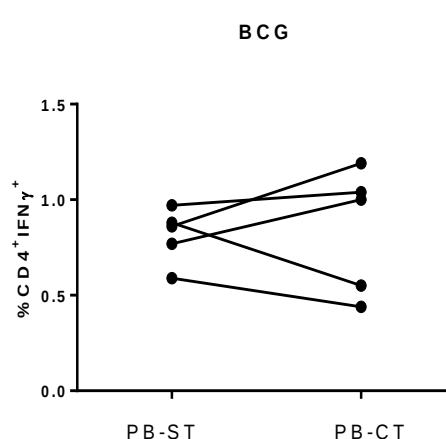


Gráfico 7 – Comparativo de frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$ em pacientes paucibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com BCG.



Notas: Células de sangue periférico de pacientes paucibacilares antes (PB-ST) e após o segundo mês do tratamento poliquimioterápico (PB-CT) foram estimuladas com PHA 10µg/ml e BCG (1µg/ml) por 24 horas. Não foram observadas variações significativas na frequência de células $CD4^+IFN\gamma^+$.

Em relação à frequência de células $CD4^+IL-17^+$ nos pacientes multibacilares, houve uma significativa expansão de sua população antes e após o segundo mês de tratamento poliquimioterápico com ambos os estímulos (Gráficos 8 e 9), sobretudo após o estímulo com a PHA ($p < 0,05$). O tratamento não modificou significativamente a frequência de células $CD4^+IL-17^+$ nos pacientes paucibacilares diante de ambos os estímulos (Gráficos 10 e 11).

Gráfico 8 - Comparativo de frequência células $CD4^+IL17^+$ em pacientes multibacilares após o segundo mês de tratamento poliquimioterápico quando estimulados com a PHA

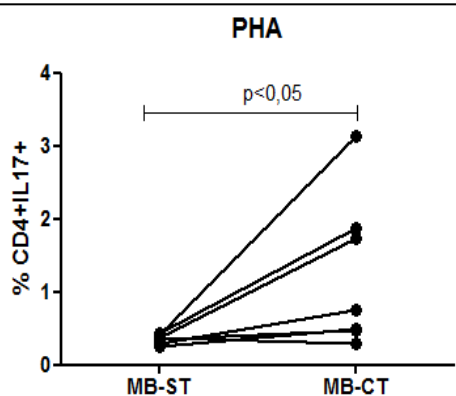
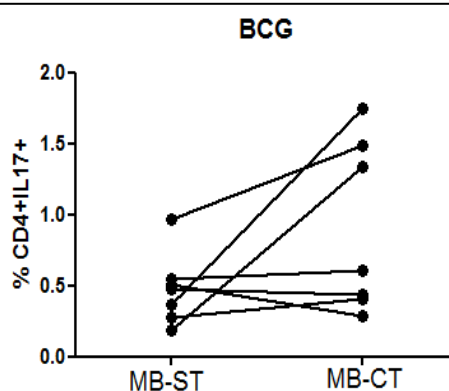


Gráfico 9 – Comparativo de frequência de células $CD4^+IL-17^+$ em pacientes multibacilares antes e após o tratamento, quando estimulados com BCG.



Notas: Células de sangue periférico de pacientes multibacilares (MB), antes e após o início do tratamento poliquimioterápico foram estimuladas com PHA 10µg/ml e BCG (1µg/ml) por 24 horas. Células de pacientes MB tratados e estimulados com PHA tiveram níveis significativamente maiores de células CD4⁺IL17⁺ que antes do tratamento ($p<0,05$).

Gráfico 10 – Comparativo de frequência de células CD4⁺IL17⁺ em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA.

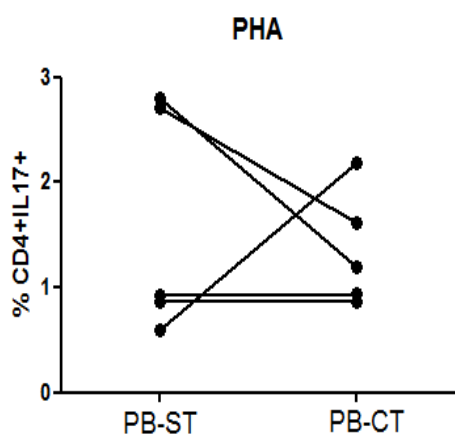
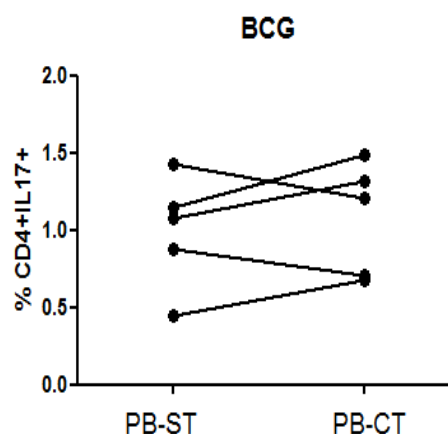


Gráfico 11 – Comparativo de frequência de células CD4⁺IL17⁺ em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com BCG.



Notas: Células de sangue periférico de pacientes paucibacilares antes (PB-ST) e após o início do tratamento poliquimioterápico (PB-CT) foram estimuladas com PHA (10µg/ml) e BCG (1µg/ml) por 24 horas. Não foram observadas variações significativas na frequência de células CD4⁺IL-17⁺.

A análise da população de células T_H17 nos pacientes multibacilares após o segundo mês de tratamento mostrou significante expansão ($p<0.05$) frente aos dois estímulos com PHA e BCG (gráficos 12 e 13). No entanto quanto aos paucibacilares observou-se que não houve diferença significativa nesta população após o início do tratamento, frente aos dois estímulos. (gráficos 14 e 15).

Gráfico 12 - Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes multibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA

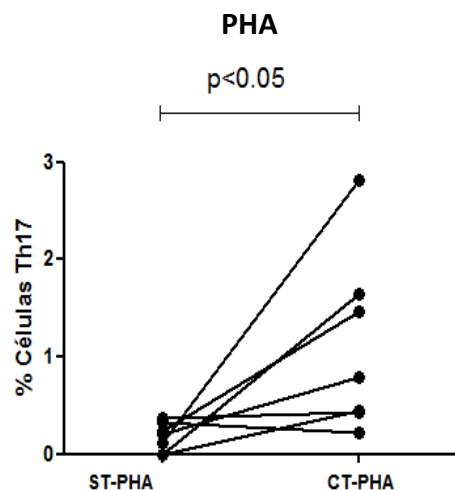
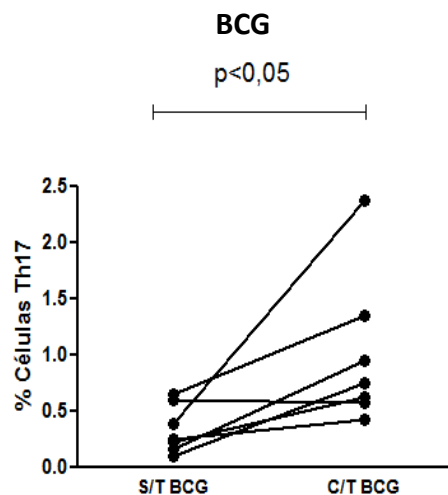


Gráfico 13 - Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes multibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com BCG.



Notas: Células de sangue periférico de pacientes multibacilares (MB), antes e após o início do tratamento poliquimioterápico foram estimuladas com PHA (10 μ g/ml) e BCG (1 μ g/ml) por 24 horas. Células T_H17 de pacientes MB tratados e estimulados com BCG ou PHA tiveram níveis significativamente maiores de células T_H17 que antes do tratamento ($p < 0,05$).

Gráfico 14 - Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA.

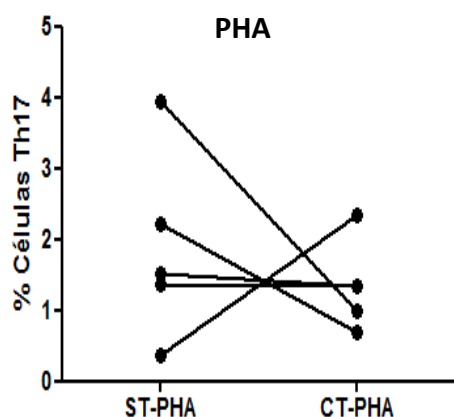
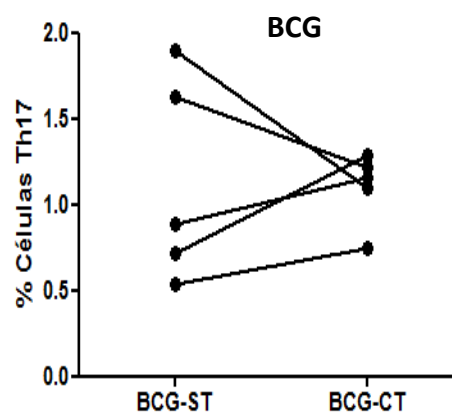


Gráfico 15 - Comparativo de frequência de células T_H17 em pacientes paucibacilares antes e ao segundo mês de tratamento poliquimioterápico estimulados com BCG.



Notas: Células de sangue periférico de pacientes paucibacilares (PB) foram estimuladas com PHA (10 μ g/ml) e com BCG (1 μ g/ml) antes do tratamento (ST-PHA e BCG-ST) e após o segundo mês de tratamento poliquimioterápico (CT-PHA e BCG-CT) por 24 horas. Não foi observada diferença estatística significativa na frequência de células T_H17 .

8. DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente nervos periféricos e pele. A doença pode prover um atrativo e importante modelo no estudo do comportamento dos subtipos de populações de células T. A patogênese e os aspectos clínicos da doença estão correlacionados com o tipo de resposta imune mediada por célula expressa pelo paciente. Até o presente momento, é descrito que pacientes com uma forte resposta imune celular do tipo T_H1 , relativamente resistentes à infecção apresentam-se com lesões limitadas entre uma e cinco lesões localizadas, de aspectos variados, desde hipopigmentadas e tricotitóides até de aparência bizarra, sendo todas elas com alterações significativas de sensibilidade, e são classificados como paucibacilares. Por outro lado, pacientes com deficiente resposta imune celular e preponderante resposta humoral do tipo T_H2 , apresentam doença disseminada, caracterizada por grande número de bacilos e lesões de aspectos variados como placas, tubérculos, nódulos e infiltrações, sendo classificados como multibacilares. A participação das células T_H17 na hanseníase ainda não está definida.

A importância do IFN- γ produzido pelas células $CD4^+$ na resposta primária ao *M. leprae* está bem estabelecida. Em 1983, Carl Nathan demonstrou a possibilidade de uso desta citocina em seres humanos, utilizando em pacientes portadores de hanseníase. A injeção de IFN- γ recombinante diretamente em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase virchowiana induziu à infiltração macrofágica, produção de peróxido de hidrogênio e levou a uma redução do *Mycobacterium Leprae* nas lesões. (NATHAN, KAPLAN, LEVIS et al., 1983).

Outros trabalhos semelhantes foram realizados, destacando-se um estudo onde foram testados pacientes virchowianos polares e pacientes dimorfos, submetidos a múltiplas injeções intradérmicas de 10 μ g de IFN- γ , demonstrando uma redução no índice baciloscópico nas lesões em 14 pacientes, além da manutenção da resposta inflamatória granulomatosa 21 dias depois. (KAPLAN, MATHUR, JOB et al., 1989).

Esta citocina entre outras funções induz macrófagos a produzirem TNF- α , incrementando a ativação destas mesmas células (MURRAY, SPITALNY, NATHAN et. al., 1985).

Os níveis de TNF- α em relação aos dois polos espectrais da hanseníase demonstram que esta citocina encontra-se mais presente em soro de doentes com formas tuberculóides e é menos frequente no soro de virchowianos, exceto quando estes pacientes desenvolvem reação hansênica do tipo 2 indicando que a destruição do bacilo e formação do granuloma está relacionada à presença desta citocina. (MOUBASHER, KAMEL, ZEDAN et. al., 1998) ().

Finalmente, IFN- γ ativa mecanismos antimicrobianos nos macrófagos, ao induzir óxido nítrico sintase, levando à produção de óxido nítrico (NO), um importante microbicida. O TNF- α é necessário para a formação do granuloma e desempenha um papel essencial na contenção e prevenção da disseminação da doença. (MADAN, AGARWAL, CHANDER, 2011).

No presente estudo observou-se uma frequência significativamente maior de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ em pacientes paucibacilares em comparação com os multibacilares tanto estimulados com PHA quanto com o BCG, resultado que está em concordância com a temática na literatura disponível.

Em revisão bibliográfica, não foram encontradas publicações que avaliem o possível papel da interleucina 17 na hanseníase. A literatura reporta apenas um trabalho que observa que não há diferença na produção de IL-17 entre indivíduos com forma reacional ou não reacional. (STEFANI, GUERRA, SOUSA et al., 2009).

Neste estudo os autores se propunham identificar marcadores para as duas formas da doença.

Os resultados demonstraram pela primeira vez, que pacientes paucibacilares tiveram uma frequência significativamente maior de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 tanto estimulados com PHA como com BCG, fato que sugere fortemente que esta citocina provavelmente se adéqua a um perfil de imunoproteção.

Oliveira e colaboradores (1999) isolaram neutrófilos de pacientes com episódio de inflamação reacional.

Os neutrófilos são comuns em lesões de pacientes reacionais, bem como no período do tratamento poliquimioterápico. Os neutrófilos podem atuar não apenas na fagocitose, mas também na produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-8. Os autores mostraram que neutrófilos de pacientes reacionais tipo 2 secretam TNF- α e IL-8, sugerindo que estas células podem também participar da regulação da resposta imune na hanseníase contribuindo com a amplificação da produção do TNF- α que em grande parte é produzido por fagócitos mononucleares. (OLIVEIRA, MARTELLI, SCOLLARD, 2009).

A IL-17 pode afetar tanto a homeostasia quanto a sobrevivência dos neutrófilos. Na infecção com *Mycobacterium tuberculosis* quando a IL-17 é neutralizada, ocorre diminuição de neutrófilos. (DRAGON, SAFFAR, SHAN et. al., 2007; ZELANTE, DE LUCA A, BONIFAZI et al., 2007).

