

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

Fábio Cassirer Costa

**ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS EM
PACIENTES COM AS FORMAS POLARES DA HANSENÍASE,
ANTES E SEIS MESES APÓS INÍCIO DA
POLIQUIMIOTERAPIA**

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2016**

Fábio Cassirer Costa

**ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS EM
PACIENTES COM AS FORMAS POLARES DA HANSENÍASE,
ANTES E SEIS MESES APÓS INÍCIO DA
POLIQUIMIOTERAPIA**

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

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Coorientadora: Dra. Ana Thereza Chaves

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2016**

Costa, Fábio Cassirer.

C837a Análise do perfil de Citocinas Séricas em pacientes com as formas polares da Hanseníase, antes e seis meses após início da poliquimioterapia [manuscrito]. / Fábio Cassirer Costa. - - Belo Horizonte: 2016.

90f.: il.

Orientador (a): Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.

Coorientador (a): Ana Thereza Chaves.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Citocinas. 3. Quimioterapia Combinada. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes. II. Chaves, Ana Thereza. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: WC 335

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

Reitor: **Prof. Jaime Arturo Ramírez**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes

Prof. Unaí Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Pollyana Anício Magalhães Gontijo – Representante Discente



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

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO FÁBIO CASSIRER COSTA

Realizou-se, no dia 26 de agosto de 2016, às 14:00 horas, Sala 340 - 3º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 302ª defesa de dissertação, intitulada "*Análise do perfil de citocinas séricas em pacientes com as formas polares da Hanseníase, antes e seis meses após início da poliquimioterapia*", apresentada por FÁBIO CASSIRER COSTA, número de registro 2014718983, graduado no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau - Orientador (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG), Profa. Andrea Teixeira de Carvalho (FIOCRUZ), Profa. Jacqueline Araújo Fiúza (FIOCRUZ).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

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

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2016.

Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Dra. Ana Thereza Chaves

Profa. Andrea Teixeira de Carvalho

Profa. Jacqueline Araújo Fiúza



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

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Análise do perfil de citocinas séricas em pacientes com as formas polares da Hanseníase, antes e seis meses após início da poliquimioterapia”

FÁBIO CASSIRER COSTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 26 de agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau - Orientador
UFMG

Dra. Ana Thereza Chaves
UFMG

Prof. Andrea Teixeira de Carvalho
FIOCRUZ

Prof. Jacqueline Araújo Fiúza
FIOCRUZ

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus caminhos, pelas infinitas bênçãos e por guiarme durante esta trajetória, trazendo tantas graças e possibilitando a concretização dos meus sonhos.

Ao professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, líder do nosso grupo de pesquisa em hanseníase, agradeço por me conceder o privilégio de fazer parte deste grande grupo de pesquisa e por compartilhar de sua sabedoria e competência.

À minha orientadora professora Dra. Juliana de Assis Gomes Silva Estanislau agradeço por todos os ensinamentos, motivação e apoio que foram fundamentais no desenvolvimento do estudo, assim como na minha formação. Obrigado por sua boa vontade, paciência, tranquilidade e compreensão, durante toda esta etapa.

À minha coorientadora Dra. Ana Thereza Chaves o meu imenso agradecimento pelos ensinamentos e incentivos, acompanhando-me desde meus primeiros passos durante a iniciação científica, sendo a iniciadora em meu processo de formação científica. Obrigado por acreditar em meu potencial, você foi fundamental no meu amadurecimento pessoal e profissional.

Às Instituições de Ensino e Pesquisa – Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da UFMG – por proporcionarem meu aprendizado e minha formação acadêmica.

À Dra. Sandra Lyon por compartilhar de seu enorme conhecimento em doenças dermatológicas, em especial a hanseníase. Por acreditar neste estudo e por ter aberto as portas do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes. Obrigado pelo exemplo de dedicação, humanidade, profissionalismo e respeito ao próximo, demonstrando verdadeiro amor à luta pela eliminação e controle da hanseníase.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira e toda equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ que desde o início me acolheram de portas abertas.

Aos pacientes portadores da hanseníase por sua disponibilidade e colaboração, durante sua participação voluntária neste estudo. Sem você a realização desse estudo não seria possível.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Hanseníase Karina, Atvaldo, Edilamar, Maria Júlia, e Ana Laura, pela incansável ajudam, pela amizade, parceria, pelo trabalho em equipe e por toda experiência compartilhada nestes últimos anos. Sem vocês, esta jornada seria mais árdua e menos prazerosa.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia das Interações Celulares, por me apoiarem nos momentos difíceis. Vocês são muito especiais!

A toda equipe do Hospital Eduardo de Menezes, funcionários, estagiários e residentes, com os quais tanto aprendi.

À equipe do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, juntamente com a equipe da plataforma de Citometria de Fluxo do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, em especial, a Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis por compartilhar de seus preciosos conhecimentos e pela paciência em me acompanhar na realização dos meus experimentos. Meus agradecimentos a Lorena Junia de Souza Santos, pela disponibilidade e presteza na leitura destes experimentos.

À minha família pelo amor incondicional, sem o qual, minhas lutas e conquistas não fariam o menor sentido. Obrigado pelo incentivo, compreensão e por estarem ao meu lado tanto nos momentos alegres quanto momentos de maior dificuldade.

À Marina pelo companheirismo e incentivo. Obrigado por todo apoio, não somente durante meu mestrado, mas em tantos momentos da minha vida.

Aos meus amigos por toda torcida e pelo incentivo demonstrado ao longo deste período.

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

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica da pele e dos nervos causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*. É caracterizada por um espectro de formas clínicas relacionadas à resposta imune do hospedeiro frente ao *M. leprae*. Pacientes com hanseníase tuberculóide (TT) têm imunidade mediada por células (CMI) com eliminação dos bacilos, enquanto que pacientes com hanseníase virchowiana (VV) exibem CMI defeituoso para o *M. leprae*. Apesar dos avanços na compreensão da patogênese da hanseníase e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, há a necessidade de identificação e/ou validação de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce, na discriminação entre as diferentes formas da doença e, adicionalmente, como marcadores prognósticos. Portanto, neste estudo, foi analisado o perfil de citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, a fim de abordar a contribuição destas citocinas na fase tardia da infecção pelo *M. leprae* antes e após o tratamento. Os resultados demonstraram que os pacientes do grupo VV exibem maior expressão dos níveis séricos de citocinas inflamatórias antes da terapêutica PQT, enquanto os pacientes TT apresentaram equilíbrio entre citocinas inflamatórias e reguladoras. O impacto da PQT altera o perfil de citocinas séricas em pacientes infectados com *M. leprae*, como evidenciado pela rede de citocinas, que apontou que os pacientes VV apresentam um sistema multifacetado de citocinas caracterizado por fortes eixos de ligação envolvendo moléculas pró-inflamatórias e reguladoras. Por outro lado, os pacientes TT apresentaram modesta rede geral de citocinas com baixo envolvimento de citocinas reguladoras. Em conclusão, o efeito do tratamento mostrou que a terapêutica PQT desliga as respostas de citocinas com alterações importantes no balanço da IL-6, IL-10 e IFN- γ .

Palavras-chave: Hanseníase; Citocinas; Poliquimioterapia.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease of the skin and nerves caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*. It is characterized by a spectrum of clinical forms depending on the host's immune response to *M. leprae*. Patients with tuberculoid leprosy (TT) have strong cell-mediated immunity (CMI) with elimination of the bacilli, whereas patients with lepromatous leprosy (LL) exhibit defective CMI to *M. leprae*. Despite advances in the understanding of the pathogenesis of leprosy and the development of new therapeutic strategies, there is a need for the identification and/or validation of biomarkers that can be used for early diagnosis, for discrimination between different forms of the disease and, additionally, as prognostic markers. Therefore in this study the profile of IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A and TNF was analyzed in order to address the contribution of these cytokines in late phase of *M. leprae* infection before and after treatment. The results demonstrated that patients of LL group presented higher expression of serum levels of inflammatory cytokines before MDT therapy, while TT patients presented a balance between inflammatory and regulatory cytokines. The impact of MDT therapy changes the profile of serum cytokines in *M. leprae* infected patients, as evidenced by the cytokine network, which pointed out that LL patients displayed a multifaceted cytokine system characterized by strong connecting axes involving pro-inflammatory/regulatory molecules. On the other hand, TT patients presented an overall modest cytokine network with low involvement of regulatory cytokines. In conclusion, the effect of treatment showed that the MDT therapy switches off cytokine responses with important changes in the balance of IL-6, IL-10 and IFN- γ .

Keywords: Leprosy; Cytokines; Multidrug therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Mycobacterium leprae</i>	23
Figura 2 - Imunologia da hanseníase	34
Figura 3 - Delineamento do estudo	39
Figura 4 - Análise quantitativa de citocinas séricas utilizadas pelo <i>BD CBA Analyses Software</i>	43
Figura 5 - Análise dos níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14).....	50
Figura 6 - Análise dos níveis séricos das citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-17A mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14).....	51
Figura 7 - Análise dos níveis séricos das citocinas IL-13 e IL-10 mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14).....	52
Figura 8 - Assinatura geral de citocinas séricas – frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14).....	54
Figura 9 - Assinatura ascendente de citocinas séricas – curva ascendente da frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14).....	55
Figura 10 - Rede de biomarcadores séricos para indivíduos não infectados (NI, n = 12) e pacientes recém-diagnosticados com hanseníase nas formas polares Polo TT (n = 10) e Polo VV (n = 14).....	57

Figura 11 - Análise dos níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento	60
Figura 12 - Análise dos níveis séricos das citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-17A mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento	61
Figura 13 - Análise dos níveis séricos das citocinas IL-13 e IL-10 mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento	62
Figura 14 - Assinatura geral de citocinas séricas – frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento	63
Figura 15 - Assinatura ascendente de citocinas séricas – curva ascendente da frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento..	64
Figura 16 - Rede de biomarcadores séricos para pacientes recém-diagnosticados com hanseníase nas formas polares Polo TT (n = 10) e Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento	66
Quadro 1 - Critérios para avaliação do grau de incapacidade física em indivíduos com suspeita de hanseníase.....	28
Quadro 2 - Escala logarítmica de Ridley	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da população estudada	38
Tabela 2 - Análise descritiva da população estudada	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígenos / <i>Antigen-Presenting Cells</i>
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEAP	Centro Especializado em Anatomia Patológica
CMI	Imunidade mediada por células / <i>Cell-Mediated Immunity</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DD	Forma clínica Dimorfa-Dimorfa
DT	Forma clínica Dimorfa-Tuberculóide
DV	Forma clínica Dimorfa-Virchowiana
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescência
FSC	<i>Forward Scatter</i> / Dispersão frontal da luz
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GIPB	Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
IB	Índice Baciloscópico
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
MB	Multibacilar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
ML Flow	Teste de fluxo Lateral para o <i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NI	Indivíduos não infectados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PE	Ficoeritrina / <i>Phycoerythrin</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGL- 1	Glicolípido fenólico 1 / <i>Phenolic glycolipid-1</i>
PQT	Poliquimioterapia
rpm	Rotações por minuto
RR	Reação Reversa
SSC	<i>Side Scatter</i> / Dispersão lateral da luz
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura Ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	Célula T auxiliar / <i>T helper</i>
TNF	Fator de crescimento tumoral / <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	Células T reguladoras
TLR	Receptores do tipo Toll / <i>Toll-like Receptor</i>
TT	Forma clínica Tuberculóide-Tuberculóide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	Estados Unidos das Américas / <i>United States of America</i>
VV	Forma clínica Virchowiana-Virchowiana

