



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

ISABELA LEITE ARAÚJO

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DA CITOCINA TH17A E OUTRAS CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM HANSENÍASE**

**Anápolis
2018**

ISABELA LEITE ARAÚJO

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DA CITOCINA TH17A E OUTRAS
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Aplicadas
a Produtos para Saúde da
Universidade Estadual de Goiás
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Aplicadas a
Produtos para Saúde.

Orientador: Dr. Lucas Henrique
Ferreira Sampaio

**Anápolis
2018**

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LIN62 Leite Araújo, Isabela
INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DA CITOCINA TH17A E OUTRAS
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM
HANSENÍASE / Isabela Leite Araújo; orientador Lucas Henrique
Ferreira Sampaio. – Anápolis, 2018.
28 p.


Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) –
Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.


1. Mycobacterium leprae. 2. IL-17. 3. reações hansênicas. I.
Henrique Ferreira Sampaio, Lucas, orient. II. Título.

Isabela Leite Araújo

“Investigação do perfil de citocina Th 17 e outras citocinas pró-inflamatórias em pacientes com hanseníase”

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual^{OP} de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 28 de setembro^{OP} de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores


Prof. Dr. Lucas Henrique Ferreira Sampaio
Presidente da Banca
UEG


Profa. Dra. Thaís Leite Nascimento
Membro Interno
CAPS


Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges

Membro Externo
UEG

Dedico este trabalho aos meus pais, Hélio e Meyre, por todo apoio nesses anos, por acreditarem na minha capacidade e vivenciarem esse sonho ao meu lado. Aos meus irmãos Diogo e Daniela que sempre se alegram das minhas conquistas. Ao Marco Aurélio por todo incentivo, apoio, carinho, amor e paciência. À minha querida tia Regina que foi minha fonte de inspiração. À minha recém-falecida e amada vovó Chiquita, quem eu dividi meu cuidado com o estudo.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento primeiramente a Deus, pois o mestrado não seria possível se não fosse pela vontade D'Ele. Sentir Sua presença, amor e carinho nesses dois anos de estudo foram fundamentais. Pai, obrigada por tudo que me proporcionou.

Aos meus pais, Hélio e Meyre, a confiança que depositaram na minha vontade e capacidade de crescer e buscar o melhor para minha vida foi crucial para a concretização desse sonho. A cada amanhecer e anoitecer, a cada estudo e a cada vitória, vocês sempre estiveram ao meu lado. Tudo que eu sou é fruto do esforço e trabalho de vocês. Essa conquista não é minha, é de vocês. Nada que eu escreva será suficiente para agradecer a dedicação e abdicção que tiveram para a minha felicidade. Obrigada.

Aos meus irmãos Diogo e Daniela que são minha fonte de inspiração e meu exemplo de tenacidade a ser seguida. Agradeço por sempre me apoiarem e vibrarem com minhas conquistas. Ao Marco Aurélio, quem eu descarreguei todo meu cansaço. Nos braços dele encontrei o alívio de todos os problemas. Foi meu refúgio e proteção. Não tenho palavras para agradecer por toda paciência, amor e cuidado comigo nesse período.

Dr. Lucas Sampaio, meu exemplo de professor, pesquisador e humano. A cada orientação a surpresa de uma brilhante capacidade profissional. A cada encontro a descoberta de um ser humano formidável, uma mistura de razão e coração. Professor Lucas me moldou com seu total potencial e destreza. Serei eternamente grata por todo conhecimento repassado e por me fazer acreditar que eu conseguiria. A influência de um bom professor jamais pode ser apagada.

Às professoras Dra Thaís Leite e Dra Patrícia Lima pela colaboração nas melhorias da minha dissertação na banca de qualificação. O toque feminino e delicado de cada conselho foi fundamental para a finalização do mestrado.

Aos meus colegas de mestrado. Os dias foram difíceis, várias horas de estudo juntos e alguns trabalhos desenvolvidos. Inúmeras mensagens de carinho e no final a certeza de que todo esforço valeria a pena.

Aos professores e funcionários do CAPS/ UEG pelo trabalho e competência.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VII
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	VIII
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 MÉTODO(S)	4
3.1 GRUPO DE ESTUDO.....	4
3.1.1 <i>Grupo de pacientes</i>	4
3.1.2 <i>Crítérios de inclusão</i>	4
3.1.3 <i>Crítérios de exclusão</i>	5
3.2 CONSULTA CLÍNICA, ENTREVISTA E COLETA SANGUÍNEA.....	5
3.3 DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE POR ESTÍMULO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO - PBMC	6
3.4 ENSAIO MULTIPLEX DE CITOCINAS	6
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	7
3.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	7
4 RESULTADOS	8
5 DISCUSSÃO	13
6 CONCLUSÕES	17
REFERÊNCIAS	19

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Análise quantitativa de IL-17A com ensaio Multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimuladas com antígeno <i>M. leprae</i> sonicado.....	09
Figura 2. Análise quantitativa de IFN- γ com ensaio Multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimuladas com antígeno <i>M. leprae</i> sonicado.....	10
Figura 3. Análise quantitativa de IL-1 β com ensaio Multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimuladas com antígeno <i>M. leprae</i> sonicado.....	11
Figura 4. Análise quantitativa de IL-12 com ensaio Multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimuladas com antígeno <i>M. leprae</i> sonicado.....	11
Figura 5. Análise quantitativa de IL-4 com ensaio Multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimuladas com antígeno <i>M. leprae</i> sonicado.....	12
Figura 6. Análise quantitativa de IL-10 com ensaio Multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimuladas com antígeno <i>M. leprae</i> sonicado.....	12
Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo com hanseníase e reação hansênica.....	09

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente
- BB - Borderline Borderline
- BL - Borderline Lepromatosa
- BT - Borderline Tuberculoide
- CO₂ - Dióxido de carbono
- CRDT - Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DO - Densidade óptica
- ELISA - *Enzyme – linked immunosorbent assay*
- ENH - Eritema Nodoso Hansênico
- FcR - Receptor Fc
- HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HNP - Hanseníase Neural Pura ou Primária
- IB - Índice Baciloscópico
- IFN- γ – Interferon gama
- IgM - Imunoglobulina M
- IL - Interleucina
- LB - Linfócito B
- LL - Lepromatosa
- LTCD4+ - Linfócitos TCD4+
- LTCD8+ - Linfócitos TCD8+
- M. leprae* - *Mycobacterium leprae*
- MB - Multibacilar
- MDT - Multidrogaterapia
- MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
- MLCS - *M. leprae Cell sonicate* (Sonicado Celular de *M. leprae*)
- NK - Célula *Natural Killer*
- OMS - Organização Mundial da Saúde

PB - Paucibacilar
PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Célula Mononuclear do Sangue Periférico)
PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PGL 1 - *Phenolic glycolipid - I* (Glicolípido Fenólico I)
PQT - Poliquimioterapia
PRR - Receptores de reconhecimento de padrão
RORC - *Retinoic acid related orphan nuclear hormone receptor C*
ROR γ T- Fator de transcrição ROR γ T
RPMI - Meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*
RR - Reação reversa
RT1 - Reação Tipo 1
RT2 - Reação Tipo 2
STAT3 - Fator de transcrição STAT3
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Crescimento e Transformação Beta)
Th1 - Linfócitos T *Helper* tipo 1
Th17 - Linfócitos T *Helper* tipo 17
Th2 - Linfócitos T *Helper* tipo 2
TLR - receptores do tipo Toll-like
TLR1-TLR2 - Receptores do tipo Toll-like 1 e receptores do tipo Toll-like 2
TNF- α -Fator de Necrose Tumoral do tipo α
Treg - Células T reguladoras
TT - Tuberculoide
U - Unidades