Sendo a IL-17 na hanseníase predominante nos pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares, é possível que a proteção conferida pela IL-17 possa estar relacionada com o

recrutamento e sobrevivência dos neutrófilos na fase inicial da lesão levando ao controle da carga bacilar e da organização do granuloma.

Outro mecanismo protetor de IL-17 foi encontrado na infecção pela *Francisella tularensis*, o agente causador da tularemia. Os autores demonstraram que T_H17 dependente de IL-23 induzem a secreção de IL-12 por células dendríticas, aumentando a resposta T_H1 . Esta resposta depende diretamente da sinalização de IL-17, levando a uma maior produção de IFN- γ e mediando a morte da bactéria. (LIN, RITCHEA, LOGAR, 2009).

Também se evidenciou uma correlação positiva entre IFN- γ e IL-17 tanto nos pacientes paucibacilares quanto nos multibacilares. Este fato é sugestivo que, de uma maneira semelhante, na infecção pelo *M. leprae*, os linfócitos T_H17 também incrementem a resposta T_H1 , pois quando se selecionou a população específica de células T_H17 foi observada novamente a maior frequência destas nos pacientes paucibacilares. Estes dados são inéditos e sugerem fortemente que esta população deve estar relacionada com uma atividade protetora no início da infecção, direcionando a resposta imunológica para um padrão de predominante imunidade celular. Desta forma, pacientes que conseguem induzir maior ativação destas células no primeiro contato com o *M. leprae* tem um maior controle da carga bacilar e maior capacidade de contenção da doença.

Torrado e Cooper (2010), demonstraram que durante a tuberculose primária, são expressos tanto IFN- γ quanto IL-17, sendo ambas potentes citocinas inflamatórias capazes de induzir a expressão de quimiocinas que, por sua vez promovem recrutamento de células e organização do granuloma durante a infecção. No entanto durante a fase crônica da infecção, um balanço entre T_H1 e T_H17 é necessário para que haja o controle do crescimento bacteriológico e sua respectiva imunopatologia. Desta forma, excessiva produção de IL-17 poderia levar a um maior recrutamento de neutrófilos e consequentemente maior dano tecidual.

Como é relativamente recente a identificação das células T_H17 , a sua função ainda é controversa. Dados recentes têm demonstrado uma complexa atuação desta população e suas citocinas nas diferentes infecções por bactérias intracelulares, fungos, vírus e parasitos. Estas células têm sido implicadas como fortes indutoras de inflamação e dano tecidual em modelos de doenças autoimune e infecção. Os estudos vêm demonstrando que a linhagem de células T_H17 produz citocinas que pode mediar respostas boas ou maléficas para o paciente. Desta forma o balanço entre T_H17 mediando proteção e patologia é uma importante questão na definição de seu papel no controle da infecção.

Outro dado importante foi a correlação positiva observada entre a IL-17 e IFN- γ . A avaliação desta correlação permite compreender melhor a associação entre as citocinas. Este

resultado sugere que estas duas citocinas podem atuar sinergicamente no controle da infecção e atenuação da lesão. Portanto, nos pacientes paucibacilares o aumento da expressão de IL-17 é acompanhado pelo aumento de IFN- γ e este deve ser um fator primordial no controle índice bacilar. Como descrito anteriormente, em modelo com *F. tularensis*, foi observado que a IL-17 pode induzir maior produção de IFN- γ .

Cruz e colaboradores (2006) sugeriram que a inoculação de BCG leva a indução de TGF- β e IL-6, levando conseqüentemente a maior expressão de IL-23R nas células T ativadas. No entanto a adição de IFN- γ ou expansão de células produtoras de IFN- γ levaria a um aumento de IL-12R, limitando a disponibilidade de células T a IL-23, desta forma limitando a expansão de células produtoras de IL-17. Especificamente, o aumento da indução de IFN- γ pelo patógeno pode limitar a produção e o acúmulo de células produtoras de IL-17, diminuindo o possível dano tecidual mediado pela resposta imune. (CRUZ, KHADER, TORRADO et al., 2006).

Em 2010, Cruz estimulou repetidamente com o BCG, camundongos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* e concluiu que o número de células produtoras de IFN- γ não era afetado. No entanto a repetida estimulação antigênica, fez com que a IL-17 se tornasse refratária à regulação pelo IFN- γ previamente sugerida, resultando em um aumento significativo no número de células produtoras de IL-17 nos tecidos. Para estes autores a expressão elevada de células T_H17 seria responsável pelo maior dano tecidual. Desta forma, os esquemas de vacinação devem ser cuidadosos para que não haja exacerbação desta resposta sem o controle de IFN- γ . (CRUZ, FRAGA, FOUNTAIN et al., 2010).

Khader e colaboradores (2007) demonstraram que a depleção de IL-17 durante a infecção com o *M. tuberculosis* reduziu a expressão de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 e causou diminuição na expressão e acúmulo de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Desta forma, estes autores sugerem que a produção inicial de IL-17 é importante no controle da infecção, e a produção das quimiocinas seria crucial no recrutamento de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ que controlariam a infecção e o dano tecidual. (KHADER, BELL, PEARL et al., 2007).

A literatura reporta também, a importância da IL-17 na formação do granuloma em pulmão de camundongos infectados com o BCG. Neste estudo, camundongos deficientes em IL-17 foram incapazes de desenvolver granulomas maduros favorecendo a disseminação da infecção. (OKAMOTO YOSHIDA, UMEMURA, YAHAGI et al., 2010).

Na hanseníase, está bem estabelecido que a pobre formação de granulomas e a conseqüente evolução para as formas multibacilares é um dos achados histopatológicos

característicos destas formas de apresentações clínicas da hanseníase. (ELDER, ELENITSAS, JOHNSON et al., 2005).

Portanto, diante deste modelo frente aos resultados e os confrontando com a literatura, passa-se a crer que as produções de IL-17 e IFN- γ seriam cruciais para o controle bacilar. O aumento na expressão de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ impediria a exacerbação da produção de IL-17 e consequente aumento de dano tecidual. Sob este aspecto deduz-se que este é um dos fatores que levam aos pacientes paucibacilares apresentarem uma resposta imune equilibrada, e consequentemente uma carga bacilar menor e lesões mais controladas.

No entanto, nos pacientes paucibacilares, com níveis elevados de IFN- γ e também com níveis elevados de IL-17, este mecanismo de regulação entre estas duas citocinas na hanseníase necessita ser mais bem compreendido.

Se este padrão de comportamento imunológico em relação à regulação de IFN- γ e IL-17 observado na tuberculose puder ser demonstrado na hanseníase, alterações neste mecanismo regulador poderão ser desastrosas, principalmente se houver envolvimento neurológico associado. Talvez este desequilíbrio, que envolve também outras citocinas como a IL-23, contribua para a ocorrência dos estados reacionais, sobretudo a reação tipo 1.

Estes achados semelhantes tanto na tuberculose e agora na hanseníase reforçam a hipótese que o comportamento dos níveis de IL-17 pode vir a ser um importante biomarcador associado com inflamações granulomatosas crônicas causadas por micobactérias.

A partir dos resultados que mostraram diferenças entre os indivíduos paucibacilares e multibacilares quanto à expressão de CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-17⁺ e CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻, a próxima questão foi verificar como se comportavam estes pacientes após o início do tratamento poliquimioterápico.

Ao segundo mês de início do tratamento poliquimioterápico quando foram efetuadas novas análises, o comportamento destas populações celulares e das citocinas foram bastante distintos na individualização dos grupos multibacilares e paucibacilares. Os pacientes multibacilares apresentaram um aumento significativo na expressão de células T_H17 e na frequência de células CD4⁺IFN- γ ⁺, assim como também houve uma significativa expansão do percentual de linfócitos CD4⁺IL-17⁺. Os pacientes paucibacilares mantiveram os níveis de produção. O resultado mostra que o tratamento poliquimioterápico modificou o perfil de resposta principalmente dos pacientes multibacilares, que aumentaram significativamente a expressão dos perfis T_H1 e T_H17. Este dado reforça fortemente a hipótese de que a população T_H17 tem um papel crucial na resposta protetora contra o *Mycobacterium leprae*.

Está repetidamente demonstrado que os macrófagos em pacientes multibacilares não são capazes de eliminar o *Mycobacterium Leprae* eficientemente das lesões. Microorganismos mortos e seus fragmentos persistem até mesmo por longos períodos após a conclusão do tratamento poliquimioterápico. Este fato, sobretudo nas formas multibacilares da doença funciona como estímulo antigênico constante e leva a uma desregulação imune, que, por sua vez representa a justificativa da manutenção de estados reacionais do tipo 2 por longos períodos naqueles pacientes que os desenvolvem. (JOB, JAYAKUMAR, KEARNEY et al., 2008).

Por outro lado, nem todos os pacientes multibacilares são acometidos pela reação tipo 2. Estaria a população de células T_H17 envolvida no processo desta ocorrência?

Mais estudos são necessários para se estabelecer e mensurar outras citocinas subprodutos da população celular T_H17 e as suas relações de sinalização moleculares estabelecidas entre o sistema imunológico dos indivíduos acometidos pela hanseníase.

De importância fundamental, será reproduzir este estudo nos pacientes reacionais, com a perspectiva de correlacionar a destruição tecidual ao balanço entre a produção de IFN- γ e IL-17 no caso das reações do tipo 1, ou de verificar se existe algum tipo de participação da IL-17 e das células T_H17 na gênese e/ou manutenção dos estados reacionais do tipo 2.

A reprodução também nos casos de recidiva da doença ou de falha terapêutica, mesmo sendo ocorrências raras também poderá contribuir na diferenciação entre tratamento insuficiente, falência terapêutica por deficiência imunológica e resistência medicamentosa.

9. CONCLUSÕES

- Os pacientes paucibacilares apresentam uma significativa expressão de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-17 em comparação com os pacientes multibacilares, corroborando a função protetora do IFN- γ e sugerindo também mecanismo protetor para a IL-17.
- Existe uma correlação positiva entre a produção das citocinas IL-17 e IFN- γ ou seja, ambas aumentam tanto nos pacientes paucibacilares quanto nos pacientes multibacilares, sugerindo que existe um nível de regulação destas citocinas que necessita ser melhor compreendido.
- Os pacientes paucibacilares expressaram níveis significativos de células não somente com perfil T_H1 como também com perfil T_H17 em comparação com os multibacilares,

sugerindo que esta população também tem um importante controle imunológico na evolução da hanseníase.

- O tratamento poliquimioterápico não levou a alterações significativas nos pacientes paucibacilares, que já apresentavam um perfil imunológico T_H1/T_H17 .
- O tratamento poliquimioterápico levou a um aumento de expressão das células T_H17 , bem como da produção de IL-17 nos pacientes multibacilares, após início do tratamento, o que sugere que esta população, em conjunto com a ação da poliquimioterapia, está envolvida na atividade bactericida.

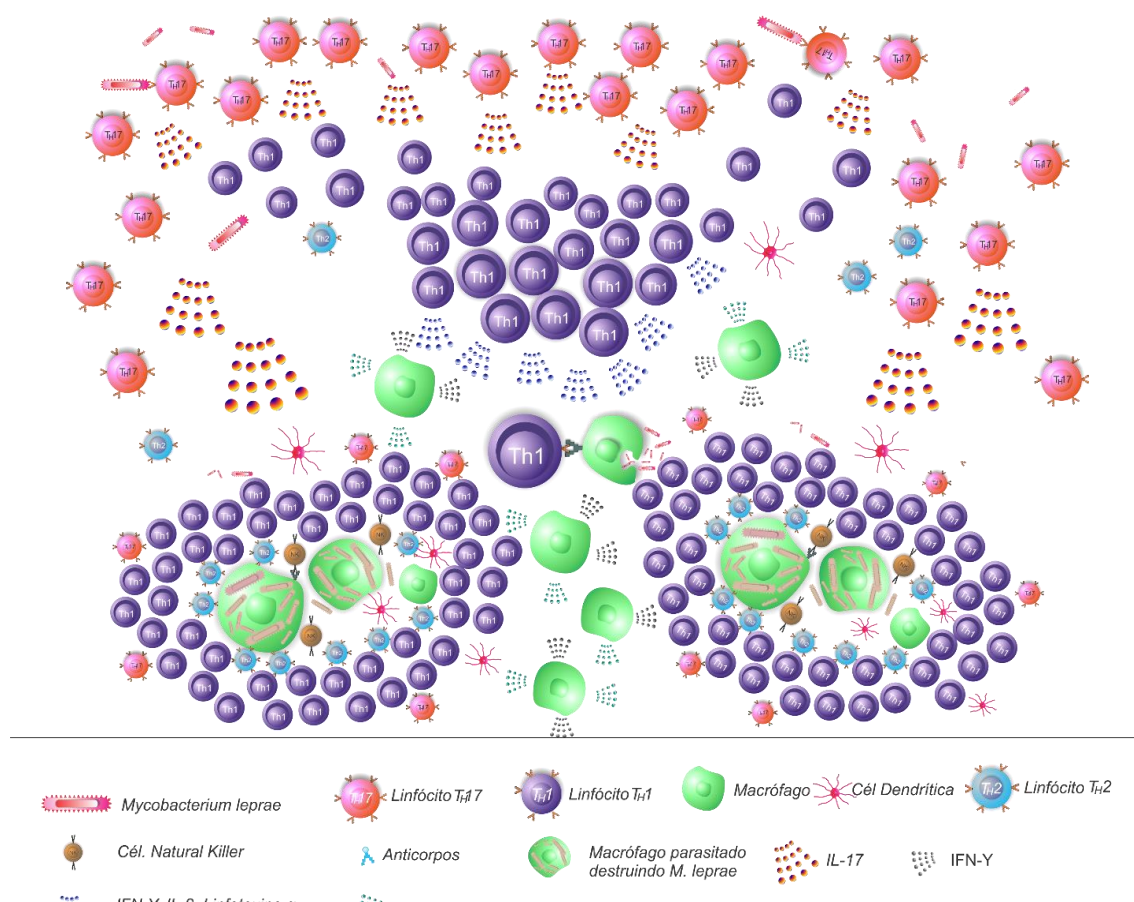
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

9.1 Novo modelo proposto para a elaboração da resposta imune da hanseníase em pacientes paucibacilares.

Os resultados permitiram comprovar as hipóteses 0 II e IV e refutar as hipóteses I, III e V. Os objetivos gerais e específicos foram atingidos de acordo com a metodologia empregada. A bibliografia consultada permitiu compreender os resultados obtidos, a despeito da nova temática abordada e dos resultados discutidos por comparação.