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	19
2	INTRODUÇÃO.....	20
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1	Aspectos gerais da hanseníase	22
3.2	Agente etiológico	22
3.3	Transmissão	23
3.4	Epidemiologia	24
3.5	Classificação e manifestações clínicas.....	25
3.6	Diagnóstico	27
3.7	Tratamento.....	30
3.8	Aspectos imunológicos da hanseníase.....	31
4	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo geral.....	35
4.2	Objetivos específicos	35
5	POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1	Delineamento do estudo	36
5.2	Cenário do estudo.....	36
5.3	População estudada	36
5.4	Critérios de inclusão	38
5.5	Critérios de exclusão	38
5.6	Fluxograma.....	39

5.7	Cálculo do tamanho amostral	39
5.8	Elaboração do banco de dados	40
5.9	Procedimento da coleta de dados.....	40
5.10	Dosagem de citocinas séricas	40
5.11	Dosagem de citocinas séricas	43
5.12	Análise das correlações dos biomarcadores	44
5.13	Análise estatística	44
5.14	Aspectos éticos.....	45
6	RESULTADOS	46
6.1	Análises descritivas da população estudada	48
6.2	Análise do perfil de citocinas séricas de pacientes com formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados	49
6.3	Análise da assinatura dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes com formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados.....	52
6.4	Análise das correlações dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes com formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados.....	55
6.5	Análise do perfil de citocinas séricas de pacientes do Polo TT e do Polo VV antes e seis meses após início da PQT	59
6.6	Análise da assinatura dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes do Polo TT e do Polo VV antes e seis meses após início da PQT	62
6.7	Análise das correlações dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes do Polo TT e do Polo VV antes e seis meses após início da PQT	65

7	DISCUSSÃO.....	67
8	CONCLUSÃO.....	74
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXOS	85

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O projeto “Análise do perfil de citocinas séricas em pacientes com as formas polares da hanseníase, antes e seis meses após início da poliquimioterapia” foi desenvolvido na linha de pesquisa "Epidemiologia e controle das doenças infecciosas e parasitárias", e está inserido no grupo de pesquisa "Hanseníase", no qual se desenvolvem diversos trabalhos paralelos e complementares a este.

Os pacientes incluídos neste estudo foram atendidos no Hospital Eduardo de Menezes (HEM), onde foram realizados o diagnóstico e a classificação clínica, pela Dra. Sandra Lyon, dermatologista do serviço de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária do HEM. A classificação histopatológica foi realizada no Centro Especializado em Anatomia Patológica (CEAP), pelo Dr. Moisés Salgado Pedrosa, especialista em patologia pela Sociedade Brasileira de Patologia.

Durante o desenvolvimento deste estudo, o discente Fábio Cassirer Costa participou de todas as etapas, bem como da orientação e seleção dos pacientes, acompanhamento da coleta da amostra (sangue periférico), realização do teste de fluxo lateral para o *Mycobacterium leprae* (ML Flow), processamento da amostra, realização do protocolo de dosagem de citocinas através do sistema de ensaio com microesferas fluorescentes (*Cytometric Bead Array* - CBA) e análise dos resultados pelo *software* FCAP Array. Os experimentos imunológicos foram desenvolvidos no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ/MG, sob a coordenação da Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis. A leitura dos experimentos foi realizada pela plataforma de citometria de fluxo do CPqRR.

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo avaliar o perfil de citocinas séricas nas formas polares da hanseníase, antes e seis meses após início do tratamento e em indivíduos não infectados. Para tanto, avaliou-se a produção das citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF.

A dissertação foi estruturada em dez partes principais: I - Considerações iniciais; II - Introdução; III - Revisão da literatura; IV - Objetivos; V - População, materiais e métodos; VI - Resultados; VII - Discussão; VIII – Conclusão; IX – Referências bibliográficas e X – Anexos.

2 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica, granulomatosa, causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular obrigatório, que possui predileção por macrófagos da pele e células de Schwann (camada lipídica que recobre os nervos periféricos) (SHEPARD, 1962; SCOLLARD *et al.*, 2006). A doença ainda é um grande problema de saúde pública em vários países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil, devido ao surgimento de casos novos todos os anos (BRASIL, 2008; WHO, 2014). Somente no Brasil, em 2014, foram notificados 31.064 casos novos, sendo 1.187 casos em Minas Gerais (WHO, 2014).

A hanseníase manifesta-se, principalmente, por lesões cutâneas e danos neurais, com redução de sensibilidade, apresentando alto potencial de causar deformidades e incapacidades físicas irreversíveis, decorrentes, principalmente, da resposta inflamatória crônica e granulomatosa (SCOLLARD *et al.*, 2006).

São vários os fatores que determinam o aparecimento das manifestações clínicas que acometem os pacientes, entre eles, aqueles próprios do hospedeiro, como genéticos e imunológicos, os intrínsecos ao agente causal e os ambientais (GELUK; OTTENHOF, 2006; REA; MODLIN, 2010). É fato amplamente conhecido que a baixa virulência do *M. leprae*, combinada a uma resposta imune efetiva, está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase. Esta se manifesta em diferentes formas clínicas, que são determinadas pelo delineamento da resposta imune do indivíduo infectado (ALTER *et al.*, 2011). Dentro desse contexto, os pacientes com a forma tuberculóide apresentam forte resposta inflamatória do tipo Th1, destruição das fibras nervosas em áreas específicas, levando ao aparecimento na pele de lesões localizadas e bem demarcadas, com perda de sensibilidade térmica e dolorosa. Na deficiência de uma resposta Th1 eficiente, ocorre disseminação do bacilo, levando ao quadro da hanseníase virchowiana. Nesse caso os macrófagos estão repletos de parasito e há escassez de linfócitos na lesão. As formas dimorfas, representam um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Com a resposta imune competente, o indivíduo evolui para a forma localizada e não contagiosa da doença; se esta competência não é efetiva, desenvolve-se a forma difusa e contagiosa (PINHEIRO *et al.*, 2011). Entretanto, não se sabe ainda

como indivíduos desenvolvem formas graves da doença e nem como se dá a heterogeneidade das formas clínicas.

A importância da resposta imune na hanseníase não se restringe à determinação do espectro clínico. No decorrer da doença ou muitas vezes após início do tratamento, alguns pacientes podem apresentar manifestações clínicas agudas secundárias à liberação de antígenos e a reações de hipersensibilidade.

O tratamento da hanseníase abrange a utilização da poliquimioterapia (PQT) específica, prevenção de incapacidades e reabilitação física. A PQT é eficaz na interrupção da cadeia de transmissão, visto que a primeira dose elimina até 99,9% da carga bacilar de um indivíduo (OPROMOLLA, 2000; BRASIL, 2016). Para fins de tratamento a classificação clínica se faz importante, pois os pacientes são tratados em esquemas poliquimioterápicos distintos, preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2002; BRASIL, 2016). Desta forma, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são de fundamental importância para cura e controle da erradicação da doença. Entretanto, apesar do conhecimento dos últimos anos sobre a participação da resposta imune do hospedeiro contra o *M. Leprae*, pouco se sabe sobre o impacto do tratamento nesses indivíduos. De acordo com alguns autores, a produção de citocinas em pacientes com hanseníase é devido à estimulação das células do sistema imune por antígenos de *M. leprae* e quando estes antígenos são reduzidos por meio de tratamento, a produção de citocina pode ser reduzida ou mesmo atingir os níveis encontrados em indivíduos não infectados (MOUBASHER *et al.*, 1998a; MOUBASHER *et al.*, 1998b).

De acordo com o que foi mencionado acima, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de citocinas no soro de pacientes recém-diagnosticados com as formas polares da hanseníase, antes e seis meses após início do tratamento poliquimioterápico. Tendo como hipótese que pacientes hanseníacos do polo VV apresentem produção de citocinas inflamatórias, porém modulada, enquanto que pacientes do polo TT apresentem perfil inflamatório e que o tratamento poliquimioterápico altere o perfil de citocinas produzidas nas diferentes formas clínicas da doença.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da hanseníase

A hanseníase trata-se de uma doença infectocontagiosa, de evolução crônica granulomatosa, que atinge principalmente a pele e nervos periféricos (SCOLLARD *et al.*, 2006). O comprometimento dos nervos periféricos é a característica principal da doença, dando-lhe alto potencial de causar incapacidades físicas irreversíveis, decorrentes, principalmente, da resposta inflamatória crônica e granulomatosa (BRASIL, 2002; MIRANDA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estas incapacidades e deformidades físicas, ocasionadas durante o curso da doença, podem desencadear problemas graves como diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social e problemas psicológicos, deixando manchas e cicatrizes tanto no corpo quanto na alma. Sendo assim, responsáveis pelo estigma e preconceito contra a doença desde a antiguidade até os dias atuais (BRASIL, 2002; BAIALARDI, 2007; VAN BRAKEL *et al.*, 2012).

A prevalência de hanseníase no mundo reduziu drasticamente, ainda assim, no ano de 2013, foi responsável por infectar mais de 200.000 indivíduos. Os indivíduos não tratados são a principal fonte de infecção, influenciando nas taxas de diagnóstico que, no Brasil registraram 31.064 casos novos, perfazendo um coeficiente de prevalência de 1,27/10 mil habitantes, superior à meta de 1/10 mil habitantes, definida pela OMS para eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (WHO, 2014). A detecção precoce dos casos, o seu tratamento e o estudo de características genéticas, imunológicas e clínicas devido à infecção pelo bacilo *M. leprae* são os princípios para o controle da doença (BRASIL, 2016).

3.2 Agente etiológico

O *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória com tamanho entre 1,5 a 8 μm de comprimento por 0,2 a 0,5 μm de diâmetro, apresenta-se na forma de bacilo reto ou levemente encurvado, gram-positivo e álcool ácido resistente (Figura 1), que infecta, preferencialmente, macrófagos e células de Schwann (HARBOE, 1994;

MONOT *et al.*, 2005; REA, MODLIN, 2010). Acomete principalmente a pele e nervos das extremidades do corpo, mas pode afetar outros órgãos como o fígado, os testículos e olhos (GOULART *et al.*, 2002).

O tempo de crescimento do bacilo é lento, variando de 11 a 16 dias, permanecendo viável no meio ambiente por até nove dias. Sendo a única espécie, dentre as *Mycobacterium* que não pode ser cultivada *in vitro*, podendo ser inoculado em alguns modelos animais como tatus e em patas de camundongos (REES, 1985; TRUMAN *et al.*, 1986; KRAHENBUHL, 2000).

Estudos mostram que a temperatura ideal para reprodução desta micobactéria está entre 27°C a 33°C, o que pode explicar sua predileção pelas regiões mais frias do corpo como pele, nervos periféricos e as mucosas de vias aéreas superiores. À medida que o *M. leprae* adentra o corpo humano, sua parede celular apresenta-se como o primeiro ponto de encontro com o sistema imune, sendo esta, constituída principalmente de lipídeos, onde o mais abundante é o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), presente somente no *M. leprae*, conferindo especificidade imunológica a esse patógeno (BRENNAN, 1980; HUNTER; BRENNAN, 1981).

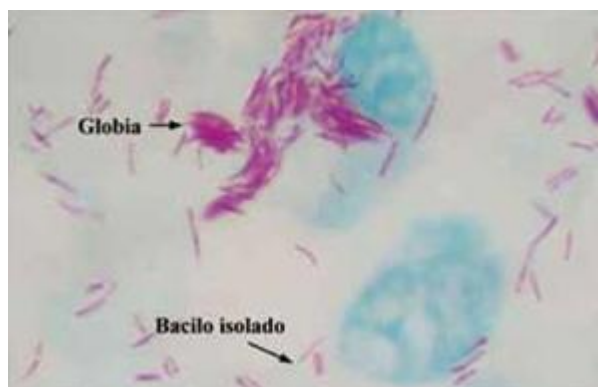


FIGURA 1: *Mycobacterium leprae*. Visto em globias e isolados. (Ziehl-Neelsen 100x).