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica caracterizada por manifestações dermato-neurológicas. Na hanseníase os pacientes são clinicamente classificados em dois grandes grupos como paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Os pacientes PB apresentam polarização da resposta imune para Th1, com forte resposta celular e destruição do bacilo. Pacientes MB polarizam a resposta imune para linfócitos Th2 com formação de anticorpos, não havendo destruição da bactéria, levando a uma forma descontrolada da doença. As reações hansênicas normalmente surgem após o início da poliquimioterapia (PQT) como resultado de uma resposta imune exacerbada dos indivíduos PB e MB. Essas reações comumente causam danos permanentes nos pacientes e elas classificam-se em Reação Tipo 1 (RT1) ou Reação Reversa (RR) e Reação Tipo 2 (RT2). Outra subpopulação de células TCD4+, Th17, e sua respectiva citocina de assinatura, a IL-17A, podem apresentar resposta relevante na patogenia da hanseníase. Porém, existem poucos estudos que tentam descrever a função da Th17 na hanseníase. Além disso, algumas dessas pesquisas apresentam resultados contraditórios, por isso é importante a realização de novos estudos que tentem elucidar melhor a função das células Th17 na doença de Hansen. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de várias citocinas, especialmente aquelas relacionadas ao padrão imunológico da Th17, em pacientes com hanseníase e reação hansênica. Nossos resultados demonstram que a IL-17, IL-1 β , IL-12 e INF- γ , citocinas pró-inflamatórias, apresentam-se elevadas em pacientes PB e principalmente em indivíduos com RT1 e RT2. Ao contrário dessas, as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 apresentaram-se elevadas em MB e diminuídas em PB, RT1 e RT2. A resposta imune exagerada com potencial lesivo observada nos pacientes com episódios hansênicos pode ser justificada pelo aumento de IL-17A. Esta interleucina é altamente inflamatória, o que leva a um aumento no recrutamento de neutrófilos com conseqüente dano tecidual.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, IL-17, reações hansênicas.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease characterized by dermatoneurological manifestations. Leprosy patients are clinically classified into two large groups as paucibacillary (PB) and multibacillary (MB). PB patients present a polarization of the Th1 immune response, with a strong cellular response and destruction of the bacillus. MB patients polarize the immune response to Th2 lymphocytes with antibody formation, and there is no destruction of the bacterium leading to an uncontrolled form of the disease. Leprosy reactions usually occur after initiation of multidrug therapy (MDT) as a result of an exacerbated immune response of PB and MB individuals. These reactions commonly cause permanent damage to patients. They are classified as Type 1 Reaction (RT1) or Reverse Reaction (RR) and Type 2 Reaction (RT2). Another subpopulation of CD4 + T cells, Th17 and its respective signature cytokine, IL-17A, may present a relevant response in the pathogenesis of leprosy. However, there are few studies attempting to describe the role of Th17 in leprosy. In addition, some of these studies have conflicting results, therefore it is important to carry out new studies that try to better elucidate the function of Th17 cells in Hansen's disease. The objective of this work was to analyze the profile of several cytokines, especially those related to the Th17 immunological pattern, in patients with leprosy and leprosy reaction. Our results demonstrate that inflammatory cytokines, IL-17, IL-1 β , IL-12 and INF- γ , are elevated in PB patients and especially in individuals with RT1 and RT2. In contrast, IL-4 and IL-10 anti-inflammatory cytokines were elevated in MB and decreased in PB, RT1 and RT2. The exaggerated immune response with harmful potential observed in patients with leprosy episodes can be justified by the increase of IL-17A. This interleukin is highly inflammatory which leads to an increase in neutrophil recruitment with consequent tissue damage.

Key-words: *Mycobacterium leprae*, IL-17, leprosy reactions.

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae* e caracterizada por sinais e sintomas dermatoneurológicos com lesões de pele apresentando distúrbios de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa. A doença está associada ao estigma social e à discriminação por parte da sociedade devido à falta de informações básicas como a forma de transmissão, cura, tratamento, sinais e sintomas (RIDLEY, 1955; SCOLLARD, 2005). A hanseníase é uma doença espectral cujas manifestações clínicas dependem da resposta imune do paciente. Pacientes paucibacilares apresentam forte resposta imune celular com formação de granuloma e fraca resposta humoral com a presença de anticorpos. Por outro lado, pacientes multibacilares apresentam resposta imune celular fraca ou ausente e forte resposta humoral (SIELING *et al*, 1993).

Na década de 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a classificação da hanseníase em dois grupos de acordo com o número de lesões: pacientes paucibacilares (PB) e pacientes multibacilares (MB). Sob o ponto de vista clínico, são classificados como PB os pacientes que apresentam de uma a no máximo cinco lesões de pele, em placas, geralmente pequenas, localizadas e bem delimitadas. Já os pacientes MB apresentam mais de cinco lesões de pele espalhadas pelo corpo (WHO, 1994).

Apesar de raramente evoluir para o óbito, durante o curso crônico da doença, podem surgir episódios inflamatórios denominadas reações hansênicas ou episódios reacionais. As reações ocorrem devido à interação do sistema imune do indivíduo com o *M. leprae* e podem se desenvolver antes, durante ou após o início do tratamento farmacológico. As reações hansênicas são classificadas em Reação Tipo 1 (RT1) ou Reversa (RR) e Reação Tipo 2 (RT2), geralmente com manifestação clínica de Eritema Nodoso Hansênico (ENH). As reações hansênicas são as piores complicações clínicas que o paciente pode apresentar. Tanto a hanseníase

quanto as reações hansênicas possuem tratamento e podem evoluir para cura (SCOLLARD, 2006).

Recentemente tem sido descrito em diversas patologias um subtipo de linfócito TCD4+, a célula Th17 (SAKAGUCHI, 2004). Este linfócito é responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-17A (IL-17A), interleucina-17F (IL-17F) e interleucina-22 (IL-22) produzidas em diversos processos patológicos. O aumento dessas citocinas pode contribuir para a inflamação das lesões e destruição tecidual (EISENSTEIN & WILLIAMS, 2009; TORRADO & COOPER, 2010). A descoberta das células Th17 permite a realização de novos estudos afim de se analisar a influência dessas células na imunopatogenia das doenças (SANTOS *et al.*, 2017; SAINI *et al.*, 2016; NEGERA *et al.*, 2017).

A pesquisa acerca da resposta imune celular do paciente contra o bacilo do *Mycobacterium leprae* é de suma importância para o conhecimento da imunopatogenia da hanseníase. Vários estudos caracterizam as células Th17 e as citocinas produzidas por esses linfócitos em resposta à hanseníase (ALMEIDA-NETO *et al.*, 2014; SAINI *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; SAINI *et al.*, 2017). No entanto, ainda não existe um consenso sobre a real função dessas citocinas nas diferentes formas clínicas da hanseníase e nas reações hansênicas. Por isso é importante a realização de estudos que tentem explicar a função dessas células na doença.