Mais um capítulo à intrincada resposta imunológica da hanseníase foi adicionado, demonstrando que ainda há um longo caminho a ser percorrido para a sua compreensão. Fundamentando-se nos resultados encontrados, propõe-se o modelo ilustrado a seguir (fig. 24) para a elaboração da resposta imune da hanseníase para os pacientes paucibacilares:

Figura 24 – Novo Modelo Proposto para a elaboração da resposta imune na hanseníase em pacientes paucibacilares



Notas: A sinalização de IL-17 através das células Th17 direciona a resposta imunológica para o conhecido padrão Th1 da doença, contribuindo para a formação e a manutenção dos granulomas e permitindo desta maneira a contenção da doença e a sua expressão clínica em suas formas paucibacilares.

REFERÊNCIAS

1. ANDERSON R.; ZEIS B.M.; ANDERSON I.F. Clofazimine-mediated enhancement of reactive oxidant production by human phagocytes as a possible therapeutic mechanism. **Dermatologica**. n.176, v.5, p.234-242, 1988.
2. ANDRADE, V. Implementação da PQT/OMS no Brasil / Implementation of multidrug therapy against leprosy in Brazil. **Hansen. Int.** v.31, n.1, p.23-31, 2006.
3. ANTUNES S.L.; CHIMELLI L.; JARDIM M.R.; VITAL R.T.; NERY J.A.; CORTE-REAL S.; HACKER M.A.; SARNO E.N. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. n.107, v.2, p.243-253, 2012.
4. ARTHUS, M. Injections répétées de serum de cheval chez la lapin. **Compt. rend. soc. Biol.** vol.55, p.817, 1903.
5. BELAUBE P.; DEVAUX J.; PIZZI M.; BOUTBOUL R.; PRIVAT Y. Small Bowel deposition of crystals associated with the use of clofazimine in the treatment of prurigo nodularis. **Int J Lepr other Mycobact Dis**. n.51, v.3, p.328-330, 1983.
6. BELGAUMKAR V.A.; GOKHALE N.R.; MAHAJAN P.M. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Lepr Rev**. n.78, p.223- 230, 2007.
7. BETTELLI E.; KORN T.; KUCHROO V.K. T_H17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr Opin Immunol**. v.19, n.6, p.652-657, 2007.
8. BIER, Otto – **Microbiologia e Imunologia**; 30^a, 29^a, 28^a 27^a 26^a e 25^a ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990.
9. BI Y.; LIU G.; YANG R. T_H17 Cell induction and immune regulatory effects. **J Cell Physiol**. v.211, n. 2, p. 273-278, 2007.

10. BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia Para o Controle da Hanseníase**. Brasília, DF, 2002. 89p.
11. _____. Secretaria de Políticas de Saúde. **Portaria nº 3.125**, de 7 de outubro de 2010.
12. _____. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Sinan Net**, 2010. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>.
13. BRIGHTBILL H.D.; LIBRATY D.H.; KRUTZIK S.R.; YANG R.B.; BELISLE J.T.; BLEHARSKI J.R.; MAITLAND M.; NORGARD M.V.; PLEVY S.E.; SMALE S.T.; BRENNAN P.J.; BLOOM B.R.; GODOWSKI P.J.; MODLIN R.L. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**. n. 285, v.5428, p732–736, 1999.
14. BÜHRER-SÉKULA S.; SMITS H.L.; GUSSENHOVEN G.C.; VAN LEEUWEN J.; AMADOR S.; FUJIWARA T.; KLATSER P.R.; OSKAM L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**. v.41, n.5, p.1991-1995, 2003.
15. BURMAN W.J.; GALLICANO K.; PELOQUIN C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. **Clin Pharmacokinet**. n.40 v.5, p. 327-341, 2001.
16. CAVER C.V. Clofazimine-induced ichthyosis and its treatment. **Cutis**. n.29, v.4, p. 341-343, 1982.
17. COLEMAN. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **Br J Dermatol**. v.129, n.5, p.507-513, 1993.
18. CRUZ A.; FRAGA A.G.; FOUNTAIN J.J.; RANGEL-MORENO J.; TORRADO E.; SARAIVA M.; PEREIRA D.R.; RANDALL T.D.; PEDROSA J.; COOPER A.M.; CASTRO A.G. Pathological role of interleukin-17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med**. v.207, n.8, p.1609-1616, 2010.

19. CRUZ A.; KHADER S.A.; TORRADO E.; FRAGA A.; PEARL J.E.; PEDROSA J.; COOPER A.M.; CASTRO A.G. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. **J Immunol.** v. 177, n.3, p.1416-1420, 2006.
20. CUEVAS J.; RODRÍGUEZ-PERALTO J.L.; CARRILLO R.; CONTRERAS F. Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. **Semin Cutan Med Surg.** v.26, n.2, p.126-130, 2007.
21. DA SILVA R.C.; LYON S.; LYON A.C.; GROSSI M.A.; LYON S.H.; BÜHRER-SÉKULA S.; ANTUNES C.M. Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.104, n.8, p. 546-550, 2010.
22. DEMANGEL C.; BRITTON W.J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunol Cell Biol.** v.78, n.4, p.318-24, 2000.
23. DHANAPPAUL S. DDS-induced photosensitivity with reference to six case reports. **Leprosy Rev.** n.60, v.2, p.147-150, 1989.
24. DRAGON S.; SAFFAR A.; SHAN L.; GOUNNI A. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. **Mol Immunol.** n.45, p.160-168, 2007.
25. ESCAMILLA-TILCH M, TORRES-CARRILLO NM, PAYAN RR, AGUILAR-MEDINA M et al. Association of genetic polymorphism of HLA-DRB1 antigens with the susceptibility to lepromatous leprosy. **Biomed Rep.** n.6, p.945-949, 2012.
26. ELDER D.E.; ELENITSAS R.; JOHNSON B.L. JR; MURPHY G.F. **Lever's Histopathology of the Skin.** 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2005. p.559-577.
27. FRANCESCHI DS1, MAZINI PS, RUDNICK CC, et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. **Tissue Antigens.** n.72, v.5, p.478-482, 2008.

28. FONT R.L.; SOBOL W.; MATOBA A. Polychromatic corneal and conjunctival crystals secondary to clofazimine therapy in a leper. **Ophthalmology**. n.93, v.3, p. 311-315, 1989.
29. GORODEZKY C, FLORES J, AREVALO N, CASTRO LE, SILVA A, RODRIGUEZ O. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. **Lepr Rev**.n.58, p.401–406,1987
30. KAPLAN G.; MATHUR N.K.; JOB C.K.; NATH I.; COHN Z.A. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of Mycobacterium leprae. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.86, n.20, p.8073-8077, 1989.
31. MASTRANGELO G.; MARCER G.; CEGOLON L.; BUJA A.; FADDA E.; SCOIZZATO L.; PAVANELLO S. How to prevent immunological reactions in leprosy patients and interrupt transmission of Mycobacterium leprae to healthy subjects: Two hypotheses. **Medical Hypotheses**, v.71, n.4, p.551-563, 2008.
32. GANGADHARAM P.R.; PERUMAL V.K.; JAIRAM B.T.; RAO P.N.; NGUYEN A.K.; FARHI D.C.; ISEMAN M.D. Activity of rifabutin alone or in combination with clofazimine or ethambutol or both against acute and chronic experimental Mycobacterium intracellulare infections. **Am Rev Respir Dis**. n.136, v.2, p.329-333, 1987.
33. GARRELTS J.C. Clofazimine: a review of its use in leprosy and mycobacterium avium complex infection. **DICP**. n.25, v.5, p.525-531, 1991.
34. GETZ B. Leprosy research in Norway, 1850–1900. **Med Hist**. v.2, n.1, p.65-66, 1958.
35. GIRLING D.J. Adverse reactions to rifampicin in antituberculosis regimens. **J Antimicrob Chemother**. n.13, v.2 p.115-135, 1977.
36. GOULART I.M.; PENNA G.O.; CUNHA G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.35, n.4, p.363-375, 2002.
37. GOULART I.M.; BERNARDES SOUZA D.O.; MARQUES C.R.; PIMENTA V.L.; GONÇALVES M.A.; GOULART L.R. Risk and protective factors for leprosy development

- determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol.** n.15, v.1, p.101-105, 2008.
38. GROSSET J.; LEVENTIS S. Adverse effects of rifampin. **Rev Infect Dis.** n.5, v.3, p. 440-450, 1983.
 39. HARRINGTON L.E.; HATTON R.D.; MANGAN P.R.; TURNER H.; MURPHY T.L.; MURPHY K.M.; WEAVER C.T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol.** v.6, n.11, p. 1123-1132, 2005.
 40. HIRAN S.; PANDE T.K.; RIZVI S.A.; VISHWANATHAN K.A. Dapsone syndrome. **J Assoc Physicians India,** v.42, n.6, p.497, 1994.
 41. HOFFBRAND B.I. Dapsone and renal papillary necrosis. **Br Med J.** v.1, n.6105, p.78, 1978.
 42. HUNTER S.W.; GAYLORD H.; BRENNAN P.J. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. **J Biol Chem.** v.261, n.26, p.12345-12351, 1986.
 43. IVANOV II; ZHOU L.; LITTMAN D.R. Transcriptional regulation of T_H17 cell differentiation. **Semin Immunol.** v.19, n.6, p.409-417, 2007.
 44. JOB C.K.; JAYAKUMAR J.; KEARNEY M.; GILLIS T.P. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am J Trop Med Hyg.** n.78, v.3, p.518-521, 2008.
 45. KHADER S.A.; BELL G.K.; PEARL J.E.; FOUNTAIN J.J.; RANGEL-MORENO J.; CILLEY G.E.; SHEN F.; EATON S.M.; GAFFEN S.L.; SWAIN S.L.; LOCKSLEY R.M.; HAYNES L.; RANDALL T.D.; COOPER A.M. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nat Immunol.** v.8, n.4, p.368-377, 2007.

46. KHADER S.A.; PEARL J.E.; SAKAMOTO K.; GILMARTIN L.; BELL G.K.; JELLEY-GIBBS D.M.; GHILARDI N.; DE SAUVAGE F.; COOPER A.M. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. **J Immunol.** v.175, n.2 p.788-795, 2005.

47. KRUTZIK S.R.; TAN B.; LI H.; OCHOA M.T.; LIU P.T.; SHARFSTEIN S.E.; GRAEBER T.G.; SIELING P.A.; LIU Y.J.; REA T.H.; BLOOM B.R.; MODLIN R.L. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med.** v.11, n.6, p.653-660, 2005.

48. KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, ASTER JC. Diseases of Immunity. in: ROBBINS; COTRAN. **Pathologic Basis of Disease.** 8th, Philadelphia: Ed. Saunders-Elsevier, 2010; p.721-731.

49. LAKSHMINARAYAN S.; SAHN S.A.; HUDSON L.D. Massive haemolysis caused by rifampicin. **Brit Med J.** n.5, v.5861, p.282-283, 1973.

50. LEVINE M.; COLLIN K.; KASSEN B.O. Acute hemolysis and renal failure following discontinuous use of rifampin. **DICP.** n.25, v.7-8, p.743-744, 1991.

51. LIN Y.; RITCHEA S.; LOGAR A.; SLIGHT S.; MESSMER M.; RANGEL-MORENO J.; GUGLANI L.; ALCORN J.F.; STRAWBRIDGE H.; PARK S.M.; ONISHI R.; NYUGEN N.; WALTER M.J.; POCIASK D.; RANDALL T.D.; GAFFEN S.L.; IWAKURA Y.; KOLLS J.K.; KHADER S.A. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. **Immunity.** v.31, n.5, p. 799-810, 2009.

52. LUNA AZULAY-ABULAFIA, LETICIA SPINELLI, BERNARD KAK. Lucio' phenomenon: a favorable outcome with multidrug therapy **J Am Acad Dermatol.**, v.50, n.3, Sup1, 2004.

53. MACKEY J.P.; BARNES J. Clofazimine in the treatment of discoid lupus erythematosus. **Br J Dermatol.**, n.91, v.1, p.93-96, 1974.

54. MADAN N.K.; AGARWAL K.; CHANDER R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Lepr Rev.** n.82, v.4, p. 371-382, 2011.
55. MANFREDI G.; DE PANFILIS G.; ZAMPETTI M.; ALLEGRA F. Studies on dapsone induced haemolytic anaemia. I. Methaemoglobin production and G-6-PD activity in correlation with dapsone dosage. **Br J Dermatol.**, v.100, n.4, p.427-432, 1979.
56. GRUNWALD M.H.; AMICHAÏ B. Dapsone - the treatment of infectious and inflammatory diseases in dermatology. **Int J Antimicrob Agents.**, v.7, n.3, p.187-192, 1996.
57. MCDOUGALL A.C.; HORSFALL W.R.; HEDE J.E.; CHAPLIN A.J. Splenic infarction and tissue accumulation of crystals associated with the use of clofazimine (Lamprene; B663) in the treatment of pyoderma gangrenosum. **Br J Dermatol.** n.102, v.2, p.227-230, 1980.
58. MEMÓRIA ASSOCIATION INTERNATIONAL DE LA LEPRO. IN: **Congresso Internacional de Leprologia 6.** MADRID, 1953; p.1344.
59. MEHRA V.; MODLIN R.L. T-lymphocytes in leprosy lesions. **Curr Top Microbiol Immunol.** n.155, p.97-109, 1990.
60. MEYERSON M.A.; COHEN P.R. Dapsone-induced aplastic anemia in a woman with bullous systemic lupus erythematosus. **Mayo Clin Proc.** v.69, n.12, p.1159-1162, 1994.
61. MODLIN R.L. T_H1-T_H2 paradigm: insights from leprosy **J. Invest. Dermatol.** v.102, n.6, p.828-832, 1994.
62. MODLIN R.L. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol.** v.22, n.1, p.48-54, 2010.
63. MODLIN R.L.; HOFMAN F.M.; TAYLOR C.R.; REA T.H. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. **J Am Acad Dermatol.** n.8, v.2, p.182-189, 1983.