Fonte: BRASIL, 2010.

3.3 Transmissão

Sugere-se que a transmissão da doença se dá de pessoa a pessoa, através do convívio domiciliar, íntimo e prolongado de indivíduos suscetíveis com indivíduos

bacilíferos não tratados. Os portadores de hanseníase, especialmente, com as formas multibacilares (MB), constituem a principal fonte de propagação da infecção, embora sua transmissão não esteja totalmente esclarecida. A principal via de eliminação e a porta de entrada do bacilo no organismo é o aparelho respiratório, pela disseminação de aerossóis e secreções nasais das vias aéreas superiores, infectando, assim, indivíduos susceptíveis (VISSCHEDIJK *et al.*, 2000; ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2008).

O homem é considerado o único reservatório natural do *M. leprae*, apesar de haver relatos de animais selvagens naturalmente infectados, como tatus e macacos, contudo, não há evidências de sua importância na cadeia de transmissão da hanseníase (OPROMOLLA, 2000).

3.4 Epidemiologia

A melhoria das condições de vida e o avanço do conhecimento científico modificaram significativamente o panorama da hanseníase, que atualmente tem tratamento e cura. Entretanto, apesar de todos os avanços em diagnóstico e tratamento, a hanseníase permanece até os dias atuais como um importante problema de saúde pública (WHO, 2010).

Embora sejam percebidos avanços na política social e econômica de países em desenvolvimento, dados epidemiológicos demonstram que a hanseníase ainda se encontra entre as doenças endêmicas negligenciadas, ocorrendo especialmente entre as populações da África, Ásia e América Latina (WHO, 2013, 2014).

De acordo com a OMS, em 2013, a incidência mundial registrada da doença, apontou 215.656 casos novos, detectados em 103 países. Quando comparado com o número de casos novos no ano anterior (232.857), observou-se uma diminuição de 17.201 casos novos, com taxa global de detecção de 3,81 por 100.000 habitantes (WHO, 2014).

No Brasil, em 2014, foram registrados 31.064 casos novos, com coeficiente de detecção de 15,44 por 100 mil habitantes, apesar de apresentar um decréscimo contínuo desde 2003, ainda se mantém elevado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2015).

Desta forma, para controle epidemiológico da hanseníase, torna-se de fundamental importância à identificação precoce de casos novos, tratamento adequado e continuado destes pacientes, assim como o acompanhamento de seus contatos intradomiciliares, auxiliando na descontinuidade da transmissão da doença e na prevenção de danos neurais e incapacidades (WHO, 2015).

3.5 Classificação e manifestações clínicas

Atualmente, para fins de classificação das formas clínicas da hanseníase, foram estabelecidos três sistemas: classificação de Madri, classificação de Ridley e Jopling e a classificação Operacional.

A classificação de Madri, estabelecida no Congresso Internacional de Madri em 1953, adota critérios de polaridade e baseia-se nas características imunológicas, bem como a tendência da resposta imune em evoluir para polos imunológicos com características dicotômicas, onde se consideram dois polos imunologicamente estáveis e distintos (virchowiano e tuberculóide) e dois grupos imunologicamente instáveis (indeterminado e dimorfo) (MUIR, 1953; OPROMOLLA, 2000).

A classificação de Ridley e Jopling (1966), que obedece a critérios clínicos e bacteriológicos, enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos. Propondo assim, uma classificação mais precisa que considera as duas formas polares tuberculóide-tuberculóide (TT) e virchowiana-virchowiana (VV) e adota subgrupos dentro da região interpolar correspondente à forma dimorfa, sendo esta, subdividida em dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV). Essa classificação não considera a forma indeterminada e é a mais utilizada no âmbito das pesquisas (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Em 1982, um Comitê da Organização Mundial de Saúde propôs uma classificação simplificada e operacional, indicada para o trabalho de campo e para fins terapêuticos, dividindo a hanseníase em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), conforme o índice baciloscópico (IB). Essa classificação sofreu algumas modificações ao longo dos anos, sendo a publicação de 2002 da OMS, a mais atual e vigente. Nesta, classifica-se como PB, os indivíduos que apresentam contagem de lesões cutâneas maiores ou iguais a cinco, juntamente com baciloscopia negativa

(IB= 0) e classifica-se como MB, aqueles indivíduos com número de lesões cutâneas maiores que cinco ou que apresentem baciloscopia positiva (IB≥1), independentemente do número de lesões (BRASIL, 2016).

A hanseníase é uma doença que apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, relacionando-se ao tipo de resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo *M. leprae*. Nos pacientes que apresentam a forma clínica tuberculóide, observa-se destruição das fibras nervosas em áreas específicas, com consequente perda da sensibilidade tátil, térmica e dolorosa, além de limitação das lesões cutâneas, sendo estas, hipopigmentadas, anestésicas, localizadas e bem demarcadas com distribuição assimétrica (GOULART *et al.*, 2002; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Os pacientes diagnosticados com a forma virchowiana, são caracterizados por lesões simétricas, ligeiramente eritematosas, mal delineadas e progressiva infiltração difusa, geralmente evidenciada na face e nos membros superiores e inferiores. Observa-se também a queda de pelos do corpo, principalmente cílios e supercílios (madarose). Estes sinais e sintomas são decorrentes da maciça multiplicação bacilar e disseminação da infecção para vísceras e tecido nervoso (GOULART *et al.*, 2002; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

As formas dimorfas são imunologicamente dinâmicas, caracterizadas por instabilidade da resposta imune com padrão clínico e imunológico de resposta intermediária, oscilando entre os polos tuberculóide e virchowiano, dependendo do potencial de resposta imune celular do hospedeiro frente ao *M. leprae*. Deste modo, a transição da forma DT para a forma DV é evidenciada pela redução progressiva da resposta imune mediada por célula, acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos e morfologicamente mescla aspectos tanto da hanseníase tuberculóide, quanto da virchowiana (ARMOUR *et al.*, 2005).

Durante o curso crônico e insidioso da hanseníase, podem ocorrer episódios agudos, denominados surtos reacionais ou reações hansênicas. Tais reações estão relacionadas ao sistema imunológico e constituem, geralmente, em exacerbada reação inflamatória, localizada ou sistêmica, que pode ser acompanhada de comprometimento de nervos periféricos, resultando em manifestação de dor acentuada, podendo aparecer antes, durante ou após o tratamento específico da doença (BRASIL, 2016).

Existem dois tipos de reações hansênicas: Reação tipo1 ou Reação Reversa

(RR) e Reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH). A reação tipo 1 se caracteriza por manifestações localizadas, tais como eritema, infiltração e edema de lesões pré-existentes, às vezes acompanhadas do aparecimento de novas lesões de pele, podendo ocorrer também espessamento e dor de nervos periféricos. Enquanto a reação tipo 2, se manifesta mais frequentemente através de nódulos eritematosos dolorosos localizados em qualquer região da pele, desencadeados por deposição de imunocomplexos circulantes (FOSS, 2003; KAHAWITA *et al.*, 2008).

3.6 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, realizado pela anamnésia da história e condições de vida do paciente, além do exame dermatoneurológico, que visa identificar a presença de lesões cutâneas com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos. (ARAÚJO, 2003; WHO, 2015).

O estesiômetro ou monofilamentos de Semmes-Weinstein são utilizados na avaliação e detecção de alterações de sensibilidade nas lesões, mãos e pés. A identificação das lesões neurológicas consiste na inspeção dos olhos, nariz, mãos e pés, palpação dos nervos periféricos e avaliação da força muscular em membros superiores e inferiores. O resultado determina o grau de incapacidade física (grau 0, grau I e grau II), conforme demonstrado no quadro 1, sendo um indicador de precocidade no diagnóstico da doença (BRASIL, 2016).

QUADRO 1 – Critérios para avaliação do grau de incapacidade física em pacientes com suspeita de hanseníase

GRAU	CARACTERÍSTICAS
0	<p>Olhos: Força muscular das pálpebras e sensibilidade da córnea preservadas e conta dedos a 6 metros ou acuidade visual $\geq 0,1$ ou 6:60.</p> <p>Mãos: Força muscular das mãos e sensibilidade palmar preservadas: sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.</p> <p>Pés: Força muscular dos pés e sensibilidade plantar preservados: sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.</p>
I	<p>Olhos: Diminuição da força muscular das pálpebras sem deficiências visíveis e/ou diminuição ou perda da sensibilidade da córnea: resposta demorada ou ausente ao toque do fio dental ou diminuição/ausência do piscar.</p> <p>Mãos: Diminuição da força muscular das mãos sem deficiências visíveis e/ou alteração da sensibilidade palmar: não sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.</p> <p>Pés: Diminuição da força muscular dos pés sem deficiências visíveis e/ou alteração da sensibilidade plantar: não sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.</p>
II	<p>Olhos: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, tais como: lagoftalmo; ectrópio; entrópio; triquíase; opacidade corneana central; iridociclite e/ou não conta dedos a 6 metros ou acuidade visual $< 0,1$ ou 6:60, excluídas outras causas.</p> <p>Mãos: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, tais como: garras, reabsorção óssea, atrofia muscular, mão caída, contratura, feridas.</p> <p>Pés: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, tais como: garras, reabsorção óssea, atrofia muscular, pé caído, contratura, feridas.</p>

FONTE: BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (2016). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/diretrizes-eliminacao-hanseníase-4fev16-web.pdf>

Os exames complementares podem ser utilizados para confirmação do diagnóstico e auxiliar na classificação dos pacientes, tais como baciloscopia, exame histopatológico, teste de Mitsuda e teste de fluxo lateral para o *Mycobacterium leprae* (ML Flow).

A baciloscopia é o exame complementar mais utilizado e consiste na pesquisa direta do *M. leprae* em raspados intradérmico, colhidos em quatro sítios (dois lóbulos

auriculares, cotovelo contralateral à lesão e da lesão suspeita) e corados pelo método de Ziehl-Neelsen. O resultado da baciloscopia é baseado na escala logarítmica de Ridley, que considera o número médio de bacilos visualizados por campo microscópico e varia de 0 a 6 (QUADRO 2) (RIDLEY; JOPLING, 1966; BRASIL, 2010).

QUADRO 2 – Escala logarítmica de Ridley

IB	Descrição da baciloscopia
0	Ausência de bacilos em 100 campos examinados
1+	Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados
2+	Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados
3+	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado
4+	Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado
5+	Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado
6+	Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado

FONTE: BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de procedimentos técnicos: Baciloscopia em Hanseníase (2016).

Disponível em:

http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hansenias_e.pdf

Os resultados do exame histopatológico de lesões cutâneas diferem de acordo com a classificação destes pacientes. Em síntese, lesões de pacientes tuberculóides apresentam formação de granuloma bem definido, compostos por células epitelióides, infiltrado inflamatório perianexial e perineural. Nas formas dimorfas, os granulomas são mais frouxos e podendo apresentar poucos ou muitos bacilos. Enquanto na forma virchowiana não há formação de granuloma e as lesões apresentam hansenomas frouxos constituídos principalmente por macrófagos vacuolizados (célula de Virchow) repletas de bacilos corados (RIDLEY; JOPLING, 1966).

O teste de Mitsuda, considerado de alta especificidade, baseia-se na resposta imune celular do indivíduo através da reação cutânea de hipersensibilidade tardia frente ao bacilo. O teste consiste na inoculação via intradérmica do antígeno de Mitsuda (extrato bruto de *M. leprae* esterilizado por autoclave), cuja leitura da reação é realizada após 28 dias, podendo resultar em pápula infiltrada (reação positiva) ou

na ausência de alteração cutânea (reação negativa) (MITSUDA, 1919). O teste positivo representa o amadurecimento do sistema imune após estímulo do *M. leprae* e a capacidade de defesa do hospedeiro, tendo valor prognóstico, e não diagnóstico. Ele auxilia na classificação de pacientes portadores de hanseníase dos grupos indeterminados e dimorfos. Uma pequena parcela da população permanecerá com teste de Mitsuda negativo, o que indica tendência para formas multibacilares (OPROMOLLA, 2000).