2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil das principais citocinas relacionadas ao padrão imunológico, incluindo as da célula Th17 na hanseníase.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as principais citocinas pró-inflamatórias nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas, produzidas em resposta ao antígeno bruto do *M. leprae*;
- Verificar a produção de citocinas específicas das células Th17 nos pacientes com hanseníase e reações hansênicas;
- Comparar as respostas de citocinas nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas;
- Analisar o perfil das citocinas pró-inflamatórias nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas;

3.1 Grupo de estudo

3.1.1 Grupo de pacientes

Para a análise do número de citocinas no sangue periférico foram recrutados quatro grupos de estudo, sendo que a distribuição do sexo dos pacientes foram escolhidos ao acaso:

Os grupos 1 e 2 eram constituídos por pacientes com hanseníase PB (n=10) e MB (n=10), respectivamente. O recrutamento desses pacientes foi realizado no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica (CRDT) e no Hospital Anuar Auad, Goiânia, Goiás, Brasil, no período compreendido entre janeiro e dezembro de 2016.

Os grupos 3 e 4 foram compostos por pacientes com reação RT1 e RT2, respectivamente, com n=10 em cada grupo. Todos os pacientes RT1 e RT2 foram submetidos a exames dermatoneurológicos e classificados por um dermatologista com experiência em diagnóstico de hanseníase. O recrutamento de pacientes com reação foi realizado em Unidades Básicas de Saúde e Terapêutica e no Hospital Anuar Auad, Goiânia, Goiás, Brasil, no período compreendido entre fevereiro e dezembro de 2016. Todos os pacientes com reação estavam em multidrogaterapia (MDT). As amostras foram coletadas durante a ocorrência do episódio reacional.

3.1.2 Critérios de inclusão

Grupo 1 (PB): Pacientes paucibacilares classificados como TT e BT, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley & Jopling (1966). Foram recrutados para este estudo pacientes com hanseníase PB recém-diagnosticados e virgens de tratamento específico para hanseníase.

Grupo 2 (MB): Pacientes multibacilares, classificados como BB, BL, ou LL, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley & Jopling

(1966). Foram recrutados para este estudo pacientes com hanseníase MB recém-diagnosticados e virgens de tratamento específico para hanseníase.

Grupos 3 (RT1): Indivíduos com episódio reacional tipo 1, classificados segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley (1969). Foram recrutados para este estudo pacientes com reação hansênica tipo 1, durante tratamento com MDT.

Grupo 4 (RT2): Indivíduos com episódio reacional tipo 2, classificados segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley (1969). Foram recrutados para este estudo pacientes com reação hansênica tipo 2, durante tratamento com MDT.

3.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com hanseníase classificados com a forma indeterminada ou neural pura; indivíduos com sorologia sabidamente positiva para HIV; gestantes e pacientes com idade inferior a dezoito anos.

3.2 Consulta clínica, entrevista e coleta sanguínea

Todos os pacientes com hanseníase foram submetidos à avaliação dermatoneurológica e testes de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa. Os testes de sensibilidade e a avaliação dermatoneurológica foram realizados por um dermatologista com comprovada experiência em diagnóstico clínico de hanseníase.

Após a avaliação clínica e explicação sobre estudo, os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário padronizado para a obtenção de dados sócio-demográficos. Em seguida realizou-se a coleta de sangue por punção venosa em tubos secos (BD Vacutainer® - Franklin Lakes, NJ, USA) e em tubos com heparina (BD Vacutainer® - Franklin Lakes, NJ, USA).

3.3 Determinação da reatividade por estímulo de células mononucleares de sangue periférico - PBMC

Culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram preparadas a partir de sangue venoso total heparinizado não diluído. Para a separação das PBMC, o sangue total foi diluído em solução salina 0,9% estéril (1:2) em seguida pipetado cuidadosamente em 3 vezes o volume em solução de FicollPaque™ (AmershamBiosciences) sendo posteriormente centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos a 4 °C formando assim uma interface entre os líquidos (anel branco), em que foi coletado o anel leucocitário usando pipeta pasteur. Após a transferência para um novo tubo de poliestireno foi adicionado salina 0,9 %, e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C. As PBMC foram, então, ressuspensas em RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 50000 U de penicilina/estreptomicina (BioWhittaker, Walkerville, MD) e 10 % de soro humano inativado pelo calor (Valley Biomedical Inc., Winchester, VA) e 2×10^5 células foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços (200 µl volume total por poço - Corning Inc., Corning, NY) e estimuladas com antígeno da parede do *M. leprae* sonicado (MLCS). Após 3 dias de incubação a 37 °C, 5 % CO₂, então ~ 100µl de sobrenadante foram recolhidos e armazenados a – 20 °C até realização de ensaios da análise multiplex de citocinas. Para cada ensaio, as estimulações foram conduzidas com 1 ml de MLCS a uma concentração de 10 µg/ml.

3.4 Ensaio Multiplex de citocinas

O plasma proveniente do ensaio de PBMC estimulado individualmente com as proteínas brutas do *M. leprae* foi utilizado para dosar em pg/ml a concentração de seis citocinas: IL-1β, IL-12, IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17A. Estas citocinas foram dosadas mediante tecnologia Multiplex usando kit customizado produzido pela Bio-Plex Pro™ Human Th17 Cytokine Panel Plex, Fremont, CA, em aparelho Luminex 100® (Bio Rad, Hercules, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Neste ensaio o limite de detecção de cada citocina é de 1pg/ml.

3.5 Análise estatística

O software *GraphPad Prism v.7* foi utilizado para o cálculo da mediana e valores médios de DO e para realização dos gráficos *box plot*. A significância estatística foi avaliada pela análise de Kruskal-Wallis para comparação de grupos múltiplos e Mann-Whitney U para comparação entre dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando valores de $p < 0,05$ foram obtidos.

3.6 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas (CEP)/UFG e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (protocolo #12962). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo e os procedimentos envolvidos e, em seguida, foram incluídos somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, com as alterações 466/2012 e 510/2016.

4 RESULTADOS

O presente estudo avaliou um total de 40 participantes (Tabela 1). Desses, 20 eram portadores de formas polares da hanseníase e 20 de reações hansênicas. Dos 40 pacientes que participaram dos grupos de estudo, 19 (47,5%) eram do sexo feminino e 21 (52,5%) do sexo masculino.

O grupo PB foi constituído por quatro pacientes do sexo masculino e seis do sexo feminino. O grupo MB foi constituído por quatro indivíduos do sexo masculino e seis do sexo feminino. O grupo RT1 foi composto por 10 pacientes, sendo cinco de cada sexo. Já para o grupo RT2 foram recrutados seis homens e quatro mulheres. A idade variou de 18 a 86 anos nos grupos de estudo com média de 49,7 (\pm 15,7). A diferença entre essas médias não se mostrou significativa ($p = 0,2505$). As medianas de idade dos grupos de estudo distribuídos de acordo com o diagnóstico clínico foram: PB 36,8 (variação de 19 a 78 anos); MB 38,0 (variação de 18 a 81 anos); RT1 37,1 (variação de 18 a 77 anos); RT2 37,5 (variação de 19 a 86 anos). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas de idade para os grupos, com $p = 0,6873$.