64. MOUBASHER A.D.; KAMEL N.A.; ZEDAN H.; RAHEEM D.D. Cytokines in leprosy I. **Int J Dermatol.** n.37, v.10, p.733-740, 1998.
65. MURRAY H.W.; SPITALNY G.L.; NATHAN C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. **J Immunol.** v.134 n.3, p.1619-1622, 1985.
66. NATHAN C.F. KAPLAN G. LEVIS W.R.; NUSRAT A.; WITMER M.D.; SHERWIN S.A.; JOB C.K.; HOROWITZ C.R.; STEINMAN R.M.; COHN Z.A. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. **N Engl J Med.** v.315, n.1, p.6-15, 1983.
67. NAUSEEF W.M. Myeloperoxidase deficiency. **Hematol Pathol.** n.4, v.4, p.165-178, 1990.
68. NOGUEIRA, M.E.S. Eritema nodoso hansênico: análise comparativa do quadro histopatológico pelas técnicas de rotina e imunofluorescência. **Hansen. Int.** v.20 n.1, p.11-18, 1995.
69. NOORDEEN, S.K. Leprosy 1962-1992. Epidemiology and control of leprosy- a review of progress over the last 30 years. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.87, n.5, p.515-517, 1993.
70. OKAMOTO YOSHIDA Y.; UMEMURA M.; YAHAGI A.; O'BRIEN R.L.; IKUTA K.; KISHIHARA K.; HARA H.; NAKAE S.; IWAKURA Y.; MATSUZAKI G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. **J Immunol.** v.154, n.8, p. 4414-4422, 2010.
71. PANNIKAR V.K.; ARUNTHATHI S.; CHACKO C.J.; FRITSCHI E.P. A clinico-pathological study of primary neuritic leprosy. **Lepr India.** v.55. n.2. p.212-221, 1983.
72. PAVITHRAN K. Exfoliative dermatitis after clofazimine. **Int J lepr.**, n.53, v.4, p.645-646, 1985.
73. MIOSSEC P.; KORN T.; KUCHROO V.K. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. **N Engl J Med.** v.361 n.9, 2009.

74. RAVI S.; HOLUBKA J.; VENERI R.; YOUN K.; KHATIB R. Clofazimine-induced eosinophilic gastroenteritis in AIDS. **Am J Gastroenterol.**, n.88, v.4, p.612-613, 1993.
75. REES R.J.H.; PEARSON J.M.; WATERS M.F. Experimental and clinical studies on rifampicin in treatment of leprosy. **Br Med J.** n.1, v.5688, p.89-92, 1970.
76. REES RJH. Recent Bacteriologic, Immunologic and Pathologic Studies on the experimental human leprosy in the mouse foot pad. **Int. J Leprosy**, v.33 n.3, p.646–657, 1965.
77. REVUZ J.; HORNAC P. Side effects of treatment with sulphones. **Lanc Med.** v.1, n.3, p. 68-70, 1981.
78. RIDLEY D.S.; JOPLING W.H. Classification of leprosy according to immunity- a five group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** n.34, v.3, p.255-273, 1966.
79. RIDLEY D.S.; RADIA K.B. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** n.49, v.4, p.383-392, 1981.
80. SARNO E.N.; GRAU G.E.; VIEIRA L.M.M.; NERY J.A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. **Clin Exp Immunol.** n.84 v.1, p.103-108, 1991.
81. SCOLLARD D.M.; ADAMS L.B.; GILLIS T.P.; KRAHENBUHL J.L.; TRUMAN R.W.; WILLIAMS D.L. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev.** n.19, v.2, p.338-381, 2006.
82. SENSI P.; BALLOTTA R.; GRECO M. Rifomycin V, Rifomycin O. A new antibiotic of the rifomycin family. **Farmaco Sci.** n.15, p. 228-234, 1960.
83. SENSI P.; GRECO A.M.; BALLOTTA R. Rifomycin I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. **Antibiot Annu.** n.7, p.262-270, 1959-1960.
84. SOUZA A.R. Fenômeno de Sanarelli-Schwartzmann – a propósito da Lepra de Lúcio. **Rev. Bras. Leprol.** n.19, p.161-165, 1951.

85. SIELING P.A.; JULLIEN D.; DAHLEM M.; TEDDER T.F.; REA T.H.; MODLIN R.L.; PORCELLI S.A. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. **J Immunol.**, v.162, n.3, p.1851-1858, 1999.
86. SIELING P.A.; ABRAMS J.S.; YAMAMURA M.; SALGAME P.; BLOOM B.R.; REA T.H.; MODLIN R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection: In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J Immunol.** v.150, n.12, p.5501-5510.
87. STEFANI M.M.; GUERRA J.G.; SOUSA A.L.; COSTA M.B.; OLIVEIRA M.L.; MARTELLI C.T.; SCOLLARD D.M. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infect Dis.** n.9, p.75, 2009.
88. STOCKINGER B.; VELDHOFEN M. Differentiation and function of T_H17 T cells. **Curr Opin Immunol.** v.19, n.3, p.281-286, 2007.
89. SUGITA Y. Leprosy. **Clinics in Dermatology** v.13, n.3, p.235-243, 1995.
90. TALHARI S.; NEVES R.G. **Hanseníase**. 3ª ed. Manaus, Ed. Lorena, 1997.
91. TODD P.; SAMARATUNGA I.R.; PEMBROKE A. Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prior to dapsone therapy. **Clin Exp Dermatol.** v.19 n.3, p.217-218, 1994.
92. TORRADO E.; COOPER A.M. IL-17 and T_H17 cells in tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.21, n.6, p.455-462, 2010.
93. TOSH K; RAVIKUMAR M; BELL JT. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. **Hum Mol Genet.** n15, v19, p. 2880-2887, 2006.
94. TUFANO M.A.; CIPOLLARO DE L'ERO G.; IANNIELLO R.; BARONI A.; GALDIERO F. Antimicrobial agents induce monocytes to release IL-1 alpha, IL-6, and TNF, and induce lymphocytes to release IL-4 and TNF tau. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, n.14, v.4, p.769-782, 1992.

95. URA S. Tratamento e controle das reações hansênicas. **Hansen Int.** v.32, n.1, p.67-70, 2007.
96. VAN VEEN N.H.; LOCKWOOD D.N.; VAN BRAKEL W.H.; RAMIREZ J. JR.; RICHARDUS J.H. Interventions for erythema nodosum leprosum. A Cochrane review. **Lepr Rev.** v.80, n.4, p. 355-372, 2009.
97. WÅLINDER P.E.; GIP L.; STEMPE M. Corneal changes in patients treated with clofazimine. **Br J Ophthalmol.** n.60, v.7, p.526-528, 1976.
98. WEDDELL, G. et al. Recent investigations into sensory and neurohistological changes in leprosy. In: **Leprosy In Theory and Practice.** R.G. Cochrane, Ed Bristol: John Wright & Sons, Ltd, 1959, p. 96–113.
99. WEMAMBU S.N.C.; TURK J.L.; WATERS M.F.R.; REES R.J.W. Erythema nodosum leprosum: clinical manifestation of the Arthus phenomenon. **Lancet.** n.1, v.2, p.933-935, 1969.
100. _____ WYNN T.A. T_H -17: a giant step from T_H1 and T_H2 . **Nat Immunol.** v.6, n.11, p.1069-1070, 2005.
101. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug therapy against leprosy. Development and implementation over the past 25 years, 2004, 179p.
102. _____. World health statistics, 2010, 177p.
103. _____. TB/HIV: a clinical manual. 2nd ed. WHO/HTM/TB/2004.329. Geneva, Switzerland: WHO, 2004, 217p.
104. YAO Z.; FANSLOW W.C.; SELDIN M.F.; ROUSSEAU A.M.; PAINTER S.L.; COMEAU M.R.; COHEN J.I.; SPRIGGS M.K. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity.** n.187, v.9, p.4392-4402, 2011.

105. YUHAS Y.; BERENT E.; OVADIAH H.; AZOULAY I.; ASHKENAZI. Rifampin augments cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother.** n.50, v.1, p.396-398, 2006.
106. WÅLINDER P.E.; GIP L. STEMPA M. Corneal changes in patients treated with clofazimine. **Br J Ophthalmol.** n.60, v.7, p.526-528, 1976.
107. ZELANTE T.; DE LUCA A.; BONIFAZI P.; MONTAGNOLI C.; BOZZA S.; MORETTI S.; BELLADONNA M.L.; VACCA C.; CONTE C.; MOSCI P.; BISTONI F.; PUCCETTI P.; KASTELEIN R.A.; KOPF M.; ROMANI L. IL-23 and the T_H17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur J Immunol.** n.37 v. 10, p.2695–2706, 2007.
108. ZIGLAM H.M.; DANIELS I.; FINCH R.G. Immunomodulating activity of rifampicin. **J Chemother.** n.10, v.37, p.357-361, 2004.

ORIGINAL ARTICLE

T_H17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment

F.B. de Almeida-Neto,^{1,2,3} V.M. Assis Costa,^{4,5} A.F. Oliveira-Filho,⁶ E. de Souza Franco,⁷ E.V. Tavares Julião de Lima,⁸ V.M. Barros de Lorena,⁹ V.M. Oliveira de Souza,^{4, 5,10} M.B. de Sousa Maia^{11,*}

¹Department of Pathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brazil

²Dermatology, Leprology and Venereology, Amélia de Pontes Health Care Center – Caruaru, Pernambuco, Brazil

³Herbert de Souza Health Care Center – Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil

⁴Tropical Medicine, UFPE, Pernambuco, Brazil

⁵Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), UFPE, Pernambuco, Brazil

⁶Biomedicine, UFPE, Pernambuco, Brazil

⁷Physiology and Pharmacology, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

⁸Dermatological Nursing Department, Castelo Branco University, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁹Immunology Department, Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM / Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, Pernambuco, Brazil

¹⁰Department of Pharmaceutical Sciences, UFPE, Pernambuco, Brazil

¹¹Departments of Physiology and Pharmacology, Laboratory of Pharmacology of Bioactive Products, UFPE, Pernambuco, Brazil

*Correspondence: M.B. de Sousa Maia. E-mail: mbsm@ufpe.br

Abstract

Background Studies on the immunology of leprosy are fundamental to the understanding of the various forms of clinical manifestation of the disease. In some diseases, lymphocytes T_H17 and one of its key cytokines, interleukin-17 has been shown to be essential in developing an effective immune response. In leprosy, involvement of lymphocyte T_H17 and interleukin-17 remains understudied.

Objectives This study is the first investigation to examine the association between T_H17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy.

Methods To document the participation of T_H17 cells and interleukin-17 in the immunology of leprosy, to observe the behavior of interferon- γ in relation to interleukin-17 and to verify the differences found between individuals paucibacillary, multibacillary and household contacts, we analyzed samples peripheral blood to identify T_H-17 cells, interleukin-17 and IFN- γ ; establishing relationships between all the groups.

Results There was a significant difference in the results found in the comparison between the paucibacillary and multibacillary groups of patients ($P < 0.001$), as well with the household contacts ($P < 0.005$). The polychemotherapeutic treatment modified the profile of immune response in multibacillary patients compared to what was observed before the start of treatment.

Conclusion The principal finding was that T_H17 lymphocytes and interleukin-17 actively participating in the immune response of Hansen's disease as well these cells can stimulate the cellular immunity.

Received: 14 May 2014; Accepted: 21 October 2014

Conflicts of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Funding sources

This Research was supported in part by PROPESQ (Pró-Reitoria Para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação) of the Federal University of Pernambuco.

Introduction

Leprosy remains a serious public health problem in several countries of the world, especially in India and Brazil, which ranks second in the world in newly registered cases of the disease. The clinical manifestation of the disease is diverse and variable, and depends basically of immunological mechanisms defined by the interaction of the aetiological agent and its host.¹

Until now, the definition of the clinical course of the disease is mediated by the ability of the body to develop dichotomous immune responses.² With the predominance of a cellular immune response, there is greater control of the bacillary load and consequently of the disease, leading to clinical presentation of PB forms. On the other hand, if there is preponderance of a humoral-type immune response, a super-proliferation of *Bacillus* occurs and spreads, causing the clinical presentation of multibacillary (MB) forms of the disease. This dichotomy is attributed until now, among other factors, to two cellular population subgroups: T_H1 and T_H2 lymphocytes, which through the production of certain cytokines, define the clinical direction of the development of Hansen's disease in its various forms.³

After the relatively recent discovery of a third, independent lymphocytic sub-population, defined as T_H17 lymphocytes,⁴ whose real role, whether as protector or not, is not yet established in Hansen's disease, in addition to the production of interleukin-17 (IL-17), which is pointed to as the main by-product of this same cellular sub-population,⁵ it is necessary that the concepts of the immunology of Hansen's disease be revised and expanded. The protective role of interferon- γ (IFN- γ) appears to be well defined. There is a greater expression of this cytokine in PB forms of the disease.⁶ Most studies involving IFN- γ and IL-17 suggest a regulatory mechanism between these two cytokines, so that the expansion of IFN- γ leads to a depletion of IL-17.⁷

The aim of this study was to verify the involvement of T_H17 lymphocytes and IL-17 in peripheral blood of patients with untreated leprosy and after undergoing multidrug therapy and to compare the differences found between the groups with household contacts of these same patients. After this first step, we propose to verify that the chemotherapy treatment modified the frequency of these cells and cytokines.