A sorologia rápida para hanseníase (teste ML Flow) é um método imunocromatográfico que detecta anticorpos da classe IgM contra o antígeno PGL- 1 do *M. leprae* (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003). O teste sorológico ML Flow é utilizado como ferramenta auxiliar na definição das formas clínicas e no monitoramento dos contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase. Geralmente, pacientes PB são soronegativos, enquanto que os MB são positivos. (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; BÜHRER-SÉKULA, 2008).

Há outros testes de diagnóstico complementares, como a identificação molecular do *M. leprae* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), entretanto se restringe a grandes centros de pesquisa, não sendo realizado rotineiramente, por ser de alto custo (WHO, 2000).

3.7 Tratamento

Em 1982, a OMS recomendou o uso da poliquimioterapia (PQT) padrão para o tratamento da hanseníase. O tratamento do paciente com hanseníase é fundamental para curá-lo e bloquear a fonte de infecção, interrompendo a cadeia de transmissão da doença sendo, portanto, estratégico no controle da endemia e para eliminar a hanseníase enquanto problema de saúde pública. O paciente pode ser tratado gratuitamente no Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento da hanseníase é ambulatorial e baseia-se na utilização de PQT intensiva, seguida de medidas de prevenção de incapacidades e reabilitação física e psicossocial (BRASIL, 2002).

A PQT é administrada no formato de esquemas terapêuticos, de acordo com a classificação operacional dos pacientes. Para os pacientes PB, utilizam-se doses

mensais supervisionadas de rifampicina e dapsona em associação às doses diárias de dapsona, com duração de seis a nove meses. Já para os pacientes MB, utilizam-se doses mensais supervisionadas de rifampicina, clofazimina e dapsona em associação às doses diárias de clofazimina e dapsona, com duração de doze a dezoito meses (BRASIL, 2016).

Quanto aos componentes da PQT, a dapsona é a medicação mais antiga no tratamento da hanseníase. Apresenta características bacteriostáticas contra o *M. leprae* e atua diminuindo ou bloqueando a biossíntese de folato, utilizado no metabolismo do bacilo, através do processo de inibição enzimática por competição. A rifampicina é a droga mais potente da poliquimioterapia, pois inibe a síntese proteica bacteriana ao combinar-se com a RNA polimerase, sendo a única com ação bactericida contra o *M. leprae*. A clofazimina, corante cristalino lipossolúvel, possui ação tanto bacteriostática quanto anti-inflamatória e atua lentamente sobre *M. leprae* eliminando 99,9% das bactérias num período de cinco meses em pacientes multibacilares e por se tratar de um corante pode causar hiperpigmentação cutânea, acentuando-se à exposição solar. O escurecimento da pele durante a PQT é uma das queixas principais dos pacientes em tratamento contra hanseníase (KAR; GUPTA, 2015).

3.8 Aspectos imunológicos da hanseníase

Como visto, o amplo espectro clínico que os indivíduos com hanseníase apresentam está intimamente ligado ao tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro ao longo desta infecção (SCOLLARD *et al.*, 2006). Neste cenário, o primeiro nível de interação do *M. leprae* com o hospedeiro se constitui através da resposta imune inata, considerada crucial para o padrão de resposta frente ao bacilo, pois está diretamente ligada ao perfil de resposta adaptativa (MODLIN, 2010).

Uma das primeiras células a participar da modulação inicial desempenhada pela resposta imune inata na hanseníase são as células dendríticas, que após o primeiro contato com o patógeno são ativadas, passando a fagocitar, processar e apresentar o antígeno aos linfócitos T distantes do sítio da infecção, além de

produzir moléculas coestimulatórias e citocinas como IL-6, IL-10, IL-12 e TNF, que atuam na modulação do curso da resposta imune adaptativa (DEMANGEL; BRITTON, 2000).

Além das células dendríticas, os macrófagos também são células que participam da interação inicial com o *M. leprae*, desempenhando importante papel na inter-relação parasito-hospedeiro, podendo atuar como *habitat* celular para o bacilo, como célula apresentadora de antígeno (APC), na ativação de linfócitos T e na destruição efetiva do *M. leprae*.

O reconhecimento de patógenos por macrófagos e células dendríticas envolve receptores do tipo *Toll-like* (TLR). Os TLR1 e TLR2 reconhecem lipopeptídeos da parede bacteriana do *M. leprae* (WALKER; LOOCKWOOD, 2006). Estudos mostram que o perfil de citocinas expresso em lesões de pacientes com hanseníase pode estar correlacionado com estes receptores, onde citocinas tipo Th1 foram associadas com a ativação de TLR1 e TLR2, enquanto que citocinas do tipo Th2 foram associadas com a inibição de TLR1 e TLR2 (KRUTZIK *et al.*, 2003; BARKER, 2006).

Os macrófagos assim como todas as APC's, produzem citocinas importantes que participam de um dos principais eixos da imunidade inata/adaptativa em micobactérias, o eixo IL-12/IL-23/IFN- γ (LANGRISH *et al.*, 2004). Onde essas células, diante do contato com o patógeno, passam a sintetizar várias citocinas como IL-12, IL-23 e IL-27 que atuam estimulando os linfócitos e as células NK a produzir suas próprias citocinas que vão mediar à resposta imune. Com destaque para o IFN- γ que ativa os mecanismos microbicidas e aumenta a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e de moléculas coestimulatórias (VAN DE VOSSE *et al.*, 2004). Outra importante citocina pró-inflamatória produzida em resposta ao estímulo dos macrófagos é o TNF- α que atua em sinergia com a produção de IFN- γ e constituem o principal mecanismo efetor da imunidade celular. O TNF- α também participa da ativação do macrófago, induzindo-o a controlar o bacilo, tendo papel importante na manutenção dessa ativação e na formação do granuloma (GOULART *et al.*, 2002; VAN DE VOSSE *et al.*, 2004).

Em macrófagos competentes, ativados por citocinas como IFN- γ , após a fagocitose de patógenos, ocorre o *burst* oxidativo com a liberação de reativos de oxigênio e nitrogênio, contudo, a fagocitose do *M. leprae* não leva a um *burst*

oxidativo intenso, possivelmente pela remoção de ânions superóxido por interação do PGL-1 expresso pelo bacilo. Em pacientes TT, os macrófagos sofrem transformação completa em células epitelióides, sendo capazes de eliminar o *M. leprae*, atuando assim no controle da multiplicação dos bacilos. Entretanto na ausência de uma resposta imune celular efetiva, como ocorre nos pacientes VV, há multiplicação e disseminação do bacilo. Desta forma, indivíduos virchowianos são caracterizados por altos níveis de anticorpos específicos ao PGL-1 do *M. leprae*, mas sem conferir proteção ao hospedeiro, visto que o próprio ambiente de resposta criado ao longo da infecção, com formação de imunocomplexos e sua influência sobre o perfil de citocinas apresentado pelas células infectadas, não favorece a resolução da infecção. (HOLZER *et al.*, 1986; GOULART *et al.*, 2002; BARKER, 2006).

De modo geral, estudos demonstram que pacientes do polo tuberculóide possuem um padrão de resposta imune protetora mediada pelas células T, com produção de citocinas majoritariamente relacionadas à resposta Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ) que contribuem na maturação e ativação dos macrófagos, levando ao controle da multiplicação dos bacilos e a sua posterior eliminação. Enquanto, os pacientes do polo virchowiano parecem possuir predominantemente, um perfil de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) que induz a redução da resposta inflamatória, com inibição macrófágica e perfil característico da resposta humoral, padrões imunológicos que, somados a outros fatores, seriam insuficientes para conter o *M. leprae* (MODLIN *et al.*, 1983; YAMAMURA *et al.*, 1991; MOUBASHER *et al.*, 1998a).

Em suma, observa-se que a fagocitose do *M. leprae* pelas APC's e a subsequente produção local de citocinas parecem regular a inflamação e estimular o sistema imune dentro de um perfil de resposta predominantemente Th1 ou Th2, conforme ilustrado na figura 2.

No entanto, alguns pacientes (em torno de 40%) podem exibir um perfil de resposta mista, ou seja, produzem citocinas tanto do perfil Th1 quanto Th2, tais como IFN- γ , IL12 e IL4. Isso demonstra que o predomínio de uma resposta não implica na anulação da outra, e pode sugerir ainda que em alguns pacientes a resposta imune frente ao bacilo possa não se restringir completamente ao paradigma Th1/Th2. Dentro deste contexto vale ressaltar que novos subgrupos de células T auxiliares já foram descritos, tais como as células T reguladoras (Treg) e

as células T produtoras de IL-17 (Th17), indicando que a resposta celular não é tão dicotômica como se pensava (SCOLLARD *et al.*, 2006).

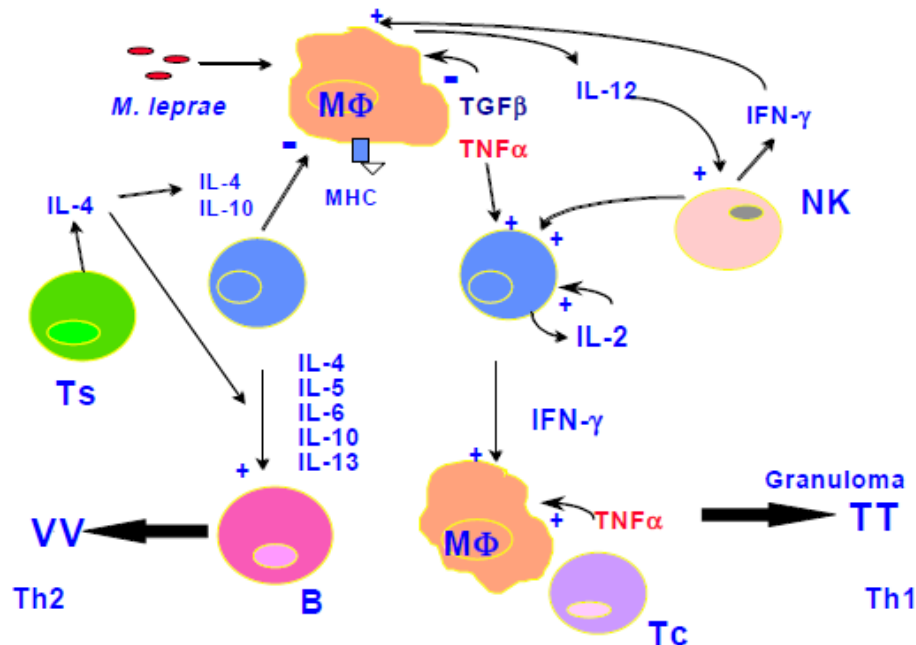


FIGURA 2: Imunologia da hanseníase. No padrão de resposta tipo 1 da forma clínica tuberculóide (TT), a IL-2 é um fator de crescimento autócrino para células *T helper*, que faz ativação de macrófago (MΦ) mediada pelo interferon-gama (IFN- γ) – imunidade mediada por célula. Macrófagos produzem o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a IL-12 que atuam sobre linfócitos T, que passam a produzir suas próprias citocinas. A citocina IL-12 estimula diretamente a célula *natural killer* (NK), induzindo a produção de IFN- γ , potencializando a ativação do macrófago. No padrão de resposta tipo 2 da forma clínica virchowiana (VV), as citocinas IL-4 e IL-10 que são supressoras da atividade macrofágica, atuam produzindo bloqueio da estimulação de macrófagos, com conseqüente desvio da resposta imunológica. A IL-4 é um fator de crescimento para células T supressoras (Ts) estimulando a diferenciação de células B para produção de anticorpos – imunidade humoral. Na presença de IL-4, uma subclasse de célula TCD4⁺ (Th3) é ativada para produção do fator transformador de crescimento beta (TGF β), potente fator supressor de macrófago. IL-1 a IL-13: interleucinas 1 a 13; Tc: linfócito T citotóxico; Th1: linfócito T auxiliar tipo 1; Th2: linfócito T auxiliar tipo 2.