No grupo dos pacientes com hanseníase PB, todos apresentaram baciloscopia negativa, sendo sete classificados como forma BT e três classificados como TT, segundo critérios de Ridley-Jopling. Para o grupo de pacientes com hanseníase MB a mediana do índice baciloscópico foi 2,1. Sete indivíduos foram classificados como forma BL e três como LL, segundo critérios de Ridley-Jopling. A mediana do índice baciloscópico no grupo RT1 foi igual a 0,5 (variação de 0 a 2) e no grupo RT2 de 2,1 (variação de 0,5 a 3,0). Do grupo RT1, dois foram classificados como BL, um paciente BB e 7 indivíduos BT. Em RT2, cinco foram classificados como LL e cinco indivíduos classificados como BL.

Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo com hanseníase e reação hansênica.

	Nº de pacientes	Média de Idade	Sexo		
			F/M	IB	Ridley-Jopling
PB	10	36,8 (18-63)	6/4	Negativo	7 BT / 3 TT
MB	10	38 (19-78)	6/4	2,1 (0,5-3)	7 BL / 3 LL
RT1	10	37,1 (19-65)	5/5	0,5 (0-2)	2 BL / 1 BB / 7 BT
RT2	10	37,5 (20-76)	4/6	2,1 (0,5-3)	5 LL / 5 BL

F - feminino; M - masculino; PB – paucibacilar; MB – multibacilar; TT - forma tuberculóide; BT- forma borderline-tuberculóide; BB - forma borderline-borderline; BL - forma borderline-lepromatosa; LL - forma lepromatosa; IB – índice baciloscópico; n.a.- não aplicável. A idade e o índice baciloscópico estão expressos em mediana (mínimo-máximo).

As análises multiplex de citocinas mostram que os pacientes PB apresentaram maior resposta de IL-17A que os pacientes MB, com uma média de 37,44 pg/ml para PB e 27,93 pg/ml em MB. No entanto, os pacientes com RT1 e RT2 apresentaram valores significativamente maiores que pacientes PB e MB, com uma média de 50,58 pg/ml e 49,68 pg/ml, respectivamente. A análise de IL-17A entre os pacientes PB, RT1 e RT2 foi estatisticamente significativa com $p=0,0245$ e $p=0,0155$, respectivamente. A resposta de IL-17A do grupo MB comparada com a dos pacientes com RT1 e RT2 também foi estatisticamente significativa com $p=0,0003$ e $p=0,0001$, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre RT1 e RT2. Os resultados de IL-17A estão apresentados na Figura 1.

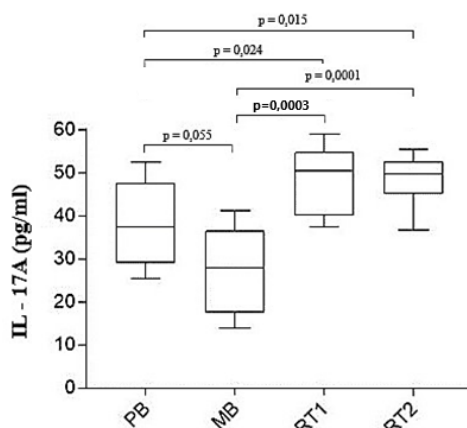


Figura 1: Análise quantitativa de IL-17A com ensaio multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimulada com antígeno de *M. leprae* sonicado. n=10; PB- Paucibacilar; MB-Multibacilar; RT1-Reação Tipo 1; RT2- Reação Tipo 2; IL-17A - Interleucina 17A.

As análises de IFN- γ mostram que o grupo de pacientes com maior resposta foi o RT1, com média de 69,6 pg/ml. A resposta de IFN- γ dos pacientes RT1 foi significativamente maior que os pacientes RT2 e MB, ambos com $p < 0,0001$. O segundo grupo com maior resposta de IFN- γ foi o PB, com média de 60,4 pg/ml. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre RT1 e PB. Porém a resposta do grupo PB foi significativamente maior que a de pacientes MB e RT2 ($p < 0,0001$ e $p = 0,0095$, respectivamente). Os resultados de IFN- γ estão apresentados na Figura 2.

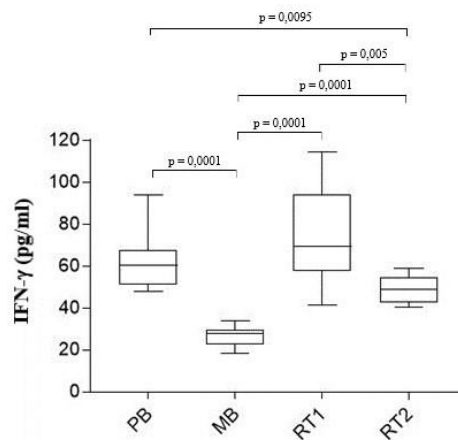


Figura 2: Análise quantitativa de IFN- γ com ensaio multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimulada com antígeno de *M. leprae* sonicado. n=10; PB- Paucibacilar; MB-Multibacilar; RT1-Reação Tipo 1; RT2- Reação Tipo 2; IFN- γ – Interferon gama.

As análises de citocinas IL-1 β mostram que os valores foram significativamente maiores nos pacientes PB, com uma média de 48,45 pg/ml, quando comparados com MB, com $p = 0,0011$. A resposta de IL-1 β nos pacientes PB foi significativamente maior que em RT2 e RT1, com $p = 0,0005$ e $0,0002$, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa estatística entre os pacientes MB, RT1 e RT2. Os resultados de IL-1 β estão apresentados na Figura 3.

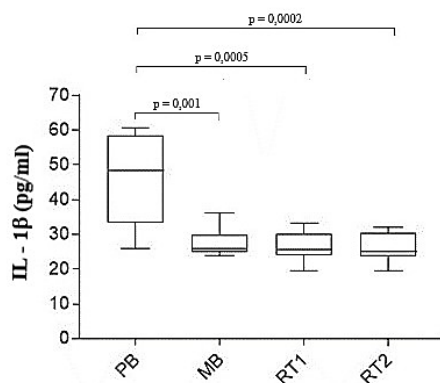


Figura 3: Análise quantitativa de IL-1 β com ensaio multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimulada com antígeno de *M. leprae* sonicado. n=10; PB- Paucibacilar; MB-Multibacilar; RT1-Reação Tipo 1; RT2- Reação Tipo 2; IL-1 β – Interleucina 1 β .

As análises de IL-12 mostraram valores maiores nos pacientes PB com uma média de 39,03 pg/ml quando comparados com MB. Os valores entre PB e MB foram diferentes estatisticamente, com $p=0,0001$. A dosagem de IL-12 nos pacientes PB obteve um valor aproximado do grupo de pacientes com RT1, este último com uma média de 41,91 pg/ml. Os valores de IL-12 entre os grupos PB e RT1 não foram estatisticamente diferentes. Os resultados de IL-12 estão apresentados na Figura 4.

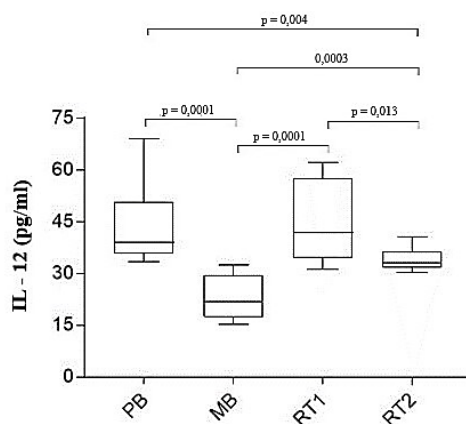


Figura 4: Análise quantitativa de IL-12 com ensaio multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimulada com antígeno de *M. leprae* sonicado. n=10; PB- Paucibacilar; MB-Multibacilar; RT1-Reação Tipo 1; RT2- Reação Tipo 2; IL-12- Interleucina 12.