Materials and methods

Patients were selected at the Amélia Pontes Health Center, located in the city of Caruaru, Pernambuco, and the Hebert de Souza Health Center in the Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, both in Brazil, (well-recognized dermatology centres). In the period established for blood sample collections, 23 patients arrived at the centre and all agreed to participate in this study. Of these patients, 13 were classified as MB and 10 as PB. The clinical form was considered the clinical occurrence of the disease in diagnosed individuals, in accordance with the classification

of Madrid (1953) modified by Ridley-Jopling.⁸ The operational classification stratified patients with Hansen's disease into PB and MB groups in accordance with the criteria set out by the World Health Organization.⁹ The analysis of the results obtained took into consideration this classification. For the clinical evaluation of these patients, questionnaires were conducted and medical records were developed with following data: identification (name, age, sex and ethnic group), time of onset of the disease, clinical classification, operational classification, family history of Hansen's disease cases, history of contact with patients carrying Hansen's disease, history of chronic infectious diseases or autoimmune diseases and use of medication. All patients diagnosed with Hansen's disease in this period were patients without complications or comorbidities that could interfere with the expected evolution of the disease. After the diagnosis and the completion of routine examinations, patients received the first dose of polychemotherapy and were told to bring their household contacts to be examined. Eight patients responded to this request, resulting in the examination of 10 individuals. After the second month of polychemotherapeutic treatment, patients were told to return for another blood collection for the completion of the study. Seven patients visited the centre to collect this second sample.

The procedures followed were in accordance with the ethical standards set by the committee responsible for human experimentation at the Federal University of Pernambuco and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. All persons involved in this study signed a disclosed consent form.

Analysis of samples

To evaluate the production of IFN- γ and IL-17 by T CD4⁺ cells, undiluted whole blood samples of PB patients (6), MB patients (15) and healthy contacts (10) were incubated for 24 h with 1 mL of RPMI, supplemented with 10% FCS in culture tubes (Falcon BD) and stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (10 μ g/mL) or *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (1 μ g/mL). After 18 h of stimulation, 0.5 μ L of BD Protein Golgistop Transport Inhibitor (BD Bioscience™, São Paulo, Brazil) was added for the last six remaining hours. Fixed cells were permeabilized in 1 mL of BD Perm/Wash™ (BD Bioscience™, Catalogue No 554733, São Paulo, Brazil), incubated at room temperature for 15 min and centrifuged at 300 g for 10 min, removing the supernatant. The cell suspensions were stained with a 5 μ L mixture of CD4 PERCP-CY5.5 (clone SK3) (FL3); IL-17A PE (clone N49-653) (FL2), IFN- γ FITC (clone B27) (FL1) antibodies for 30 min at room temperature and protected from light. After marking, the suspensions were washed twice with 1 mL of BD Perm/Wash™ and centrifuged at 300 g for 10 min. The cells were then suspended again with 400 μ L of BD Cytotfix™ (BD Bioscience™, São Paulo, Brazil). Data acquisition and analysis were

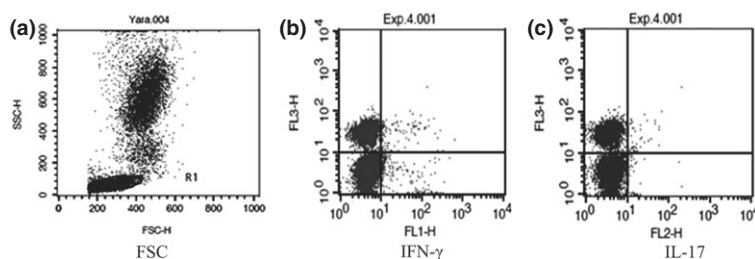


Figure 1 Distinct gate strategies were used to analyze each cytokine-expressing leucocyte subpopulations. Lymphocytes gate started with the selection of Region 1 (R1) in Forward Scatter Channel versus Side Scatter Channel (SSC) dot plot (a). Following gate combination, cytokine expressing CD4 T-cell subset was quantified by quadrant statistics of FL3/anti-CD4-PerCP-CY5.5 versus FL1/anti-IFN- γ -FITC (b) or FL2/anti-IL-17A-PE dot plots. The analysis of T_H17 cells was performed by selecting the Region 2 (R2) in of FL3/anti-CD4-PerCP-CY5.5 versus FL1/anti-IFN- γ -FITC dot plot (c).

performed using the BD Cell quest™ Pro software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA 95131, USA) after collecting a minimum of 20 000 events/sample and the strategy for the analysis of cells producing IL-17 and IFN- γ is shown in Fig. 1.

Statistical analysis

The data of cytokine occurrence and cellular phenotyping were performed via the software GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037 USA). Analysis of variance (ANOVA) was performed and assigned the heterogeneity of the samples, the Kruskal–Wallis test was used followed by the Dunns test to compare the population of T_H17 cells between treated and untreated individuals and the Wilcoxon test for paired samples. Correlation among different cytokine productions was conducted by using Pearson's correlation test.

Results

The analysis of the Hansen's disease patients showed that of the 23 patients studied, 10 patients (43.4%) were considered PB and 13 patients (56.5%) were considered MB. The clinical classification of Madrid modified by Ridley–Jopling showed that four patients (17.9%) were of an indeterminate form, six patients (26%) were of the tuberculoid form, seven patients (30.4%) were of the borderline form, two patients (8.7%) were of borderline-lepromatous form and four patients (17.9%) were of the lepromatous form. The age ranged between 15 and 76 years, with an average age of 34.8 years. Nine patients were female (39.1%) and 14 patients (60.8%) were male. The smear was performed in all patients.

All the patients classified as PB had a negative smear. All patients classified as MB had a positive smear. Patients with comorbidities were excluded from this study. Ten per cent presented two affected nerve trunks, 45% had one affected nerve trunk and 45% had no impairment of nerve trunks (Table 1).

In group of patients' household contacts, 90% of the household contacts had some degree of kinship with the Hansen's disease patient, 50% were male, 50% female. Three contacts examined had kinship with the lepromatous polar form, which is worrisome as this form is most responsible for the spread of the *Bacillus* in the community, despite having already demonstrated the importance in the chain of transmission of patients with PB clinical forms of the disease (Table 2).

Result of the samples in untreated patients

Frequency of CD4⁺IFN- γ ⁺ T cells (T_H1) The frequency of CD4⁺IFN- γ ⁺ T cells (T_H1), in the untreated patient group, stratified in PB and MB showed distinct results. The pattern of response was similar in both the stimulation with PHA as with BCG. The individuals with MB Hansen's disease showed a low expression of T_H1 cells. The differences between the PB individuals stimulated with BCG (PB-BCG) and with phytohaemagglutinin (PB-PHA) were significantly greater ($P < 0.001$) than MB individuals (MB-BCG and MB-PHA). The household contacts are (C-PHA and C-BCG) showed a similar response pattern to MB patients (Fig. 2a).

Frequency of CD4⁺IL-17⁺ cells (T_H1 + T_H17) The frequency of CD4⁺IL-17⁺ cells showed distinct results when comparing MB and PB groups. Stimulation with PHA showed that the MB group had a significantly lower production of IL-17 by CD4⁺ cells than the PB group. The PB patients had higher production of IL-17 after the stimulus with BCG. The results of the household contacts in relation to this production of IL-17 by CD4⁺ cells, when stimulated with PHA, showed a pattern similar to the PB group when it was stimulated with BCG (Fig. 2b).

Frequency of CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻ (T_H17) T_H17 cells showed a response even more significant in the comparison between

Table 1 Profile of Hansen's disease patients

P	No. of LES	No. of NERV	Clin form	OPR	Age	Sex	Smear
D1	1	0	I	PB	26	F	NEG
D2	1	0	I	PB	42	F	NEG
D3	2	0	T	PB	21	F	NEG
D4	1	0	T	PB	20	F	NEG
D5	1	0	I	PB	21	F	NEG
D6	1	0	I	PB	15	M	NEG
D7	1	0	T	PB	48	F	NEG
D8	DISS	2	BL	MB	26	F	POS (IB = 0.75)
D9	1 EXT	1	B	MB	31	M	POS (IB = 1.0)
D10	DISS	1	BL	MB	26	M	POS (IB = 1.75)
D11	DISS	1	L	MB	29	M	POS (IB = 3.5)
D12	1 EXT	1	B	MB	76	M	POS (IB = 1.0)
D13	1 EXT	1	B	MB	24	F	POS (IB = 1.0)
D14	DISS	1	L	MB	63	M	POS (IB = 4.25)
D15	3 EXT	1	B	MB	30	M	POS (IB = 1.0)
D16	DISS	0	L	MB	64	M	POS (IB = 3.5)
D17	3 EXT	0	B	MB	15	M	POS (IB = 1.0)
D18	1	1	T	PB	42	M	NEG
D19	DISS	1	B	MB	34	M	POS (IB = 1.0)
D20	DISS	2	B	MB	39	M	POS (IB = 1.0)
D21	2	0	T	PB	22	M	NEG
D22	3	0	T	PB	29	F	NEG
D23	DISS	1	L	MB	59	M	POS (IB = 3.5)

B, borderline; BL, borderline-lepromatous; CLIN FORM, clinical form of Hansen's disease; DISS, disseminated; EXT, extensive; I, indeterminate; IB, bacilloscopic index; L, lepromatous; LES, number of skin lesions; MB, multibacillary; NEG, negative; NERV, number of affected nerve trunks; OPR, operational classification; P, patient with Hansen's disease; PB, paucibacillary; POS, positive; T, tuberculoid; T, tuberculoid.

Table 2 Profile of Hansen's disease patients' household contacts

Contact	Relationship	Clinical form of the disease	Age	Sex
CT1	Daughter	B	40	F
CT2	Son	B	54	M
CT3	Father	T	53	M
CT4	Sister	T	22	F
CT5	Wife	I	32	F
CT6	Son	I	10	M
CT7	Son	I	16	M
CT8	Brother	L	52	M
CT9	Sister	L	61	F
CT10	Daughter	L	49	F

B, borderline; CT, Contact; F, female; I, indeterminate; L, lepromatous; M, male; T, tuberculoid.

individual groups of leprosy patients, especially when stimulated with PHA. MB individuals showed a significantly lower ($P < 0.001$) compared to PB individuals. Even a lesser extent, stimulation with BCG also showed statistical significance between groups. Household contacts of MB individuals also had

a higher production of T_H17 cells with the both stimulation (Fig. 2c).

Correlation coefficient between the cytokines $IFN-\gamma$ and $IL-17$ The correlation observed between the inflammatory cytokines $IFN-\gamma$ and $IL-17$ after stimulation with PHA and BCG was positive, both in patients with the PB form as with patients with the MB for of the disease (Table 3).

Comparative result of samples before and after the second month of treatment

Multibacillary patients before treatment (MB-ST) and after the second month of polychemotherapeutic treatment (MB-CT), had a population increase in the T_H1 cells, especially when stimulated with PHA, but not significant difference statistically. Stimulation with BCG also featured the same trend towards expansion (Fig. 3a and b). PB patients before treatment (PB-ST) and after the second month of polychemotherapeutic treatment (PB-CT) did not show significant changes in the population of $CD4^+IFN-\gamma^+$ cells (Fig. 3c and d).

In relation to the frequency of $CD4^+IL-17^+$ cells in MB patients, there was a significant expansion of its population

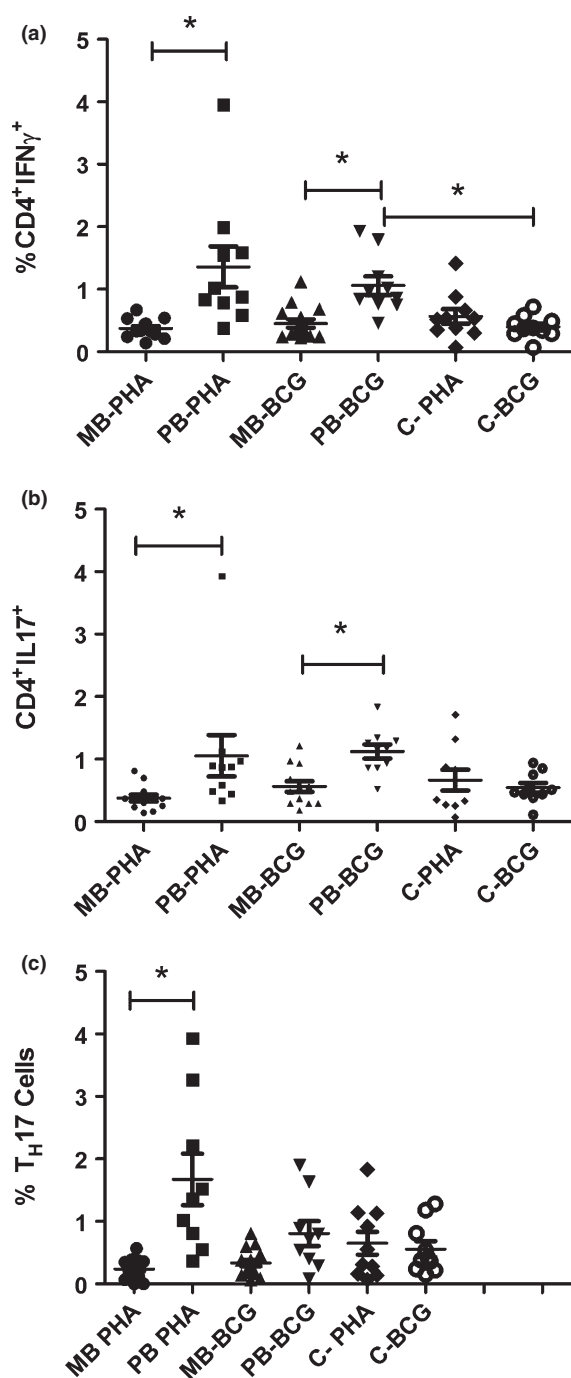


Figure 2 Result of the samples in untreated patients. Frequency of T_H1 cells (a); IL-17 (b) and T_H17 cells (c), were verified in peripheral blood cells of patients with multibacillary (MB), paucibacillary (PB) and household contacts without infection (C) were stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (10 μ g/mL) and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (1 μ g/mL) for 24 h. Results of PB-BCG were significantly greater than MB-BCG, while PB-PHA were significantly greater than MB-PHA, C-BCG was similar to PB-BCG (* $P < 0.01$).