Fonte: Adaptado de FOSS, 1997.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de citocinas séricas em casos novos, diagnosticados com as formas polares da hanseníase, antes e seis meses após o início do tratamento poliquimioterápico.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Quantificar as citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF no soro de pacientes com as formas polares da hanseníase (Polo TT e Polo VV) antes e seis meses após início da poliquimioterapia e em indivíduos não infectados;
- ✓ Avaliar a correlação entre o perfil imunológico dos pacientes com as formas polares da hanseníase (Polo TT e Polo VV) antes e seis meses após início da poliquimioterapia e dados clínicos.

5 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional e longitudinal com grupos de comparação interna, no qual as medições foram realizadas antes e seis meses após início do tratamento. O presente estudo foi realizado no período compreendido entre maio de 2014 a fevereiro de 2016. As amostras de soro colhidas dos pacientes, ao longo deste período, foram armazenadas por criopreservação (-80°C) e preparadas simultaneamente para dosagem dos níveis séricos de citocinas, conforme protocolo de ensaio imunológico descrito adiante. Todos os dados foram armazenados em banco de dados único e específico.

5.2 Cenário do estudo

O recrutamento de pacientes foi realizado no Centro de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes (HEM), que atende pacientes de Minas Gerais e de estados próximos. Possui equipe multidisciplinar que inclui médicos dermatologistas e hansenólogos, oftalmologistas, fisioterapeutas, psicólogos e assistentes sociais. O serviço é credenciado como Centro de Referência Macrorregional em Hanseníase pelo Ministério da Saúde e atende dermatoses em geral, prioritariamente aquelas de interesse sanitário.

5.3 População estudada

Participaram deste estudo indivíduos de ambos os sexos, sendo estes, pacientes casos novos que apresentavam as formas polares da hanseníase, diagnosticados no Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do HEM ou referenciados e indivíduos não infectados, utilizados como grupo controle. As formas clínicas de todos pacientes com hanseníase foram determinadas segundo os critérios propostos por Ridley e Jopling (1966).

Durante a avaliação clínica, buscou-se a presença de lesões de pele e, nestas, foram avaliadas características morfológicas e a presença ou ausência de sensibilidade. Todos os pacientes foram examinados pela Dra. Sandra Lyon, médica dermatologista com mais de 30 anos de experiência na área de Dermatologia Sanitária responsável pelo atendimento clínico destes pacientes.

Na avaliação histopatológica, realizaram-se biópsias da lesão cutânea para caracterização histológica. A classificação histológica foi posteriormente realizada pelo Dr. Moisés Salgado Pedrosa, especialista em patologia pela Sociedade Brasileira de Patologia.

Os participantes que compõe este estudo foram distribuídos em três grupos:

- ✓ **Polo TT:** Pacientes classificados como TT e DT, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley-Jopling (1966).
- ✓ **Polo VV:** Pacientes classificados como DV e VV, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley-Jopling (1966).
- ✓ **NI:** Indivíduos não infectados, sem sinais clínicos da doença e que não mantêm convívio com pacientes com diagnóstico positivo para hanseníase e não tenha realizado esforço físico intenso recente.

Desta forma, este estudo foi composto por 36 indivíduos, dos quais 12 compuseram o grupo dos não infectados (NI), 10 compuseram o Polo TT e 14 o Polo VV. A caracterização de cada grupo, segundo as variáveis clínicas, está descrita na Tabela 1.

TABELA 1 – Caracterização da população estudada

Grupo	Total de Indivíduos	Percentual	Gênero (F / M)	Faixa Etária	Média	Mediana
NI	12	33	7 / 5	26 – 61	38	35
Polo TT	10	28	6 / 4	31 – 60	47	49
Polo VV	14	39	8 / 6	26 – 65	50	53
TOTAL	36	100	21 / 15	26 – 65	45	47

FONTE: Dados da pesquisa (2016)

5.4 Critérios de inclusão

- ✓ Casos novos de hanseníase virgem de tratamento de ambos os sexos, diagnosticados no Serviço de Dermatologia do HEM da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais ou referenciados ao mesmo;
- ✓ Idade entre 18 e 65 anos;
- ✓ Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.5 Critérios de exclusão

- ✓ Paciente imunossuprimidos;
- ✓ Paciente portador de outras doenças infecciosas ou de natureza autoimune;
- ✓ Pacientes com surto reacional no momento da coleta sanguínea;
- ✓ Abandono ou interrupção do tratamento.

5.6 Fluxograma

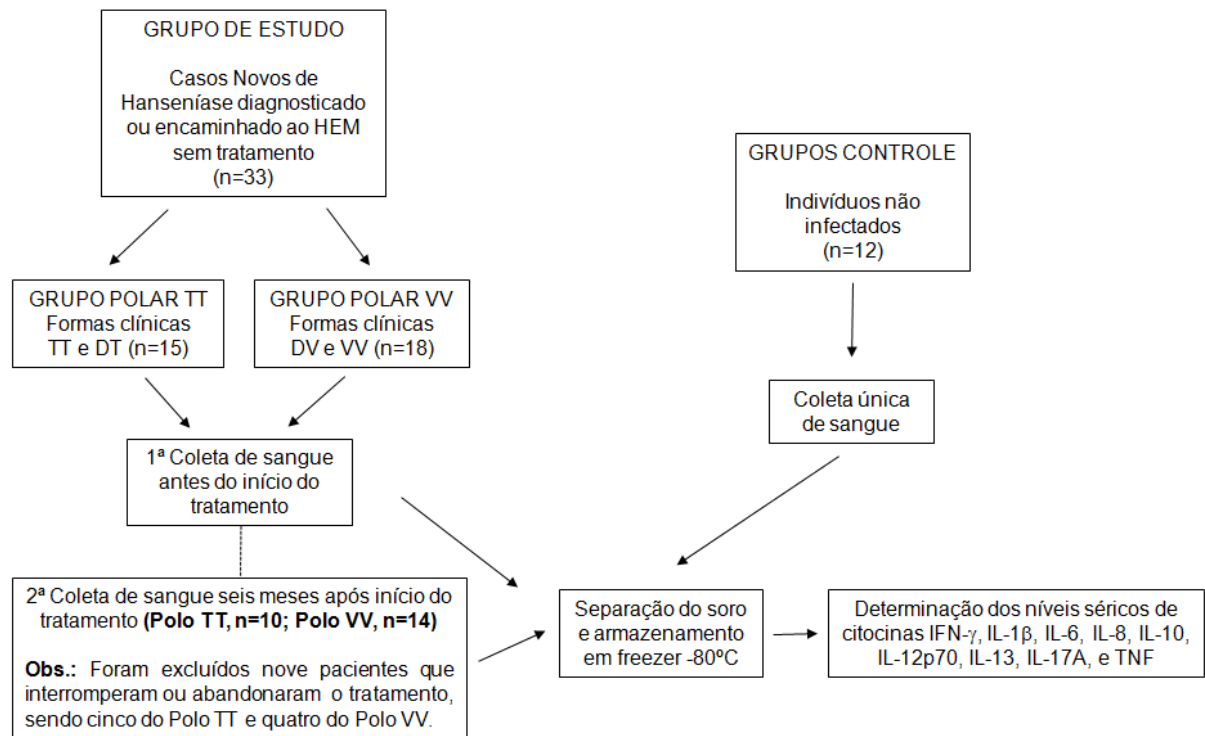


FIGURA 3: Delineamento do estudo.

5.7 Cálculo do tamanho amostral

Segundo Cohen (1992), o poder de um teste estatístico corresponde à probabilidade de rejeitar corretamente a hipótese nula e depende de três aspectos, incluindo o tamanho do efeito, o nível de significância e o tamanho da amostra. Neste estudo, o tamanho do cálculo amostral foi estimado através do *software G*Power* (versão 3.1), sendo utilizado o teste *t* bicaudal entre duas amostras, onde o *N* amostral mínimo necessário para que se obtenha uma diferença significativa foi de 10 participantes por grupo. Considerou-se o nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$), poder do estudo de 80% ($\beta = 0,20$), tamanho de efeito de 1,4 e desvio padrão de 3,13.

5.8 Elaboração do banco de dados

Foi elaborado um banco de dados específico a partir do prontuário dos pacientes selecionados no Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do HEM, juntamente com os resultados de classificação dos casos de hanseníase por critérios clínico/epidemiológico, bacteriológico (índice baciloscópico), teste sorológico (ML Flow) e histopatológico. A partir desse banco de dados foram realizados os estudos de associação entre perfil de citocinas séricas e o grau de morbidade na hanseníase.

5.9 Procedimento da coleta de dados

Todos os pacientes diagnosticados com hanseníase foram submetidos ao exame dermatoneurológico, realizado rotineiramente na avaliação da sensibilidade tátil em lesões cutâneas, mãos e pés. A avaliação dermatoneurológica e os testes de sensibilidade foram realizados por dermatologista e fisioterapeutas com comprovada experiência no diagnóstico clínico de hanseníase. Os pacientes com hanseníase realizaram o exame de baciloscopia, onde se utilizou o IB, conforme escala logarítmica de Ridley, que varia de zero a seis, através da coleta de esfregaço dérmico em quatro sítios: lesão cutânea, cotovelo contralateral à lesão e dois lóbulos auriculares. O teste ML Flow foi utilizado, em todos os pacientes, como ferramenta auxiliar na definição das formas clínicas, sendo registrado de modo qualitativo (positivo ou negativo). A cada participante do estudo foi apresentado o TCLE (ANEXO I) e, mediante concordância em participar da pesquisa, foram submetidos à coleta de sangue e consulta de prontuário dos pacientes.

5.10 Dosagem de citocinas séricas

Para determinação do nível de citocinas séricas, amostras de sangue foram coletadas a vácuo, em tubos de 10 mL sem anticoagulante (*Vacutainer – BD, USA*) e centrifugados a 400g, por 40 minutos, a 18°C. Após a centrifugação, o soro foi

aliquotado e mantido a -80°C até a realização dos experimentos.

Os níveis séricos de citocinas foram quantificados no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ), utilizando-se o sistema de ensaio com microesferas fluorescentes *BD CBA Flex Set* de acordo com a metodologia sugerida pelo fabricante. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas de interesse no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Nesta técnica, empregou-se a mistura de nove esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal de fluorescência 3 (FL-3) ou fluorescência 4 (FL-4). Desta forma, alíquotas de 25 μL de soro, alíquotas de 25 μL dos padrões de citocinas, foram submetidos à diluição seriada com diluente G (*Top Standard* – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 μL de diluente G apenas (Controle Negativo). Após esta etapa, as amostras foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (*Falcon* – *BD, USA*). Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 15 μL da mistura de esferas de captura, conjugadas a anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, com subsequente incubação por 90 minutos, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μL da solução F (tampão de lavagem do kit CBA), centrifugadas a 600g, por 10 minutos, a 18°C e o sobrenadante, cuidadosamente, aspirado e descartado. As esferas foram então incubadas novamente na presença de 20 μL do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas, conjugadas com Ficoeritrina (PE) por 90 minutos, temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 μL da solução F, centrifugados a 600g, por 10 minutos a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. Após a centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 μL de reagente F e o conteúdo, de cada tubo, transferido para uma placa de fundo chato com 96 poços. A placa foi imediatamente analisada no citômetro de fluxo (*FACSVerse* – *BD, USA*).