Analisando a resposta de citocina IL-4, verificou-se um valor significativamente maior nos pacientes MB, com uma média de 59,13 pg/ml, quando comparados com pacientes PB, com $p=0,0001$. A resposta de IL-4 nos pacientes com RT2 e RT1 foi significativamente menor que MB, ambos

com $p=0,0001$. Não foi observado diferença significativa entre os pacientes PB, RT1 e RT2. Os resultados de IL-4 estão apresentados na Figura 5.

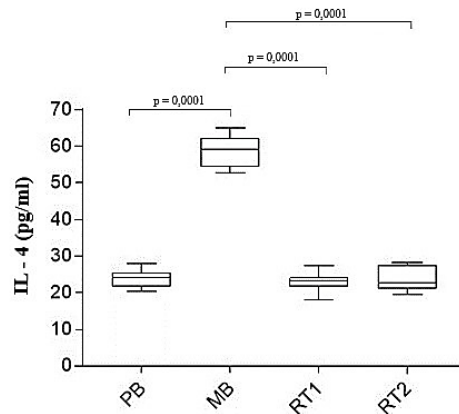


Figura 5: Análise quantitativa de IL-4 com ensaio multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimulada com antígeno de *M. leprae* sonicado. $n=10$; PB- Paucibacilar; MB-Multibacilar; RT1-Reação Tipo 1; RT2- Reação Tipo 2; IL-4- Interleucina 4.

A resposta de IL-10 em pacientes MB e PB foi semelhante. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos MB e PB. Os valores de PB são notadamente maiores que pacientes com RT1 e RT2, ambos com $p=0,0001$. Pacientes MB também apresentaram valores de IL-10 superiores ao grupo de RT1 e RT2, ambos com $p=0,0001$. Os resultados entre RT1 e RT2 foram diferentes estatisticamente com $p=0,0011$. Os resultados de IL-10 estão apresentados na Figura 6.

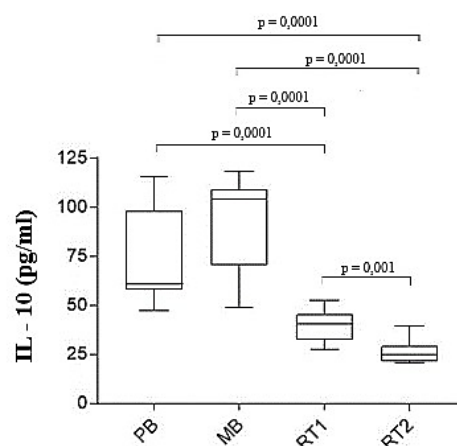


Figura 6: Análise quantitativa de IL-10 com ensaio multiplex de citocinas após cultura de PBMC estimulada com antígeno de *M. leprae* sonicado. $n=10$; PB- Paucibacilar; MB-Multibacilar; RT1-Reação Tipo 1; RT2- Reação Tipo 2; IL-10- Interleucina 10.

Esse estudo foi realizado com a finalidade de compreender a resposta de citocinas das células Th17 nas formas clínicas da hanseníase e reações hansênicas. A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória que induz uma inflamação rica em neutrófilos e estimula a produção de substâncias antimicrobianas. Os resultados mostram que os grupos RT1 e RT2 apresentaram valores de IL-17A maiores quando comparados com pacientes PB e MB que não apresentam reação. Comparando os grupos, verifica-se que os valores de IL-17A em RT1 são significativamente maiores que PB e os valores dessa citocina em RT2 são maiores que MB. Este estudo está em conformidade com outras pesquisas em relação ao aumento de IL-17A nos pacientes com episódios hansênicos. O estudo de Saini *et al.*, (2016) mostrou níveis aumentados dessa interleucina em pacientes com RR e ENL quando comparados com PB e MB, respectivamente. Ainda assim, os pacientes MB apresentaram os mais baixos níveis de IL-17A em comparação com os outros grupos. O mesmo pôde ser verificado neste estudo. As reações hansênicas são episódios de agudização e piora da hanseníase. Elas sempre causam maiores danos teciduais, levando ao aparecimento de deficiências, deformidades e desabilitações permanentes. Nos episódios reacionais ocorre uma exacerbação da resposta imune que culmina na lesão tecidual do próprio indivíduo. Acreditamos que esse aumento da IL-17A seja um dos principais responsáveis por essa resposta imune exacerbada, com potencial lesivo, que comumente causa os danos permanentes observados nos pacientes com RT1 e RT2. Almeida-Neto *et al.*, (2014) acreditam que a produção excessiva de IL-17 pode levar ao aumento no recrutamento de neutrófilos com consequente danos teciduais. Compreendemos ainda que o aumento da IL-17A nos pacientes com reações hansênicas seja ocasionado pela PQT, que expõe novos antígenos após a destruição total do bacilo do *M. leprae* (MANANDHAR *et al.*, 1999).

Os grupos com maior produção de IFN- γ foram os pacientes PB e RT1. Estes resultados suportam o que já está amplamente descrito na literatura (MODLIN & BLOOM, 1993; SIELING *et al.*, 1994; MORAES *et al.*, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2012). Também observamos um aumento significativo na dosagem de IFN- γ nos pacientes com RT2, quando comparado com MB. Isso sugere que esses pacientes MB começaram a produzir IFN- γ uma citocina pró-inflamatória que ativa os macrófagos, permitindo a fagocitose e destruição do bacilo. O aumento de IFN- γ nos pacientes PB, quando comparados aos pacientes com RT1, não foi significativo. Pacientes paucibacilares já produzem IFN- γ por terem resposta imune celular Th1, antes de entrarem em episódio reacional. O IFN- γ tende a aumentar após o tratamento com a PQT, que destrói a bactéria expondo novos antígenos que estimulam uma resposta inflamatória, não existente antes do tratamento. Scollard *et al.* (2006) relataram que RT1 é o aumento da resposta de imune celular já existente. Devido a isso é que a dosagem de IFN- γ apresenta-se maior em RT1 quando comparado com RT2, pois é uma resposta que existe previamente ao surgimento do episódio reacional.

A IL-12 é uma citocina presente na diferenciação da resposta imune Th1 (KRUTZIK *et al.*, 2003; KRUTZIK *et al.*, 2005). A partir do gráfico dessa citocina, verificamos uma resposta elevada em pacientes PB e RT1 quando comparados com MB e RT2, respectivamente. Corroborando com nossos achados, o estudo de Santos *et al.* (2017) apresentou dosagem de IL-12 em PB superior ao apresentado nos pacientes MB. Acreditamos que a dosagem elevada de IL-12 em PB seja justificada pela resposta Th1 presente nesses pacientes. Verificamos ainda que não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem de IL-12 entre os grupos PB e RT1. Compreendemos que os pacientes RT1 são indivíduos PB em reação hansênica e sendo assim apresentam uma resposta celular Th1 previamente formada com a presença de citocina IL-12. O discreto aumento de IL-12 nos pacientes RT2 quando comparamos com MB é notadamente justificado pelo fato de pacientes RT2 apresentarem uma forte resposta de Th1.

Nas análises de IL-1 β notamos que os valores para PB estão significativamente maiores comparando com pacientes MB, RT1 e RT2.