Table 3 Correlation coefficient between the cytokines IL-17 and IFN after stimulation with PHA and BCG in paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients

	Correlation coefficient			
	MB (n = 13)		PB (n = 10)	
	r^2	P	r^2	P
PHA	0.84	0.00064	0.932	0.000085
BCG	0.959	0.0000022	0.787	0.07

BCG, Bacillus Calmette-Guérin; PHA, phytohaemagglutinin.

before and after the second month of polychemotherapeutic treatment ($P < 0.05$), especially after stimulation with PHA (Fig. 4a and b). PB patients did not show significant changes in the frequency of CD4⁺IL17⁺ cells before (PB-ST) and after (PB-CT) polychemotherapeutic treatment with the both stimulation, PHA and BCG (Fig. 4c and d).

The population of T_H17 cells in MB patients exhibited significant expansion ($P < 0.05$) after the second month of polychemotherapeutic treatment in response to the stimulation with PHA and BCG (Fig. 5a and b). There were no statistically significant differences in PB patients before (PB-ST) and after (PB-CT) the second month of polychemotherapeutic treatment in response to stimulation with PHA (ST PHA) and BCG (Fig. 5c and d).

Discussion

Paucibacillary individuals produce more IFN- γ : the importance of IFN- γ in the primary response to *Mycobacterium leprae* is well established.⁶ These results are corroborated by the literature. In the present study, a significantly higher frequency was observed of TCD4⁺ cells producing IFN- γ in PB patients compared to MB patients stimulated either with PHA or BCG ($P < 0.001$). Several studies have pointed to IFN- γ and TNF- α as having an important role in immune-protection. IFN- γ activates antimicrobial mechanisms, inducing production of inducible NO synthase, leading to the production of nitric oxide, an important microbicide.¹⁰ In addition, IFN- γ induces macrophages to produce TNF- α , increasing the activation of these same cells.¹¹ It has been shown that TNF- α is present in the serum of patients with tuberculoid forms and absent in the serum of patients with lepromatous forms, indicating that the destruction of the *Bacillus* and granuloma formation must be related to the presence of this cytokine.¹²

Paucibacillary patients had a significantly higher frequency of CD4⁺IL-17⁺ T cells both when stimulated with PHA as with BCG: the function of IL-17 in Hansen's disease is unknown. Studies that have examined other mycobacterial infections have shown that IL-17 modulates the production of IFN- γ , increasing the T_H1 response.¹³ In tuberculosis, IL-17 can affect both homeostasis as well as neutrophil survival. In this disease, when IL-17 is neutralized, a reduction in neutrophils occurs.¹⁴ Torrado and Cooper showed that during primary tuberculosis, both IFN- γ

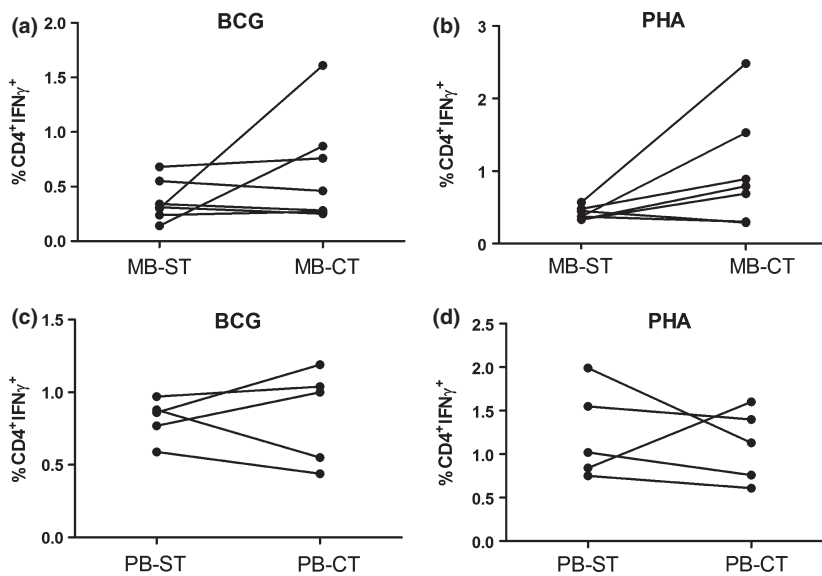


Figure 3 Comparative frequency of CD4⁺IFN- γ ⁺ cells in multibacillary (a and b) and paucibacillary (c and d) patients before and after treatment. Peripheral blood cells stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (10 μ g/mL) and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (1 μ g/mL) for 24 h.

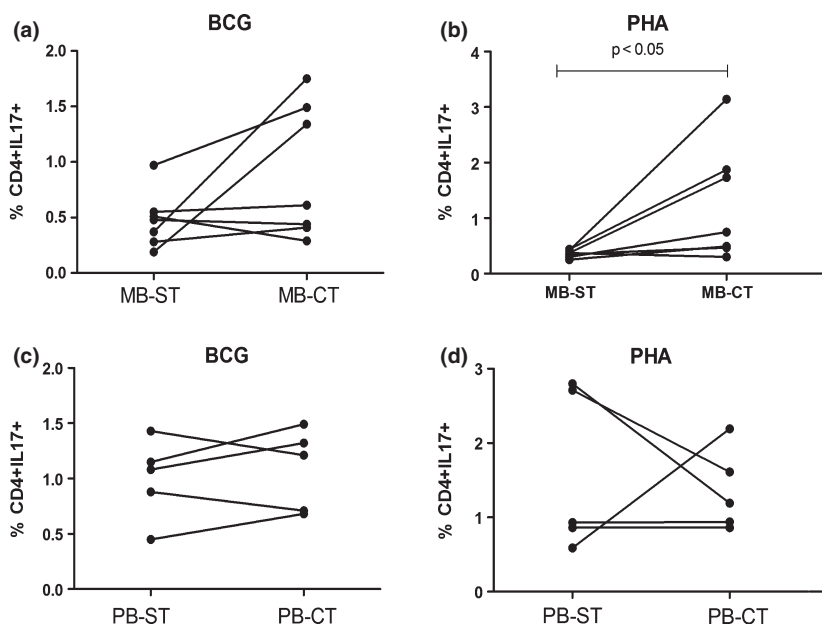
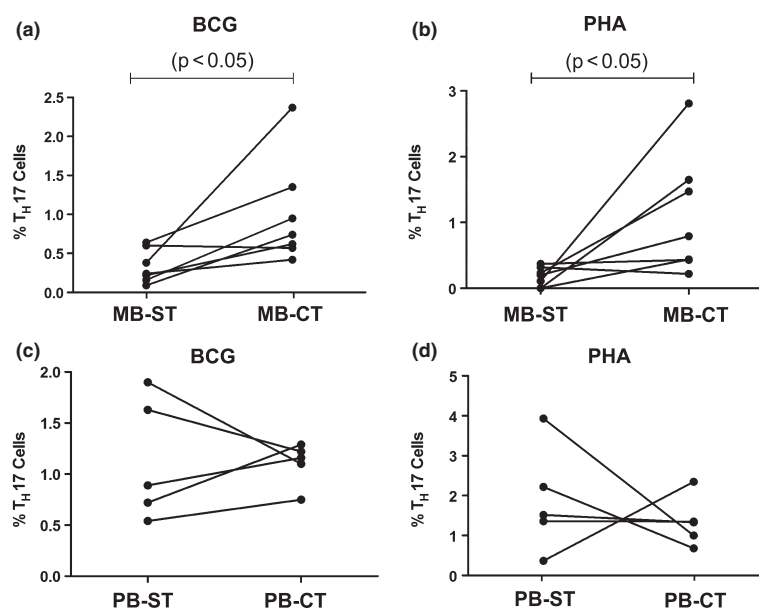


Figure 4 Comparative frequency of CD4⁺IL-17⁺ cells in multibacillary (a and b) and paucibacillary (c and d) patients before and after treatment. Peripheral blood cells stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (10 μ g/mL) and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (1 μ g/mL) for 24 h.

and IL-17 are expressed, both of which are potent inflammatory cytokines capable of inducing the expression of chemokines, which in turn promote cell recruitment and organization of the granuloma during infection.¹⁵ Okamoto *et al.*,¹⁶ report the importance of IL-17 in the formation of granuloma in the lungs of mice infected with BCG. In this study, mice deficient in IL-17A were unable to develop mature granulomas favouring the spread of infection. This present study suggests that IL-17 has a protective role in the onset of infection and it is possible that the mechanism involved could be related with the survival and recruitment of neutrophils in the early stages of injury leading to control of bacillary load.

However, during the chronic phase of infection, a balance between T_H1 and T_H17 is necessary for the control of bacterial growth and their respective immunopathology.¹⁶ Therefore, excessive production of IL-17 could lead to increased recruitment of neutrophils and consequently greater tissue damage. Perhaps deregulation in these modulating mechanisms IFN- γ vs. IL-17 contributes to the occurrence of reactionary states of the reverse reaction type. Another protective mechanism of IL-17 was found in *Francisella tularensis* infection, the causative agent of tularaemia. The authors have shown that T_H17 dependent on IL-23 induces the secretion of IL-12 by dendritic cells, increasing the T_H1 response. This response depends directly on the signal-

Figure 5 Comparative frequency of TH17 (CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺) cells in multibacillary (a and b) and paucibacillary (c and d) patients before and after treatment. Peripheral blood cells stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (10 μ g/mL) and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (1 μ g/mL) for 24 h.



ling of IL-17, leading to more production of IFN- γ followed by improvement of microbicidal effects.¹⁷ In fact, this study suggests that IL-17 has a protective role in the onset of infection and it is possible that the mechanism involved could be related to the survival and recruitment of neutrophils in the early stages of injury leading to control of bacillary load.

This study documented a positive correlation between IFN- γ and IL-17: these results suggest that these cytokines act in a synergistic way to control the infection. In 2010, Cruz repeatedly stimulated with BCG mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* and concluded that the number of cells producing IFN- γ was not affected. However, the repeated antigenic stimulation caused IL-17 to become refractory to the previously suggested regulation by IFN- γ , resulting in a significant increase in the number of IL-17-producing cells in the tissues. For these authors, the high expression of T_H17 cells could be responsible for most of the tissue damage.¹⁸ Both IFN- γ and IL-17 contribute to sustained autoimmune and inflammatory responses in systemic autoimmune diseases.¹⁹ Of crucial importance will be the reproduction of this study in reactionary patients, with the prospect of correlating tissue destruction to the balance between the production of IFN- γ and IL-17.

Paucibacillary patients express a greater number of T_H17 cells: the role of T_H17 cells in the literature is controversial. These cells have been implicated as strongly inducing inflammation and tissue damage in autoimmune disease and infection models.²⁰ The mediation of T_H17 cells between protection and pathology is an important issue in the definition of its role in the control of infectious diseases. It has been demonstrated even in the literature, the importance of the participation of T_H17 lymphocytes in the formation of

granuloma in infections caused by other mycobacteria.¹⁶ Our results demonstrated for the first time that PB patients had a significantly higher frequency of T_H17 cells in both stimulations with PHA as well as with BCG. These data are unprecedented and suggest that this population is related to a protective immunological activity against infection, contributing to the development of PB forms of the disease. Activation of these cells at the beginning of the contact with the *M. leprae* would lead to better control of bacillary load and attenuation of inflammatory injury.²¹ Recently, higher IL-17 levels in supernatants of PBMC stimulated by *M. leprae* sonicated antigen of healthy contacts and tuberculoid form were related when compared to lepromatous form.²²

Household contacts feature a greater number of T_H17 cells: in Brazil, for operational purposes a household contact is considered any person who resides or has resided with the Hansen's disease patient in the last 5 years. The results suggest an involvement of T_H17 lymphocytes in the development of the immune response that confer protection against the disease, taking into account the constant exposure to *M. leprae* to which these individuals are submitted.

Multibacillary individuals express less CD4⁺IFN- γ ⁺ T lymphocytes, less CD4⁺IL-17⁺ T lymphocytes and fewer T_H17 lymphocytes, correlating directly IFN- γ , IL-17 and T_H17 cells to the inability of proper elaboration of the cellular immune response and the development of more severe forms of the disease. Attia *et al.* showed that high serum IL-10 in leprosy patients was associated with low serum IL-17, and they suggested that deficient IL-17 production can contribute to progression towards MB pole. IL-17 was found in supernatants of antigen stimulated PBMC of healthy contacts and tuberculoid

form as compared to lepromatous leprosy²² and also was expressed in skin biopsies before and after thalidomide treatment for Erythema nodosum leprosum.²³

Multibacillary individuals changed the profile of the immune response after the start of polychemotherapeutic treatment, expanding significantly the population of CD4⁺IL17⁺ cells and also of T_H17 cells ($P < 0.05$). This fact suggests that, in fact both the IL-17 as well as the T_H17 population are involved in immunological processes that direct the individual towards cure of the infection.

This study confirmed the active participation of T_H17 cells and of their principal by-product, IL-17, in the immunology of Hansen's disease. A positive correlation was also established between IFN- γ and IL-17, as well as the differentiation of the frequency of these cells between individuals who have PB forms and those individuals with MB forms of the disease. It is suggested that IL-17 and T_H17 cells participate in immunological processes related to states of resistance to the disease in household contacts. Finally, the immunological response found in MB individuals after the start of polychemotherapeutic treatment was verified; this response results in increased production of IL-17 and the population of T_H17 lymphocytes. The verification of these results upon completion of the polychemotherapeutic treatment, as well as the histological reproduction of this study including reactionary patients and patients with disease recurrence may contribute with much more data for interpretation of these results.

Acknowledgement

We acknowledge Dr. Fred Nietto (PHD) for contribution to the translation of this manuscript.