Para aquisição dos dados obtidos, o aparelho foi ajustado utilizando o *BD FCAP Array Software* e o *BD Calibrate Beads*. O objetivo do ajuste do aparelho

consiste em definir os parâmetros de tamanho e granulosidade adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) *versus* granulosidade (*Side Scatter* - SSC). Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade da fluorescência detectada no canal de FL-3 para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 2700 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada). As análises do perfil de citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF nos soros foram realizadas segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do *BD CBA Analysis Software*, com auxílio do *Microsoft Excel*, modificado como descrito a seguir. O programa *BD CBA Analysis* faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade (FIGURA 4A). Em seguida, o programa separa as esferas em função da intensidade da FL-3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL-2) em gráficos bidimensionais de FL-2 *versus* FL-3 (FIGURAS 4B e 4C). A ligação da citocina, presente na amostra de interesse à esfera de captura e a revelação da ligação através do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas marcadas com o fluorocromo PE (FL-2), pode ser evidenciada através do deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior intensidade de fluorescência em relação ao tubo controle negativo, sem amostra (FIGURAS 4B e 4C). Os valores correspondentes à intensidade média de FL-2 na escala logarítmica foram utilizados como unidade de análise semiquantitativa para cada citocina analisada.

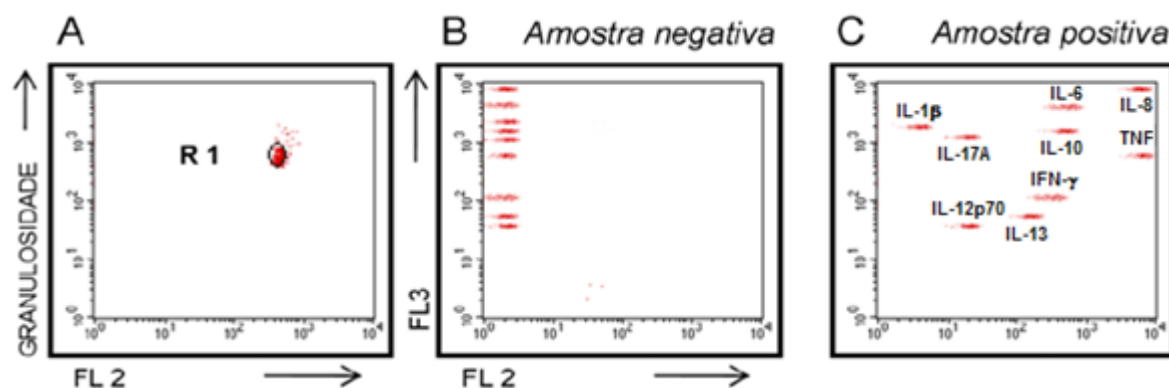


FIGURA 4: Análise quantitativa de citocinas séricas utilizada pelo *BD CBA Analysis Software*. Inicialmente o programa promove a seleção automática da população de esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade (Figura 4A). Em seguida, separa as esferas e analisa a intensidade de fluorescência correspondente ao complexo esfera-citocina-anticorpo PE (Figuras 4B e 4C).

5.11 Dosagem de citocinas séricas

A assinatura das citocinas séricas (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF) foi montada conforme descrito previamente por Campi-Azevedo *et al.*, (2012). A frequência de "altos" e "baixos" produtores foi definida de acordo com os valores da mediana global. A mediana dos valores de todo o conjunto de dados foi calculada para cada citocina e utilizada como ponto de corte de tal forma que os pacientes com resultados para uma determinada citocina maior ou igual ao valor da mediana global foram classificados como "altos produtores", ao passo que os pacientes com resultados abaixo da mediana global foram classificados como "baixos produtores". Cada conjunto de dados foi montado em diagramas em cinza e branco, a fim de calcular a frequência de "altos" e "baixos" produtores dentro de cada grupo clínico. As frequências foram consideradas relevantes quando mais de 50% do grupo de estudo era constituído por "altos produtores". A seguir, a assinatura de citocinas ascendentes para os grupos NI, TT e VV foram montadas e sobrepostas para apontar em cada grupo clínico os biomarcadores com níveis relevantes de "altos produtores" ($\geq 50\%$).

5.12 Análise das correlações dos biomarcadores

As redes de biomarcadores foram montadas para verificar as possíveis associações existentes entre as citocinas séricas para cada grupo clínico. O teste de correlação de Spearman foi realizado para avaliar a associação entre os níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, expressas em picograma por mililitro (pg/mL), sendo considerados apenas os valores de $p < 0,05$, que foram transferidos para uma matriz de correlação. Esta matriz foi utilizada, para calcular a intensidade da correlação e caracterizá-la como positiva ou negativa. A fim de melhor representar a interatividade entre as citocinas testadas, utilizou-se o *software open source Cytoscape* (versão 2.8) para compor as redes de interações entre estas biomoléculas. Conforme proposto por Taylor (1990), utilizou-se linhas para destacar as interações entre as moléculas testadas, onde (---) representa as conexões negativas, (—) conexões moderadas e (—) conexões fortes.

5.13 Análise estatística

Para determinar se os dados de citocinas, obtidos neste estudo, eram paramétricos ou não paramétricos, aplicou-se o Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, onde observou a não normalidade dos dados. Portanto, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, que leva em consideração a mediana para realizar comparações para mais de dois grupos, foi realizado nas comparações entre os grupos NI, Polo TT e Polo VV, juntamente com pós-teste de Dunn. Para as análises de correlações entre as citocinas séricas, realizou-se o cálculo do r de Spearman, sendo selecionados apenas os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Para a comparação dos dados entre as formas polares da Hanseníase Polo TT e Polo VV, antes e seis meses após o início do tratamento poliquimioterápico, aplicou o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas.

5.14 Aspectos éticos

Este estudo faz parte da pesquisa intitulada “Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo *M. leprae* e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase”, que foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), conforme Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº **14887414.0.0000.5149** (ANEXO II). Participou do estudo aquele que concordou mediante assinatura do TCLE, após ter sido informado quanto aos objetivos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, sendo garantida a liberdade de cada participante em permanecer ou não no estudo em todas as suas etapas. Este projeto atende o que preconiza a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e obteve o consentimento institucional do HEM.

6 RESULTADOS

Para avaliar o perfil de citocinas séricas de pacientes com formas polares da hanseníase (Polo TT e Polo VV), antes e seis meses após o início do tratamento poliquimioterápico foram excluídos os pacientes que interromperam ou abandonaram o tratamento durante os seis meses de acompanhamento (5 pacientes do Polo TT e 4 do Polo VV). Portanto, os dados gerados neste estudo compreendem os resultados apresentados por 24 pacientes com hanseníase (10 do Polo TT e 14 do Polo VV) e 12 indivíduos não infectados, utilizados como grupo controle. Estes dados serão apresentados em duas partes.

A primeira parte constitui-se dos dados englobando toda a população de estudo (36 indivíduos), onde os resultados serão mostrados na seguinte ordem: **a)** análises descritivas da população de estudo; **b)** análise do perfil de citocinas séricas de pacientes com as formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados; **c)** análise da assinatura dos biomarcadores; **d)** análise das correlações dos biomarcadores.

Na segunda parte o trabalho teve como objetivo averiguar o impacto do tratamento sobre o perfil de citocinas séricas entre as formas polares da hanseníase (Polo TT e Polo VV), seis meses após inicia-se o tratamento.

6.1 Análises descritivas da população estudada

Participaram deste estudo, pacientes casos novos que apresentavam as formas clínicas da hanseníase TT e DT (Polo TT, n= 10) e as formas DV e VV (Polo VV, n= 14), juntamente com indivíduos não infectados (NI, n= 12), totalizando 36 indivíduos (TABELA 1). Observou-se maior representação numérica dos pacientes alocados no Polo VV (39%), frente aos demais grupos.

A análise descritiva da população do estudo pode ser observada na Tabela 2, onde foram analisadas as variáveis clínicas: gênero, idade (faixa etária), número de lesões cutâneas e de nervos acometidos, grau de incapacidade física, índice baciloscópico (escalonado), resultados do teste ML Flow e a classificação operacional, conforme OMS (2002), as quais foram coletadas no prontuário médico dos participantes. Após análise dos dados, observou-se maior prevalência de participantes do gênero feminino na maioria dos grupos ($\pm 60\%$). A idade geral dos participantes variou de 26 a 65 anos, sendo mais incidente na faixa etária de 46-55 para o Polo TT (60%), de 56-65 para o Polo VV (50%) e de 25-35 anos para os não infectados (50%). Quanto às variáveis clínicas, as mesmas foram avaliadas apenas nos grupos polares, onde a classificação operacional predominante foi a MB (n=14), correspondendo a 58% dos casos novos (n=24). O índice baciloscópico, mostrou-se negativo (IB=0) em todos os pacientes do Polo TT, sendo positivo (IB>0) na maioria dos pacientes do Polo VV (n=10 / 71%). O número de lesões cutâneas ≤ 5 teve predomínio absoluto dentro do Polo TT (100%), ao contrário do Polo VV, onde predominou o número de lesões > 5 (79%). Já o número de nervos acometidos foi baixo (≤ 2) nos dois grupos de pacientes com hanseníase (Polo TT= 80% e Polo VV= 57%), assim como o grau de incapacidade física que foi zero na maior parte dos pacientes do Polo TT (90%) e do Polo VV (50%). Para os resultados de ML Flow, a soronegatividade foi unânime dentre os componentes do Polo TT, ao contrário do Polo VV, onde a maior parte dos pacientes (86%) apresentou resultado positivo para este teste.

TABELA 2 – Análise descritiva da população estudada

Variável	Polo TT n (%)	Polo VV n (%)	NI n (%)
Gênero			
Feminino	6 (60)	8 (57)	7 (58)
Masculino	4 (40)	6 (43)	5 (42)
Idade (anos)			
25-35	2 (20)	2 (14)	6 (50)
36-45	1 (10)	3 (21)	3 (25)
46-55	6(60)	2 (14)	1 (8)
56-65	1 (10)	7 (50)	2 (17)
Classificação operacional			
Paucibacilar	10 (100)	0 (0)	...
Multibacilar	0 (0)	14 (100)	...
Índice Baciloscópico			
0	10 (100)	4 (29)	...
0 + 2	0 (0)	1 (7)	...
2 + 4	0 (0)	5 (36)	...
4 + 6	0 (0)	4 (29)	...
Nº de lesões cutâneas			
≤5	10 (100)	3 (21)	...
>5	0 (0)	11 (79)	...
Nº de nervos acometidos			
<2	8 (80)	8 (57)	...
≥2	2 (20)	6 (43)	...
Incapacidade Física			
Grau 0	9 (90)	7 (50)	...
Grau I	0 (0)	2 (14)	...
Grau II	1 (10)	5 (36)	...
Teste ML Flow			
Negativo	10 (100)	2 (14)	...
Positivo	0 (0)	12 (86)	...

FONTE: Dados da pesquisa (2016)

6.2 Análise do perfil de citocinas séricas de pacientes com formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados

A quantificação das diferentes citocinas (IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF) foi avaliada no soro de indivíduos não infectados (NI) e

em pacientes recém-diagnosticados com hanseníase nas formas TT e DT (Polo TT) e nas formas DV e VV (Polo VV).

Em relação à produção de IL-6, os pacientes do Polo VV apresentaram níveis séricos significativamente mais elevados ($p=0,0095$), quando comparados tanto com os indivíduos do Polo TT quanto ao grupo NI (FIGURA 5B). Para as citocinas IL-1 β , IL-8 e TNF, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (FIGURA 5A, 5C e 5D).