Esse achado corrobora com estudo de Santos *et al.*, 2017, que sugere que IL-1 β está associado à clínica dos pacientes PB, indicando que essa citocina colabora para o controle da proliferação do *M. leprae*.

As dosagens de IL-10 mostraram níveis substancialmente baixos em pacientes com RT1 e RT2 em comparação com PB e MB. Os multibacilares apresentaram uma mediana significativamente maior que PB. A IL-10 é uma citocina que está envolvida na produção e na função de linfócitos T reguladores da resposta imune (células Treg), apresentando como efeito biológico a inibição de macrófagos ativados e células dendríticas (ABBAS & LICHTMAN, 2015). Isto justifica o fato da interleucina 10 se apresentar aumentada nos indivíduos MB. Acreditamos que a RT1 é resultado de uma resposta exacerbada de citocinas pró-inflamatórias de pacientes PB. Portanto compreendemos que a baixa produção de IL-10 em pacientes RT1 e RT2 era esperada, tendo em vista a resposta altamente inflamatória observada nesses pacientes.

Nas análises de IL-4 notamos uma resposta significativamente aumentada da citocina em pacientes MB quando comparado aos outros grupos da pesquisa. A IL-4 é a principal citocina presente na resposta imune do tipo Th2, ou seja, resposta clássica dos pacientes MB. Essa resposta Th2 é pobre em resposta imune celular e por isso possibilita a sobrevivência e proliferação do bacilo (MODLIN & BLOOM, 1993; SIELING *et al.*, 1993). Verificamos que os níveis de IL-4 estão reduzidos em RT1 e RT2, já que essa é uma citocina que suprime a via clássica de ativação do macrófago, inibindo a defesa contra o microrganismo intracelular. Como os pacientes PB apresentam resposta Th1, estes pacientes apresentam baixos níveis de IL-4 como observamos nas análises.

A nossa pesquisa mostra um desequilíbrio entre os valores de IL-10 (envolvida na resposta de Treg) e IL-17A nos pacientes com reações hansênicas. Sadhu *et al.* (2016) relataram que o controle da proliferação e manifestação do *M. leprae* é devido ao equilíbrio da ação de células Treg e células Th17. Confirmando os achados desta pesquisa, Saini *et al.* (2016) mostraram que as reações hansênicas apresentam um desequilíbrio entre as células Th17 e Treg. Neste estudo verificamos que dosagens altas de IL-10 nos pacientes MB foram associadas a valores baixos de IL-17A. Isso

também pôde ser relacionado com o aumento de IL-17A e redução de IL-10 nos pacientes com episódios hansênicos. O estudo de Attia *et al.* (2014) corrobora com nossos achados. Eles acreditam ainda que a grande quantidade de IL-10 e a deficiência na produção de IL-17A podem contribuir para o desenvolvimento da hanseníase e ainda levar à progressão da doença para MB. Saini *et al.* (2016) também demonstraram que a redução da atividade de Treg está associada com uma maior atividade das células Th17. Acreditamos que o desequilíbrio nas respostas de IL-10 (Treg) e IL-17 leva ao surgimento dos episódios hansênicos.

Observamos uma resposta semelhante de IL-12 quando comparamos as análises de IL-17 e IFN- γ . A IL-12 é uma citocina presente na diferenciação e produção de IFN- γ , e isso confirmamos com nossos achados, já que ambos estão aumentados em RT1. O estudo de Tarique *et al.* (2017) mostrou uma resposta de IL-17 em pacientes PB e MB quando em estímulo com a IL-12. Os dados desse estudo confirmam o aumento de IL-17 na presença de IL-12 em pacientes PB (BT), comprovando a veracidade das análises. Com esses dados, confirmamos o que já traz a literatura, a presença de resposta Th1 em pacientes PB e RT1. Ainda assim, o aumento na dosagem dessas citocinas nos pacientes RT2 quando comparados com MB, confirmando que pacientes com RT2 passam a desenvolver resposta Th1.

Comparando as dosagens de IL-4, IL-10 e IL-12, nota-se que há um aumento das citocinas IL-4 e IL-10 em pacientes MB e há uma baixa dosagem de IL-12 nesse mesmo grupo. Isso é confirmado pelo estudo de Sieling *et al.* (1994) que mostram que a IL-12 é regulada negativamente pela presença das citocinas IL-4 e IL-10 presentes em grande quantidade em pacientes MB. Além disso, os autores (FONSECA *et al.*, 2017; KRUTZIK *et al.*, 2003; KRUTZIK *et al.*, 2005) mostraram que a IL-12 tem um papel importante na polarização de célula Th1, contrapondo a polarização de IL-4 para Th2. Por este motivo acreditamos que IL-12 encontra-se aumentada neste estudo em pacientes PB que apresentam resposta Th1.

6 CONCLUSÕES

O nosso estudo mostrou o perfil de seis citocinas relacionadas à resposta de Th17 na hanseníase. O aumento de citocinas IL-17A, IFN- γ , IL-12 e IL-1 β demonstram seu papel inflamatório na doença. Contrapondo a isso, confirmamos o que já está descrito na literatura, a função reguladora da resposta imune das citocinas IL-4 e IL-10. O aumento de IL-17A nos pacientes RT1 e RT2 levou-nos a conclusão de que esta elevação está relacionada com o surgimento de episódios reacionais. Acreditamos que essa expansão de IL-17A dá-se pela exposição de novos antígenos, após a destruição total da bactéria. Além de uma resposta exagerada de IL-17A nos pacientes com RT1 e RT2, verificamos que o surgimento dessas reações relaciona-se também ao desequilíbrio entre o aumento de IL-17A e a diminuição de IL-10. Os pacientes RT2 apresentaram também um aumento significativo de IFN- γ . Isso faz-nos compreender que os indivíduos com RT2 são pacientes MB que passaram a apresentar uma resposta imune do tipo Th1, produzindo então IFN- γ . Esta citocina ativa os macrófagos para realizarem fagocitose e destruição do bacilo, atividades estas que são falhas em pacientes multibacilares não reacionais.

A caracterização das citocinas na hanseníase faz-se necessário para a correta classificação das reações hansênicas e na identificação da clínica dos pacientes. Estes apresentam uma gama de citocinas pró e anti-inflamatórias que podem manifestar aumentadas e/ou diminuídas a depender dos vários estágios da hanseníase. Com a determinação das citocinas torna-se possível interferir no estadiamento da doença, bem como definir um padrão de farmacoterapia nas reações hansênicas e na clínica dos pacientes. É possível, em um futuro próximo, o desenvolvimento de terapêuticas imunômicas pela manipulação das citocinas, como já é realizado em outras patologias. Caso seja confirmado que a IL-17 realmente se confirme como principal responsável pelas reações hansênicas, inibidores desta citocina, como anticorpo monoclonal secukimab, poderiam substituir

os corticoides e a talidomida, já que estes são fármacos que apresentam enormes efeitos adversos nos pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABDALLAH, M. et al. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-regs cells. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 10, 2014.

ADHE, V.; DONGRE, A.; KHOPKAR, U. A retrospective analysis of histopathology of 64 cases of leprosy reactions. **Indian Journal of Dermatology**, v. 57, n. 2, 2012.

ALMEIDA-NETO, F. B. et al. TH17 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. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 7, 2014.