References

- 1 Rees RJH. Recent bacteriologic, immunologic and pathologic studies on the experimental human leprosy in the mouse foot pad. *Int J Lepr* 1965; **33**(Suppl.): 646–657.
- 2 Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; **285**: 732–736.
- 3 Modlin RL. T_H1-T_H2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 1994; **102**: 828–832.
- 4 Thomas A, Wynn. T_H17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1069–1070.
- 5 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1123–1132. Epub 2005 Oct 2.
- 6 Nathan CF, Kaplan G, Levis WR *et al.* Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med* 1986; **315**: 6–15.
- 7 Cruz A, Khader SA, Torrado E *et al.* Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* 2006; **177**: 1416–1420.
- 8 Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; **34**: 255–273.
- 9 WHO study group chemotherapy of leprosy, for control program. World Health Organization, Geneva, 1982. Tech: Rep Ser 675.
- 10 Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy I. *Int J Dermatol* 1998; **37**: 733–740.
- 11 Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 1985; **134**: 1619–1622.
- 12 Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev* 2011; **82**: 371–382.
- 13 Khader SA, Bell GK, Pearl JE *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007; **8**: 369–377.
- 14 Dragon S, Saffar A, Shan L, Gounni A. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol* 2008; **45**: 160–168. Epub 2007 Jun 6.
- 15 Torrado E, Cooper AM. IL-17 and T_H17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; **21**: 455–462. Epub 2010 Nov 12.
- 16 Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A *et al.* Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 2010; **184**: 4414–4422. Epub 2010 Mar 8.
- 17 Lin Y, Ritchie S, Logar A *et al.* Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009; **31**: 799–810. Epub 2009 Oct 22.
- 18 Cruz A, Fraga AG, Fountain JJ *et al.* Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2010; **207**: 1609–1616. Epub 2010 Jul 12.
- 19 Ambrosi A, Espinosa A, Wahren-Herlenius M. IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases. *Eur J Immunol* 2012; **42**: 2274–2284. doi:10.1002/eji.201242653.
- 20 Murphy CA, Langrish CL, Chen Y *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; **198**: 1951–1957. Epub 2003 Dec 8.
- 21 Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E *et al.* Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4⁺ CD25 highFoxP3⁺ T-reg cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res* 2014; **306**: 793–801.
- 22 Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4⁺ T_H17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **25**: e2338.
- 23 Martiniuk F, Giovinnazzo J, Tan AU *et al.* Lessons of leprosy: the emergence of T_H17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol* 2012; **11**: 626–630.

APÊNDICE B– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “*Níveis de Interleucina-17 e de células Th-17 em Portadores de Hanseníase e sua associação com parâmetros Clínicos*”.

O motivo que nos leva a estudar este problema é contribuir para o avanço nos estudos da hanseníase, que em nosso país, ocupa o segundo lugar de ocorrência em relação ao mundo. Pernambuco apresenta-se como o estado que ocupa a primeira colocação em detecção de casos novos da doença. O objetivo deste estudo é verificar a participação de uma população de células chamada TH17 que produzem uma substância que pode interferir no desenvolvimento da doença. Portanto saberemos se indivíduos com hanseníase apresentam maior quantidade destas células em comparação com indivíduos que não tem a doença, e se o tratamento pode modificar a produção destas células.

Os procedimentos de coleta de material serão da seguinte forma:

O Sr(a) receberá um atendimento para avaliação clínica. Será realizada a coleta de uma amostra sanguínea de 20 mL, igual a uma coleta que é feita para a realização de qualquer exame de sangue. Este procedimento ocorrerá antes do início do tratamento e 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o tratamento

Os riscos aos quais os voluntários serão submetidos são inerentes à uma punção venosa periférica, tais sejam: dor moderada, infecções e infiltrações, todos minimizados pelo emprego de técnica adequada à sua realização.

Os benefícios que os pacientes obterão com o estudo serão: acompanhamento mais próximo de toda a evolução do tratamento da hanseníase, realização de exames de triagem que poderão detectar outras infecções, recebimento de material educativo sobre a hanseníase, exame e avaliação rigorosa dos contatos domiciliares, que apesar de ser preconizado pelo Programa Nacional de combate à hanseníase, por vezes é negligenciado pelos profissionais de saúde, contribuindo desta forma para a perpetuação da Patologia

Caso você apresente algum problema em seu exame clínico ou que possa ser presumido pelo resultado obtido com esta amostra de sangue, você será encaminhado para o tratamento adequado ao seu problema, sendo direcionado para a Equipe de Saúde da Família ou para o Centro de Referência onde está sendo acompanhado com as observações que forem necessárias. No entanto é preciso que você fique ciente que este exame de sangue é específico para esta pesquisa e não irá detectar outros problemas de saúde. Este exame não substitui e nem complementa em nenhum momento os exames de rotina que você realiza com o seu médico.

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será

liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso “Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco” e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo a qual serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que eu sou livre para interromper a participação na pesquisa a qualquer momento, sem justificar a decisão tomada e que isso não afetará o meu tratamento. Sei que o meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o médico pesquisador responsável por este projeto, Dr. Francisco Bezerra de Almeida Neto – CREMEPE 11823 () ou a professora orientadora Dra. Maria Bernadete de Souza Maia no telefone 081- 21268530 ou ainda no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), localizado na Avenida da Engenharia, s/n - 1º andar, CEP: 50740-600, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil. Telefone/Fax (81) 21268588 .

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Recife, ____/____/____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: Dr. Francisco Bezerra de Almeida Neto

Assinatura: _____

Nome do Orientador: Maria Bernadete de Souza Maia

Assinatura: _____

APÊNDICE C– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Menores**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Menores de 18 anos)

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa *“Níveis de Interleucina-17 e de células Th-17 em Portadores de Hanseníase e sua associação com parâmetros Clínicos”*.

O motivo que nos leva a estudar este problema é contribuir para o avanço nos estudos da hanseníase, que em nosso país, ocupa o segundo lugar de ocorrência em relação ao mundo. Pernambuco apresenta-se como o estado que ocupa a primeira colocação em detecção de casos novos da doença. O objetivo deste estudo é verificar a participação de uma população de células chamada TH17 que produzem uma substância que pode interferir no desenvolvimento da doença. Portanto saberemos se indivíduos com hanseníase apresentam maior quantidade destas células em comparação com indivíduos que não tem a doença, e se o tratamento pode modificar a produção destas células.

Os procedimentos de coleta de material serão da seguinte forma:

O(a) menor sob sua responsabilidade receberá um atendimento para avaliação clínica. Será realizada a coleta de uma amostra sanguínea de 20 mL, igual a uma coleta que é feita para a realização de qualquer exame de sangue. Este procedimento ocorrerá antes do início do tratamento e 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o tratamento

Os riscos aos quais os voluntários serão submetidos são inerentes a uma punção venosa periférica, tais sejam: dor moderada, infecções e infiltrações, todos minimizados pelo emprego de técnica adequada à sua realização.

Os benefícios que os pacientes obterão com o estudo serão: acompanhamento mais próximo de toda a evolução do tratamento da hanseníase, realização de exames de triagem que poderão detectar outras infecções, recebimento de material educativo sobre a hanseníase, exame e avaliação rigorosa dos contatos domiciliares, que apesar de ser preconizado pelo Programa Nacional de combate à hanseníase, por vezes é negligenciado pelos profissionais de saúde, contribuindo desta forma para a perpetuação da Patologia

Caso o menor apresente algum problema em seu exame clínico ou que possa ser presumido pelo resultado obtido com esta amostra de sangue, será encaminhado para o tratamento adequado ao seu problema, sendo direcionado para a Equipe de Saúde da Família ou para o Centro de Referência onde está sendo acompanhado com as observações que forem necessárias. No entanto é preciso que você fique ciente que este exame de sangue é específico para esta pesquisa e não irá detectar outros problemas de saúde. Este exame não substitui e nem complementa em nenhum momento os exames de rotina que você realiza com o seu médico.

Você e o menor sob sua responsabilidade poderão obter todas as informações sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você e o menor são livres para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc. serão enviados para você e permanecerão confidenciais. O nome do menor ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. O menor não será identificado (a) em nenhuma

publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso “Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco” e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELO(a) PARTICIPANTE

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi a finalidade do estudo e qual procedimento ao qual o menor sob minha responsabilidade será submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que eu e o menor sob minha responsabilidade somos livres para interromper a participação dele na pesquisa a qualquer momento, sem justificar a decisão tomada e que isso não afetará o tratamento dele. Sei que o nome do menor não será divulgado, que não teremos despesas e não receberemos dinheiro por participar do estudo

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o médico pesquisador responsável por este projeto, Dr. Francisco Bezerra de Almeida Neto – CREMEPE 11823 () ou a professora orientadora Dra. Maria Bernadete de Souza Maia no telefone (81- 21268530) ou ainda no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), localizado Avenida da Engenharia, s/n - 1º andar, CEP: 50740-600, Cidade Universitária Recife - PE, Brasil, telefone/Fax (81) 21268588. Eu concordo com a participação do menor no estudo, desde que ele também concorde. Por isso ele assina (caso seja possível) junto comigo este Termo de Consentimento.

Recife, ____/____/____

Nome do responsável legal : _____

Assinatura: _____

Nome do menor: _____

Assinatura: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: Dr. Francisco Bezerra de Almeida Neto

Assinatura: _____

Nome do Orientador: Maria Bernadete de Souza Maia

Assinatura: _____

ANEXO A – Folha de Aprovação do CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa)

Andamento do projeto - CAAE - 0177.0.172.000-11				
Título do Projeto de Pesquisa				
Níveis de Interleucina-17 e de Células Th17 em Portadores de Hanseníase e Sua Associação com Parâmetros Clínicos				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	26/04/2011 12:14:14	07/07/2011 09:00:01		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	26/04/2011 12:14:14	Folha de Rosto	0177.0.172.000-11	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	17/04/2011 13:16:31	Folha de Rosto	FR419943	Pesquisador
3 - Protocolo Aprovado no CEP	07/07/2011 09:00:01	Folha de Rosto	208/11	CEP

ANEXO B – Carta de Anuência

GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE CARUARU
CENTRO DE SAÚDE AMÉLIA DE PONTES

**CARTA DE ANUÊNCIA**

Declaramos que concordamos em receber FRANCISCO BEZERRA DE ALMEIDA NETO, aluno do curso de pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco e disponibilizamos as instalações do CENTRO DE SAÚDE AMÉLIA DE PONTES para desenvolver a dissertação de Mestrado em Patologia intitulada "NÍVEIS DE INTERLEUCINA-17 E DE CÉLULAS TH17 EM PORTADORES DE HANSENÍASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS", durante o ano de 2011 de acordo com o projeto de pesquisa entregue.

Estou ciente de que a referida pesquisa envolverá uma coleta sanguínea dos pacientes voluntários em participar deste estudo mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido que será disponibilizado.

Todas as informações serão mantidas confidencialmente.

Ressalto que a minha concordância está condicionada à aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 29 de novembro de 2010

Marlos José Q. Ferreira
Secretário Executivo de Saúde

plc
Maria Cristina Sette de Lima
Secretária Municipal de Saúde de Caruaru

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 339/2011 - CEP/CCS

Recife, 08 de julho de 2011

Registro do SISNEP FR – 419943

CAAE – 0177.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 208/11

Título: Níveis de Interleucina - 17 e de células th17 em portadores de hanseníase e sua associação com parâmetros Clínicos.

Pesquisador Responsável: Francisco Bezerra de Almeida Neto

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 06 de julho de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Mestrando Francisco Bezerra de Almeida Neto
Programa de Pós-Graduação em Patologia -CCS/UFPE

ANEXO D – Regulamentação da defesa e normas de apresentação de DISSERTAÇÃO (Mestrado) e TESE (Doutorado) dos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.



**Universidade Federal de Pernambuco
Programas de Pós-Graduação
do Centro de Ciências da Saúde**

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE



DISSERTAÇÃO (mestrado) E TESE (doutorado)

**REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA
E NORMAS DE APRESENTAÇÃO**

I - REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA

O aluno do Programa da Pós-Graduação /CCS/UFPE deve:

- 1 Apresentar a **dissertação em formato de artigos***, dos quais pelo menos um artigo deve ser enviado para publicação em revista indexada no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que serão submetidos. A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão a ser submetido à publicação.
- 2 Apresentar a **tese em formato de artigos**, dos quais pelo menos dois artigos devem estar submetidos à publicação em revistas indexadas no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que são submetidos (apresentar comprovantes para a defesa de tese). A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão também submetido à publicação.

II NORMAS DA APRESENTAÇÃO¹

ESTRUTURA	ORDEM DOS ELEMENTOS
1 Pré-textuais Elementos que antecedem o texto com informações que ajudam na identificação e utilização do trabalho.	1.1 Capa 1.2 Lombada 1.3 Folha de rosto 1.4 Errata (opcional, se for o caso) 1.5 Folha de aprovação 1.6 Dedicatória(s) 1.7 Agradecimento(s) 1.8 Epígrafe (opcional) 1.9 Resumo na língua vernácula 1.10 Resumo em língua estrangeira 1.11 Lista de ilustrações 1.12 Lista de tabelas 1.13 Lista de abreviaturas e siglas 1.14 Lista de símbolos 1.15 Sumário
2 Textuais	2.1 Apresentação 2.2 Revisão da literatura (ou artigo de revisão) 2.3 Métodos 2.4 Resultados - Artigo (s) original (ais) 2.5 Considerações finais
3 Pós-textuais Elementos que complementam o trabalho	3.1 Referências 3.2 Apêndice (s) 3.3 Anexo (s)

1 Pré-textuais

1.1 Capa

Proteção externa do trabalho e sobre a qual se imprimem as informações indispensáveis à sua identificação

a) Anverso (frente)

Cor: Verde escura;

Consistência: capa dura

Formatação do texto: letras douradas, escrito em maiúsculas, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.

²Adaptadas segundo as recomendações da ABNT NBR 14724, 2005

(NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005).

Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrando; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou Dissertação; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

b) Contracapa

Anverso (Frente)

Cor: branca;

Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.

Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrando; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou da Dissertação, sendo permitida ilustração; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

Observação: As capas verdes e sólidas serão somente exigidas quando da entrega dos volumes definitivos, após aprovação das respectivas bancas examinadoras e das respectivas correções exigidas.

1.2 Lombada

Parte da capa do trabalho que reúne as margens internas das folhas, sejam elas costuradas, grampeadas, coladas ou mantidas juntas de outra maneira.