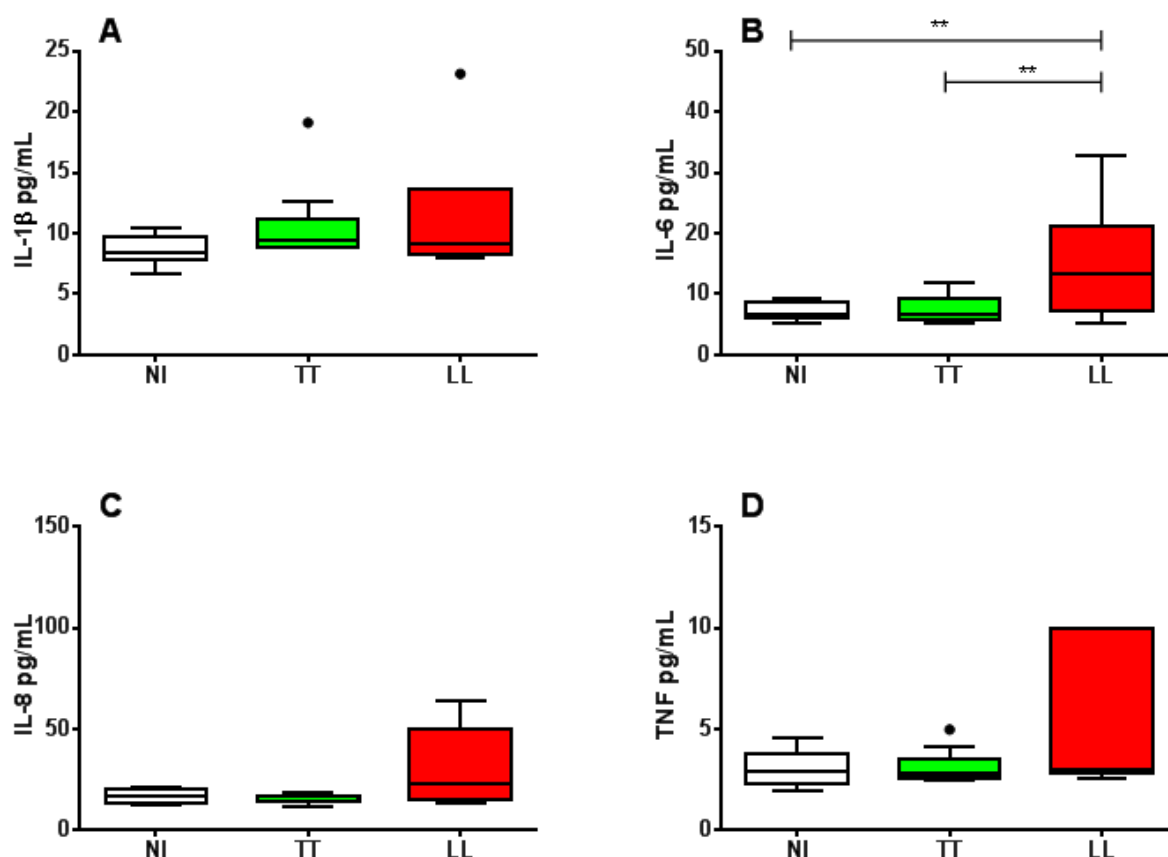


Figura 5: Análise dos níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14). Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) e representados em gráficos do tipo *boxplot* que destacam a mediana, os intervalos interquartis para cada grupo e os *outliers* (*). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas de conexão e pelos símbolos: (*) para p valor entre 0,01 a 0,05; (**) para p valor entre 0,001 a 0,01; (***) para p valor entre 0,0001 a 0,001 e (****) para p valor < 0,0001.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

De forma geral, observou-se que pacientes com hanseníase apresentam níveis séricos significativamente mais altos de IFN- γ ($p < 0,0001$), quando comparados ao grupo de indivíduos não infectados (FIGURA 6B). Entretanto, não

foram observadas diferenças significativas entre os grupos polares (Polo TT e Polo VV). Para as citocinas IL-12p70 e IL17A, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estudados (FIGURA 6A e 6C).

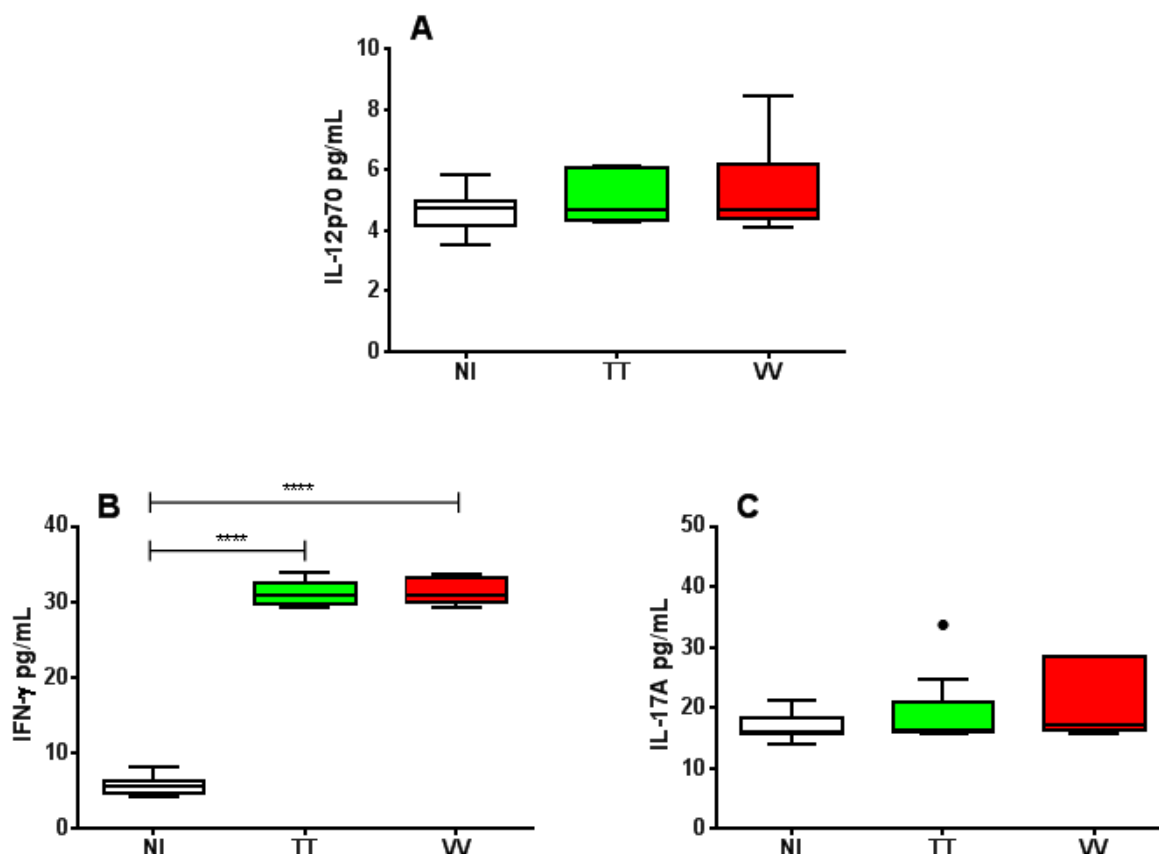


Figura 6: Análise dos níveis séricos das citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-17A mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em indivíduos não infectados (NI, $n = 12$) e em pacientes do Polo TT ($n = 10$) e do Polo VV ($n = 14$). Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) e representados em gráficos do tipo *boxplot* que destacam a mediana, os intervalos interquartis para cada grupo e os *outliers* (•). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas de conexão e pelos símbolos: (*) para p valor entre 0,01 a 0,05; (**) para p valor entre 0,001 a 0,01; (***) para p valor entre 0,0001 a 0,001 e (****) para p valor $< 0,0001$.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

A análise dos dados mostrou que tanto paciente do Polo TT quanto do Polo VV apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-10 ($p < 0,0001$), em comparação ao grupo NI (FIGURA 7B). Na comparação entre os dois polos da hanseníase (Polo TT e Polo VV) não foram observados diferenças significativas.

Para a citocina IL-13, não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados (FIGURA 7A).

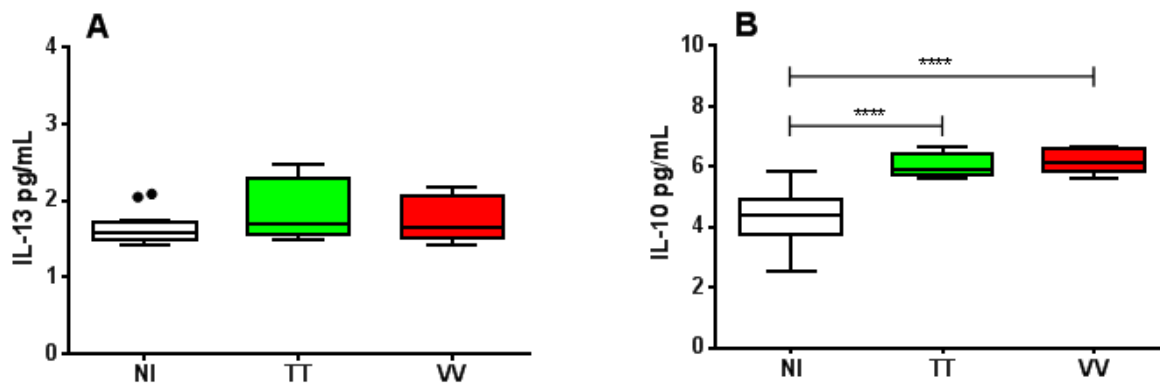


Figura 7: Análise dos níveis séricos das citocinas IL-13 e IL-10 mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14). Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) e representados em gráficos do tipo *boxplot* que destacam a mediana, os intervalos interquartis para cada grupo e os *outliers* (*). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas de conexão e pelos símbolos: (*) para p valor entre 0,01 a 0,05; (**) para p valor entre 0,001 a 0,01; (***) para p valor entre 0,0001 a 0,001 e (****) para p valor < 0,0001.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

6.3 Análise da assinatura dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes com formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados

Para delinear o perfil em “alto” ou “baixo” produtor das citocinas avaliadas, estruturou-se a assinatura dos biomarcadores a partir do cálculo da mediana global para cada biomarcador. Estes valores foram utilizados como ponto de corte de tal forma que indivíduos com níveis séricos de citocina acima desta mediana global foram considerados “altos produtores”. Cada conjunto de dados foi montado em diagramas em cinza e branco, a fim de calcular a frequência de “altos produtores” e “baixos produtores” dentro de cada grupo estudado (FIGURA 8). Considerou-se que as frequências relevantes foram aquelas onde mais de 50% do grupo de estudo era formado por “altos produtores”. É importante ressaltar que o conceito de “alto” e “baixo” produtor aplica-se apenas a este conjunto de dados e os valores da mediana global só devem ser considerados como limiar para esta população de estudo específica. A seguir, montou-se a assinatura ascendente de citocinas séricas dos

grupos NI, Polo TT e Polo VV, sobrepondo-as para indicar em cada um dos grupos, aquelas com altos níveis ($\geq 50\%$), sendo destacadas em negrito e por retângulos (FIGURA 9). Desta forma, esta estratégia de análise permitiu observar que, para grupo de indivíduos não infectados, nenhuma das citocinas avaliadas obteve frequências acima de 50%, ou seja, todas as citocinas analisadas nos indivíduos do grupo NI estão dentro de “baixos produtores”. Por outro lado, ao observar a produção de citocinas no Polo TT, verificou-se destaque da IL-1 β (70%), seguido respectivamente dos níveis de IFN- γ (60%), IL-10 (60%) e IL-13 (50%). Enquanto o Polo VV obteve frequências relevantes para quase todas as citocinas, com destaque para produção de IL-10 (79%), seguido respectivamente dos níveis de IL-6, IFN- γ , IL-8 e IL-17A (71%), TNF (64%), IL-1 β e IL-13 (50%).