ANDERSSON, J. O.; ANDERSSON, S. G. Insights into the evolutionary process of genome degradation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 9, n. 6, p. 664-671, 1999.

ANDRADE, A. R. C.; LEHMAN, L. F.; SCHREUDER, P. A.M. **Como reconhecer e tratar reações hansênicas**. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte; 2005.

ATTIA, E. A. et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 1152-1158, 2010.

ATTIA, E. A. et al. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 9, 2014.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, L. **Dermatologia**, 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BAKKER, M. I. et al. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 1329-1336, 2004.

BARNES, P. F. et al. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, 1992.

BASOMBRIO, G. et al. Experience with T.B. 1-698 in the treatment of Leprosy. **Diagnostic Medicine**, v. 25, n.1, 1953.

BATISTA, M. D. et al. Leprosy Reversal Reaction as Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Patients with AIDS. **Brief Report**, v. 46, 2008.

BECCX-BLEUMINK, M.; BERHE, D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases.**, v. 60, n. 2, 1992.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.; Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase**; Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Brasília, DF, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, 8. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**, vol. Único. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Taxa de prevalência da hanseníase**, estados, Brasil, 2015.

BRATSCHI, M.W. et al. Current knowledge on Mycobacterium leprae transmission: a systematic literature review. **Leprosy Review**, v. 86, n. 2, p. 142-55, 2015.

BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on Mycobacterium leprae transmission: a systematic literature review. **Leprosy Review**, v. 86, n. 2, p. 142-155. 2015.

BRITTON, W. J; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **The Lancet**, v. 363. 2004.

BÜHRER-SÉKULA, S. PGL-I leprosy serology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, 2008.

CHO, S. N. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1077-83, 1983.

- COCITO, C.; DELVILLE, J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. **European Journal of Epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 202-231. 1985.
- COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 6823, n. 409, p. 1007-1011. 2001.
- COUTO DAL SECCO, R. G. et al. A synopsis of the history of Hansen's disease. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 167, n. 1. 2017.
- DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 131-203. 1998.
- DEENICK, E.K; TANGYE, S.G. IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 503-555, 2007.
- DUNCAN, M. E. et al. The placenta in Leprosy. **Plac.** v. 5, p. 189-198. 1984.
- DUTHIE, M. S; BALAGONS, M. F. Combination chemoprophylaxis and immunoprophylaxis in reducing the incidence of leprosy. **Risk Management and Healthcare Policy**, v. 09, p. 4353. 2016.
- DUTHIE, S. M. et al. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 233-239. 2014.
- DUTHIE, M. S. et al. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3267 – 3275. 2016.
- EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 104, n. 7, p. 554-563, 2013.
- EISENSTEIN, E.M.; WILLIAMS, C. B. The T (reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. **Pediatric Research**, v. 65, p. 26-31, 2009.
- FLEURY, R. N. Critérios para o emprego da classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica. **Hansen International**, v. 31, p. 47-51, 2006.
- FONSECA, A. B. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, 2017.
- FREITAS, A. A. et al. Application of *Mycobacterium leprae*-specific cellular and serological tests for the differential diagnosis of leprosy from confounding dermatoses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 163-168, Jul. 2016.
- GALLO, M. E. N.; OLIVEIRA, M. L. W. Recidivas e Reinfecção em Hanseníase. **Medicine**, v. 30, n. 3, p. 351-357, 1997.

GARBINO, J. A. et al. Association between neuropathic pain and A-waves in leprosy patients with type 1 and 2 reactions. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 28, n. 3, 2011.

GARG, R.; DEHRAN, M.; Leprosy: a precipitating factor for complex regional pain syndrom. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 76, n. 9, 2010.

GHORPADE, A. Ornamental tattoos and skin lesions. Tattoo inoculation borderline tuberculoid leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 1, 2009.

GOULART, I. M. et al. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Archives of Dermatology**, v. 6, p. 267-271, 2007.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, 2002.

GROSSET, J.H; GUELPA-LAURAS, C.C; BOBIN, P. Study of 39 documented relapses of multibacillary leprosy after treatment with rifampin. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 57, n. 3, p. 607–614. 1989.

GRZYBOWSKI, A; KLUXEN, G; PÓTORAK, K. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841–1912) – 100 years anniversary tribute. **Acta Ophthalmologica**, v. 92, n. 3, 2013.

HARRINGTON, L.E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1123-1132, 2005.

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

JOB, C. K.; GUDE, S.; MACADEN, V. P. Erythema nodosum leprosum: A clinico-pathologic study. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 32, 1964.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518-521, 2008.

JOPLING, W. H. Reactions in leprosy. **Leprosy Review**, v. 41, p. 62-66, 1970.

JOPLING, W. H.; MC DOUGALL, A.C. **A doença. In: Manual de hanseníase**, 4^o ed, Atheneu. Editora, São Paulo, 1991.

KAHAWITA, I. P.; LOCKWOOD, D. N. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, 2008.

KAMATH, S.; VACCARO, S. A.; REA, T. H.; OCHOA, M. T. Recognizing and managing the immunologic reactions in Leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 4, 2014.

KIMURA, A; NAKA, T; KISHIMOTO, T. IL-6-dependent and independent pathway in the development of interleukin 17-producing T helper cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 104, p. 12099-12104, 2007.

KROMANN, N.P; WILHIELMSEN, R; STAHL, D. The Dapsone syndrome. **Archives of Dermatology**, v. 118, p. 531-532. 1982.

KRUTZIK, P. O.; CLUTTER, M. R.; NOLAN, G. P. Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 2357-2365, 2005.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, p. 525–532, 2003.

KUMAR, B.; DOGRA, S; KAUR, I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 2, 2004.

LAFERTE, J. et al. Ultramicro-ELISA for the detection of IgM antibodies anti *M. leprae*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.**, v. 33, n. 6, 1991.

LEGENDRE, D. P.; MUZNY, C. A.; SWIATLO, E. Hansen's disease (Leprosy): current and future pharmacotherapy and treatment of disease-related immunologic reactions. **Pharmacotherapy**, v. 32, n. 1, 2012.

LOWE, C; BRETT, S. J; REES, R. J. Adoptive cell transfer of resistance to *Mycobacterium leprae* infections in mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 61, n. 2. 1985.

LUCAS, S. **Bacterial diseases: Lever's histopathology of the skin.** 9^a ed. Philadelphia: Lippincott, p. 575, 2005.

MABALAY, M. C.; HELWIG, E. B.; TOLENTINO, J. G.; BINFORD, C. H. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 33, 1965.

MANANDHAR, R.; LEMASTER, J. W.; ROCHE, P.W. Risk factors for erythema nodosum leprosum. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 67, n. 3, 1999.

MANGAN, P.R; HARRINGTON, L.E; O'QUINN, D.B. Transforming growth factor- induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 4, 2006.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n 44, p. 3154-3159, 2006.