De baixo para cima da lombada devem estar escritos: o ano, o título da Tese ou da Dissertação, o nome utilizado pelo doutorando ou mestrando nos indexadores científicos.

1.3 Folha de Rosto

Anverso (frente)

Cor: branca;

Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”.

Conteúdo do texto: os elementos devem figurar na seguinte ordem:

- a)** nome do doutorando ou mestrando (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 16, alinhamento centralizado);
- b)** título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
- c)** natureza, nome da instituição e objetivo, explícito pelo seguinte texto: “Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor ou Mestre em Patologia” (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço simples entre linhas, devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita);
- d)** o nome do orientador e se houver, do co-orientador (logo abaixo do item c, separados por dois espaços simples, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento à esquerda);
- e)** local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);

f) ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Verso

Descrever a ficha catalográfica, segundo as normas da Biblioteca Central da UFPE.

1.4 Errata

Esta folha deve conter o título (Errata), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional que deve ser inserido logo após a folha de rosto, constituído pela referência do trabalho e pelo texto da errata e disposto da seguinte maneira:

EXEMPLO ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
32	3	publicação	publicação

1.5 Folha de Aprovação

Elemento obrigatório, colocado logo após a folha de rosto, escrito no anverso da folha (cor branca), não deve conter o título (folha de aprovação) nem o indicativo numérico, sendo descrito em letras pretas, maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, constituído pelos seguintes elementos:

- a)** nome do doutorando ou mestrando (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- b)** título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
- c)** data de aprovação da Tese ou Dissertação, exemplo: Tese aprovada em: 27 de março de 2008 (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
- d)** nome, titulação e assinatura de todos os componentes da banca examinadora e instituições a que pertencem (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
- e)** local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- f)** ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Observação: A data de aprovação e assinaturas dos membros componentes da banca examinadora será colocada após a aprovação do trabalho.

1.6 Dedicatória (s)

Elemento opcional, colocado após a folha de aprovação, onde o autor presta homenagem ou dedica seu trabalho. Esta folha não deve conter o título (dedicatória) nem o indicativo numérico.

1.7 Agradecimento (s)

Esta folha deve conter o título (Agradecimento ou Agradecimentos), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional, colocado após a dedicatória, onde o autor faz agradecimentos dirigidos àqueles que contribuíram de maneira relevante à elaboração do trabalho.

1.8 Epígrafe

Elemento opcional, colocado após os agradecimentos. Folha onde o autor apresenta uma citação, seguida de indicação de autoria, relacionada com a matéria tratada no corpo do trabalho. Esta folha não deve conter o título (epígrafe) nem o indicativo numérico. Podem também constar epígrafes nas folhas de abertura das seções primárias.

Observação: o conjunto dos itens relacionados à dedicatória (s), agradecimento (s) e epígrafe deve conter no máximo cinco páginas.

1.9 Resumo na língua vernácula

Esta folha deve conter o título (Resumo), sem indicativo numérico, centralizado, conforme a ABNT NBR 6024, sendo elemento obrigatório, escrito em português, em parágrafo único, de forma concisa e objetiva dos pontos relevantes, fornecendo a essência do estudo. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas, seguido, logo abaixo, das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores. Estes descritores devem ser integrantes da lista de "Descritores em Ciências da Saúde", elaborada pela BIREME e disponível nas bibliotecas médicas ou na Internet (<http://decs.bvs.br>). Todas as palavras-chave necessitam serem separadas entre si e finalizadas por ponto.

1.10 Resumo na língua estrangeira - Abstract

Esta folha deve conter o título (Abstract), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento obrigatório, escrito em inglês, com as mesmas características do resumo na língua vernácula. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas. Deve ser seguido das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores, na língua.

1.11 Lista de ilustrações

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, acompanhado do respectivo número da página. Quando necessário, recomenda-se a elaboração de lista própria para cada tipo de ilustração (desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas, quadros, retratos e outros). Esta folha deve conter o título (Lista de ilustrações), sem indicativo numérico, centralizado.

1.12 Lista de tabelas

Elemento opcional, elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, devidamente numeradas, acompanhado do respectivo número da página. Esta folha deve conter o título (Lista de tabelas), sem indicativo numérico, centralizado.

1.13 Lista de abreviaturas e siglas

Elemento opcional, que consiste na relação alfabética das abreviaturas e siglas utilizadas no texto, seguidas das palavras ou expressões correspondentes grafadas por extenso. Esta folha deve conter o título (Lista de abreviaturas e siglas), sem indicativo numérico, centralizado.

A abreviatura é a redução gráfica de um nome ou de uma seqüência de nomes, resultando em um outro único nome conciso com o mesmo significado.

É necessário que, antes da primeira aparição no texto de uma abreviação ou sigla, se coloque por extenso o nome ou seqüência de nomes que a originou, colocando o nome abreviado entre parênteses. Em seguida, deve-se usar sempre a sigla ou abreviação. Deve-se evitar, todavia, a utilização de siglas ou abreviaturas nos títulos.

1.14 Lista de símbolos

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com o devido significado. Esta folha deve conter o título (Lista de símbolos), sem indicativo numérico, centralizado.

1.15 Sumário

Esta folha deve conter o título (Sumário), sem indicativo numérico, centralizado e os elementos pré-textuais não devem figurar neste item.

O sumário é a enumeração das principais divisões, seções e outras partes do trabalho, na mesma ordem e grafia em que a matéria nele se sucede, deve ser localizado como o último elemento pré-textual, considerado elemento obrigatório, cujas partes são acompanhadas do(s) respectivo(s) número(s) da(s) página(s).

Exemplo:

12 Aspectos Clínicos da Amebíase..... 45

2 Textuais — Modelo de Tese ou Dissertação com Inclusão de Artigos

2.1 Apresentação

Texto preliminar no início do manuscrito que servirá de preparação aos estudos. Deve conter a caracterização e a relevância do problema (argumentos que estabelecem a legitimidade do estudo científico), a hipótese/pergunta condutora da pesquisa (proposição que visa a fornecer uma explicação verossímil para um conjunto de evidências e que deve estar submetida ao controle da experiência), os objetivos da tese ou da dissertação (finalidades que devem ser atingidas), os métodos adequados para testar as hipóteses. Os objetivos devem ser claramente descritos, com frases curtas e concisas, e as informações sobre os artigos, relacionando com os objetivos e referência ao periódico que será/foi submetido.

Observação: neste item, havendo citação de autores no texto seguir as normas vigentes da ABNT NBR 10520 (Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação).

2.2 Revisão da Literatura (estudo quantitativo) / Referencial Teórico (estudo qualitativo)

A revisão da literatura é um levantamento que focaliza os principais tópicos dos temas a serem abordados. Esta revisão deverá dar subsídios para as hipóteses levantadas pelo autor.

O referencial teórico ancora, explica ou compreende o objeto do estudo sendo construído a partir de uma teoria ou por construtos: “idéias e termos categoriais, princípios condutores, opiniões influentes ou conceitos essenciais adotados, em uma teoria ou área de estudo” (Carvalho, 2003, p.424)². Desta forma esta construção deve articular ao objeto do estudo com alguma teoria ou alguns construtos vindos de uma revisão de literatura.

A revisão da literatura ou o referencial teórico pode ser um capítulo da dissertação ou da tese ou ser um artigo de revisão sobre o tema da tese, submetido ou publicado em revista indexada pelo doutorando ou mestrando, como autor principal. Neste caso, o artigo inserido deve seguir as normas da revista, onde foi publicado ou submetido. Se for o caso, a comprovação da submissão deverá ser incluída no item: anexos.

Neste capítulo deve seguir as normas vigentes da ABNT: referências (Conjunto padronizado de elementos descritivos retirados de um documento, que permite sua identificação individual - NBR 6023) e apresentação de citações (Menção, no texto, de uma informação extraída de outra fonte - NBR 10520). Em caso do artigo de revisão ser submetido ou publicado, seguir as normas de instruções aos autores da revista.

2.3 Métodos (estudo quantitativo) / Caminho Metodológico (estudo qualitativo)

Detalhar o necessário para que o leitor possa reproduzir o estudo, criticar e analisar as soluções encontradas pelo mestrando ou doutorando frente aos problemas surgidos na execução do projeto. A análise dos dados deve ser escrita de modo a permitir a avaliação crítica das opções feitas.

Neste item, quando se tratar de estudo qualitativo a expressão “Métodos” pode ser substituída pelas expressões: “Caminho Metodológico”, “Percurso Metodológico”, entre outras.

² CARVALHO, Vilma de. Sobre construtos epistemológicos nas ciências: uma contribuição para a enfermagem.

Rev. Latino-Am. Enfermagem, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, 2003. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692003000400003&lng=pt&nrm=iso>.

Acesso em: 18 Mar 2008.

2.4 Resultados — Artigos Originais

Neste capítulo deverão ser colocados os artigos originais resultantes do trabalho de Tese ou de Dissertação, tendo como autor principal o aluno da Pós-Graduação. Estes trabalhos deverão ser submetidos ou publicados em revistas científicas indexadas (formatados de acordo com as normas do periódico que foi/será submetido pelo doutorando ou mestrando como autor principal). No caso do doutorando, a comprovação da submissão dos artigos deverá ser incluída no item: anexos.

2.5 Considerações Finais

Neste capítulo devem-se expor as conseqüências das observações realizadas. É o momento de emitir eventuais generalizações. Não deve ser repetições dos resultados, mas sim uma boa síntese deles. Constitui-se de respostas às indagações feitas, isto é, às enunciadas na introdução e detalhadas nos objetivos. O autor deverá se posicionar frente ao problema estudado e poderá incluir recomendações, inclusive discutir novas hipóteses e conseqüentemente novos estudos e experimentos.

3 Pós-textuais

3.1 Referências

Conjunto padronizado de elementos descritivos, retirados de um documento, que permite sua identificação individual. Esta folha, elemento obrigatório, deve conter o título (Referências), sem indicativo numérico, centralizado. As referências são alinhadas à esquerda, devendo seguir as normas da ABNT NBR 6023, exceto as dos capítulos que foram enviados para publicação. Neste item são citadas **apenas** as referências da introdução, dos métodos/procedimento metodológico e da revisão bibliográfica (quando não for um artigo que será submetido a uma Revista indexada). As referências dos artigos estão contempladas nos próprios artigos, conforme as normas de “instruções aos autores”.

3.2 Apêndice

Textos ou documentos elaborados pelo autor da dissertação/tese com a finalidade de complementar sua argumentação, sem prejuízo da unidade nuclear do trabalho. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (**Apêndice**), sem indicativo numérico, centralizado.

O (s) apêndice (s) é identificado por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos apêndices, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.

Exemplo:

APÊNDICE A – Avaliação numérica de células inflamatórias totais aos quatro dias de evolução

APÊNDICE B – Avaliação de células musculares presentes nas caudas em regeneração

3.3 Anexos

Texto ou documento não elaborado pelo autor e que serve de fundamentação, comprovação ou ilustração. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (Anexo), sem indicativo numérico, centralizado.

O (s) anexo (s) é identificado por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos anexos, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.

Exemplo:

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Documentação de encaminhamento do artigo ao periódico

III REGRAS GERAIS DE FORMATAÇÃO

4 Formato

Os textos devem ser apresentados em papel branco, formato A4 (21 cm x 29,7 cm), digitados na frente das folhas, com exceção da folha de rosto cujo verso deve conter a ficha catalográfica, impressos em cor preta, podendo utilizar outras cores somente para as ilustrações.

O projeto gráfico é de responsabilidade do autor do trabalho.

Recomenda-se, para digitação, o texto na cor preta, sendo que as gravuras podem ser cores livres. A fonte Times New Roman, tamanho 12 para todo o texto, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, paginação e legendas das ilustrações e das tabelas que devem ser digitadas em tamanho menor e uniforme.

No caso de citações de outros autores, com mais de três linhas, um recuo de 4 cm da margem esquerda do texto deve ser observado.

O alinhamento para o texto é justificado.

5 Margem

As folhas devem apresentar margem esquerda e superior de 3 cm; direita e inferior de 2 cm.

6 Espacejamento

Todo o texto deve ser digitado ou datilografado com espaço 1,5, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, referências, legendas das ilustrações e das tabelas, ficha catalográfica, natureza do trabalho, objetivo, nome da instituição a que é submetida e área de concentração, que devem ser digitados ou datilografados em espaço simples. As referências, ao final do trabalho, devem ser separadas entre si por dois espaços simples.

Os títulos das seções devem começar na parte superior da mancha e serem separados do texto que os sucede por dois espaços 1,5, entrelinhas. Da mesma forma, os títulos das subseções devem ser separados do texto que os precede e que os sucede por dois espaços 1,5.

Na folha de rosto e na folha de aprovação, a natureza do trabalho, o objetivo, o nome da instituição a que é submetido e a área de concentração devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita.

7 Notas de rodapé

As notas devem ser digitadas dentro das margens, ficando separadas do texto por um espaço simples de entrelinhas e por filete de 3 cm, a partir da margem esquerda.

8 Indicativos de seção

O indicativo numérico de uma seção precede seu título, alinhado à esquerda, separado por um espaço de caractere.

9 Paginação

Todas as folhas do trabalho, a partir da folha de rosto, devem ser contadas sequencialmente, mas não numeradas.

A numeração é colocada, a partir da primeira folha da parte textual, em algarismos arábicos, no canto superior direito da folha, a 2 cm da borda superior, ficando o último algarismo a 2 cm da borda direita da folha. Havendo apêndice e anexo, as suas folhas devem ser numeradas de maneira contínua e sua paginação deve dar seguimento à do texto principal.

10 Numeração progressiva

Para evidenciar a sistematização do conteúdo do trabalho, deve-se adotar a numeração progressiva para as seções do texto. Os títulos das seções primárias, por serem as principais divisões de um texto, devem iniciar em folha distinta. Destacam-se gradativamente os títulos das seções, utilizando-se os recursos de negrito, itálico ou grifo e redondo, caixa alta ou versal, e outro, no sumário e de forma idêntica, no texto.

Recife, 05 de junho de 2008.

Coordenação da Comissão dos Coordenadores dos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / UFPE