- MARTINS, A.C. et al. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 5, 2010.
- MAURUS, J. N. Hansen's disease in pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 52, n. 1, 1978.
- MENDONÇA, V. A. et al. Analysis of chemokine receptors on the surface of circulating leukocytes of individuals infected with Mycobacterium leprae: preliminary results. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 98, p. 95-98, 2008.
- MERLE, C. S.; CUNHA, S. S.; RODRIGUES, L. C. BCG Vaccination and Leprosy Protection: Review of Current Evidence and Status of BCG in Leprosy Control. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 209-22, 2010.
- MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R.; Immune Regulation: Learning from Leprosy. **Hospital Practice**, v. 28, n. 11, 1993.
- MODLIN, R. L. et al. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 2831-34, 1986.
- MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v. 77, p. 189-202, 2006.
- MORAES, M. O. et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 50, n. 5, 1999.
- MORAES, M. O. et al. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 6, 2000.
- NATH, I. et al. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. **Leprosy Review**, v. 71, 2000.
- NEGERA, E.; WALKER, S.L; BOBOSHA, K; HOWE, R; ASEFFA, A; T-cell regulation in Erythema Nodosum Leprosum. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, 2017.
- NERY, J. A. C.; VIEIRA, L. M.; DE MATOS, H. J.; GALLO, M. E.; SARNO, E. M. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 363-370, 1998.
- NERY, J. A; BERNARDES FILHO, F.; QUINTANILHA, J.; MACHADO, A. M.; OLIVEIRA, S. D. E. S.; SALES, A. M. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, 2013.

- OLIVEIRA, R. B. et al. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. **Journal of Leukocyte Biology**, v, 65, n. 3, 1999.
- PALIT, A.; INAMADAR, A. C. Vasculitis: approach to diagnosis and therapy. **Indian Association of Dermatologists Venereologists and Leprologists**, v. 72, n. 5, 2006.
- PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1133-1141, 2005.
- PATROCÍNIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, 2005.
- POCATERRA, L. et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 5, 2006.
- POLYCARPOU, A.; WALKER, S.L.; LOCKWOOD, D. N. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 8, 2017.
- REES, R.J. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 44, p. 99-103, 1976.
- REIBEL, F *et al.* Update on epidemiology, diagnosis, and treatment. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45 n. 9, p. 383-393, 2015.
- RIDLEY, D. S. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 5, p. 449-453, 1955.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.
- RIDLEY, D. S. A bacteriologic study of erythema nodosum leprosum. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 28, 1960.
- RIVITTI, E A. **Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti**. São Paulo: Artes médicas Editora, 2014, p. 297-315.
- ROACH, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction infection formation, and clearance of mycobacterial essential for cell recruitment, granuloma. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 4620-4627, 2002.
- RODRIGUES, L. C.; KERR-PONTES, L. R.; FRIETAS, M.V.; BARRETO, M. L. Long lasting BCG protection against leprosy. **Vaccine**, v. 25, p. 6842-44, 2007
- SADHU, S.; KHAITAN, B. K.; JOSHI, B.; SENGUPTA, U.; NAUTIYAL, A. K.; MITRA, D. K. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance

to Polarized Immunity in Leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non th1, non th2 t cells in human leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, 2013.

SAINI, C.; TARIQUE, M.; RAI, R.; SIDDIQUI, A.; KHANNA, N.; SHARMA, A. T helper cells in leprosy: An update. **Immunology Letters**, v. 184, p. 61-66, 2017.

SAINI, C; SIDDIQUI, A; RAMESH, V; NATH, I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 2016.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 531–562, 2004.

SAMPAIO, L. H.; SOUSA, A. L.; BARCELOS, M. C.; REED, S. G.; STEFANI, M. M.; DUTHIE, M. S. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1443–51, 2012.

SANTOS, M. B. et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 40-49, 2017.

SANTOS, A. R. et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 11, 2002.

SASAKI, S.; TAKESHITA, F.; OKUDA, K.; ISHII, N. *Mycobacterium leprae* and leprosy: a compendium. **Microbiology and Immunology**, v. 45, n. 11, 2001.

SAUNDERSON, P.; GEBRE, S.; BYASS, P. ENL reactions in the multibacillary cases of the AMFES cohort in central Ethiopia: incidence and risk factors. **Leprosy Review**, v. 71, n. 3, 2000.

SCOLLARD, D. M. Leprosy research declines, but most of the basic questions remain unanswered. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 73, n. 1, p. 25-27, 2005.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 338-81, 2006.

SCOLLARD, D.M. Infection with *Mycobacterium lepromatosis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, 2016.

SEHGAL, V. N.; SARDANA, K.; DOGRA, S. Management of complications following leprosy: An evolving scenario. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 18, p. 366-374, 2007.

SEHGAL, V. N.; GAUTAM, R. K.; KORANNE, R. V.; BEOHAR, P. C. The histopathology of type I (lepra) and type II (ENL) reactions in leprosy. **Indian journal of leprosy**, v. 58, n. 2, 1986.

SHARMA, R. et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2127-2134, 2015.

SHETTY, V. P.; WAKADE, A.; ANTIA, N. H. A high incidence of viable *Mycobacterium leprae* in post-MDT recurrent lesions in tuberculoid leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 72, n. 3, 2001.

SIELING, P. A. & MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunology**, v. 191, p. 378-87, 1994.

SIELING, P. A. et al. Immunosuppressive roles for interleukin-10 and interleukin-4 in human infection: in vitro modulation of T cell responses in leprosy. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 2, p. 5501-10, 1993.

SILVA, S. F.; GRIEP, R. H. Reação hansênica em pacientes portadores de hanseníase em centros de saúde da área de planejamento do município do Rio de Janeiro. **Hansen International**, v. 32, p. 155–162, 2007

SOUZA, L. W. Leprosy reactions in discharged patients following cure by multidrug therapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.6, 2010.

SREENIVASAN, P.; MISRA, R. S.; WILFRED, D.; NATH, I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. **Immunology**, v. 95, n. 4, 1998.

STINEAR, T. P. et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. **Genetic Research**, v. 17, p. 192-200, 2007.

TARIQUE, M. et al. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3⁺ regulatory T cells in human Leprosy. **Molecular Immunology**, v. 83, p. 72-81, 2017.

TELES, R. M. et al. Differential TNF α mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. **Archives of Dermatology**, v. 294, n. 8, 2002.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokines Play Growing Role As Research**, v. 21, p. 455–46, 2010.

TRUMAN, R. Leprosy in wild armadillos. **Leprosy Review**, v. 76, n. 3, p. 198-208, 2005.

WHO, World Health Organization. Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes. Geneva: WHO, Study Group. **Technical Report Series**, v.847, 1994.

- WHO, World Health Organization. Global leprosy situation, 2014. **Week. Epidemiol. Rec.**, v. 89, n. 36, p.389-400, 2014.
- WHO, World Health Organization. Global leprosy situation, 2015. **Week. Epidemiol. Rec.**, v. 90, n. 36, p.461-476, 2015.
- WHO, World Health Organization. Global leprosy situation, 2016. **Week. Epidemiol. Rec.**, v. 91, n. 35, p.405-420, 2016.
- WHO, World Health Organization. Global leprosy strategy: accelerating towards a leprosy-free world. **Regional Office for South-East Asia**. 2016.
- WHO, World Health Organization. **Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem**, Geneva, 2000.
- WHO, World Health Organization. Leprosy. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **Technical Report Series**, v. 33, n. 1. 1982.
- WHO, World Health Organization. Leprosy. **Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities**, Geneva, 2005.
- WHO, World Health Organization. Leprosy. **Resolution of Forty-fourth World Health Assembly**, Geneva, 1991.
- YOU, E.Y; KANG, T.J; KIM, S.K; LEE, S.B; CHAE, G.T. Mutations in genes related to drug resistance in Mycobacterium leprae isolates from leprosy patients in Korea. **Journal of Infection**, v. 50, n. 1, p. 6–11. 2005.