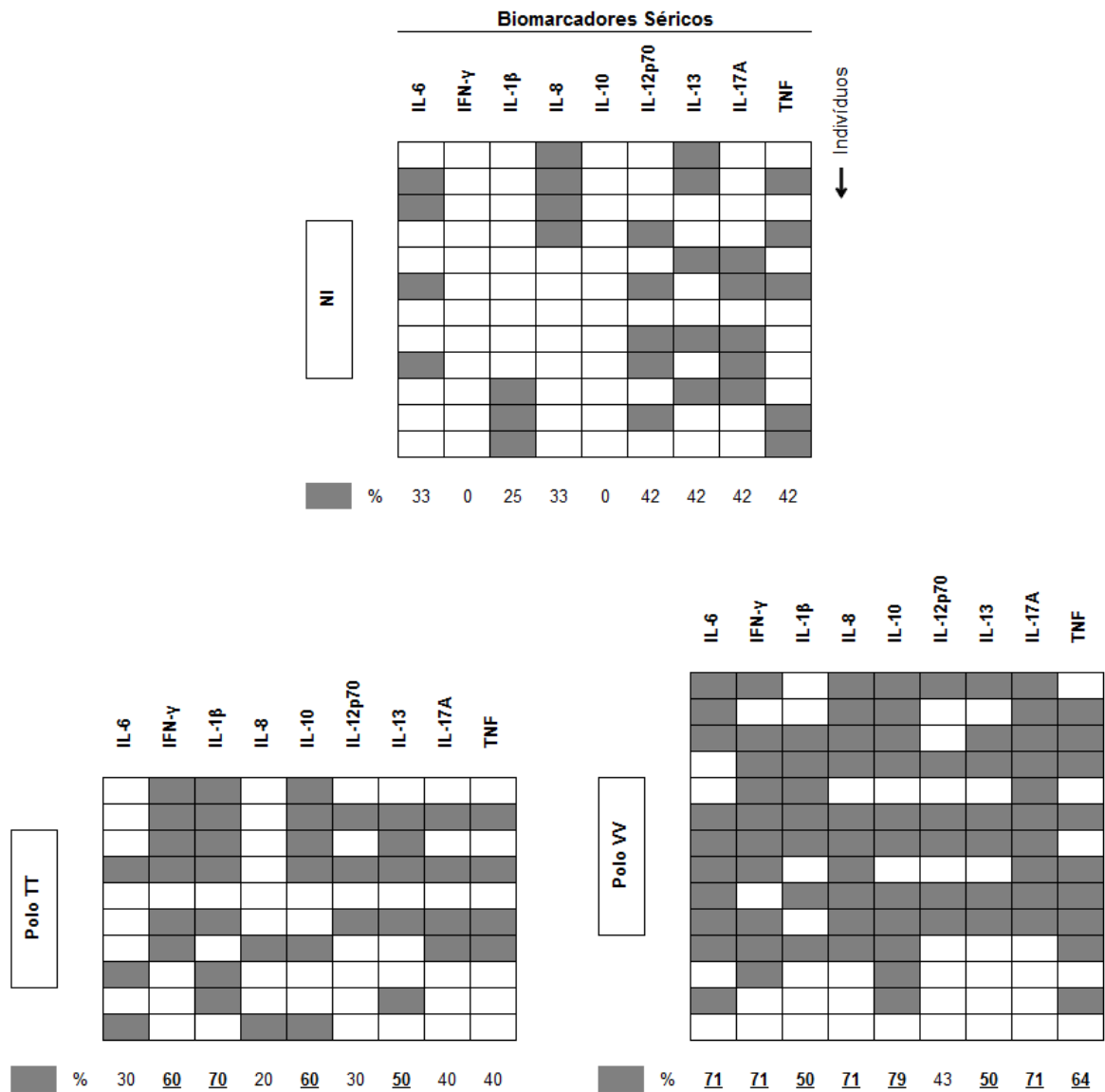


Figura 8: Assinatura geral de citocinas séricas – frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14). Diagramas em cinza e branco foram usados para calcular a frequência final de "altos produtores" em cada grupo. Frequências relevantes dos "altos produtores" ($\geq 50\%$) são destacadas em negrito sublinhado. Os indivíduos foram classificados como baixos produtores (branco) ou altos produtores (cinza) com base em seus níveis de biomarcadores séricos, de acordo com a distribuição mediana dos dados globais.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

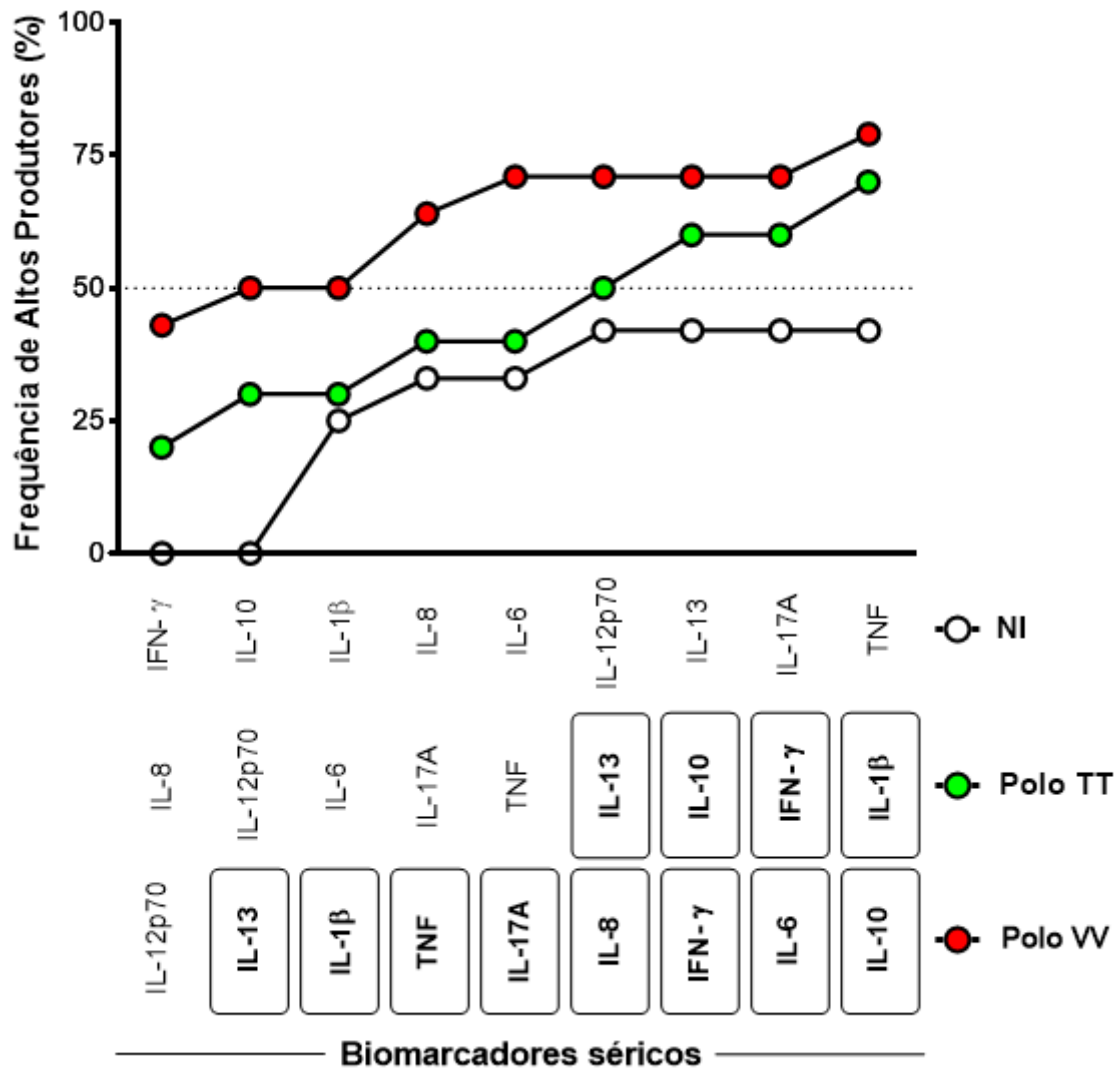


Figura 9: Assinatura ascendente de citocinas séricas – curva ascendente da frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em indivíduos não infectados (NI, n = 12) e em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14). Sobreposição de assinatura de citocinas ascendentes foi montada e as citocinas com frequência maior ou igual ao percentil 50 são destacadas em negrito e por retângulos no painel abaixo da curva. A linha pontilhada no gráfico evidencia o percentil 50.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

6.4 Análise das correlações dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes com formas polares da hanseníase e indivíduos não infectados

Foi construída uma rede de biomarcadores para avaliar as associações entre citocinas séricas dentro de cada grupo. Calculou-se o coeficiente de correlação de

Spearman, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Utilizou-se o índice de correlação para caracterizar a força das correlações como: negativa ($r < 0$), moderada ($0,36 > r < 0,67$) e forte ($r > 0,68$) (TAYLOR, 1990). Para a análise de dados, utilizou-se o *software Prisma 5.0 (San Diego, USA)* na criação das matrizes de correlação (ANEXO III) e o *Cytoscape (versão 2.8)* na elaboração das redes, como uma representação da correlação entre as citocinas avaliadas (FIGURA 10).

O Anexo III apresenta as matrizes de correlação utilizadas neste estudo para estabelecer as interações e a força das correlações entre as citocinas séricas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, onde os valores destacados com retângulos e em negrito correspondem aos valores dos coeficientes de correlação de Spearman que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Figura 10 demonstra a análise das correlações dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF entre os grupos estudados.

A análise dos dados de indivíduos não infectados mostrou correlação negativa, moderada e significativa entre as citocinas IL-10 e IL-13 ($p = 0,049$). Houve correlação significativa, moderada e positiva entre as moléculas IL-10 e TNF ($p = 0,009$) e entre as moléculas IL-10 e IL-12p70 a correlação se mostrou forte, significativa e positiva ($p = 0,028$).

Quanto à avaliação do Polo TT, observou-se a presença de correlações positivas, moderadas e significativas entre as citocinas séricas IFN- γ e TNF ($p = 0,037$) e entre IL-12p70 e IL-17A ($p = 0,038$). E correlações fortes, positivas e significativas foram observadas entre as citocinas IFN- γ e IL-17A ($p = 0,027$); IL-17A e TNF ($p = 0,006$); IL-13 e IL-1 β ($p = 0,022$) e entre as citocinas IL-12p70 e IL-13 ($p = 0,030$).

Na avaliação do Polo VV, observou-se correlação significativa e positiva entre quase todos os biomarcadores séricos analisados, com exceção apenas das moléculas IFN- γ e IL-8. Estas correlações foram moderadas entre as citocinas IL-10 e TNF ($p = 0,028$); IL-10 e IL-6 ($p = 0,031$); IL-1 β e IL-12p70 ($p = 0,044$); IL-1 β e IL-13 ($p = 0,035$); IL-1 β e TNF ($P = 0,044$); TNF e IL-6 ($p = 0,024$) e entre as citocinas TNF e IL-17A ($p = 0,013$). Observou-se também, correlações fortes entre as moléculas IL-1 β e IL-17A ($p < 0,001$) e entre IL-12p70 e IL-13 ($p = 0,002$).

Em suma, observou-se que os indivíduos NI e pacientes do Polo TT apresentam poucas interações entre as citocinas estudadas, e que os pacientes do Polo VV apresentam intensas interações, especialmente as citocinas avaliadas, entretanto ainda apresentam resposta imune inflamatória modulada, evidenciada pela correlação entre a IL-10 e as moléculas TNF e IL-6. Neste sentido, nota-se o Polo VV é mais ativado do que o Polo TT, embora o Polo TT apresente uma microrrede que se destaca (TNF, IFN- γ e IL-17A) e que pode ser importante no desencadeamento de uma resposta imune mais efetiva durante a infecção.

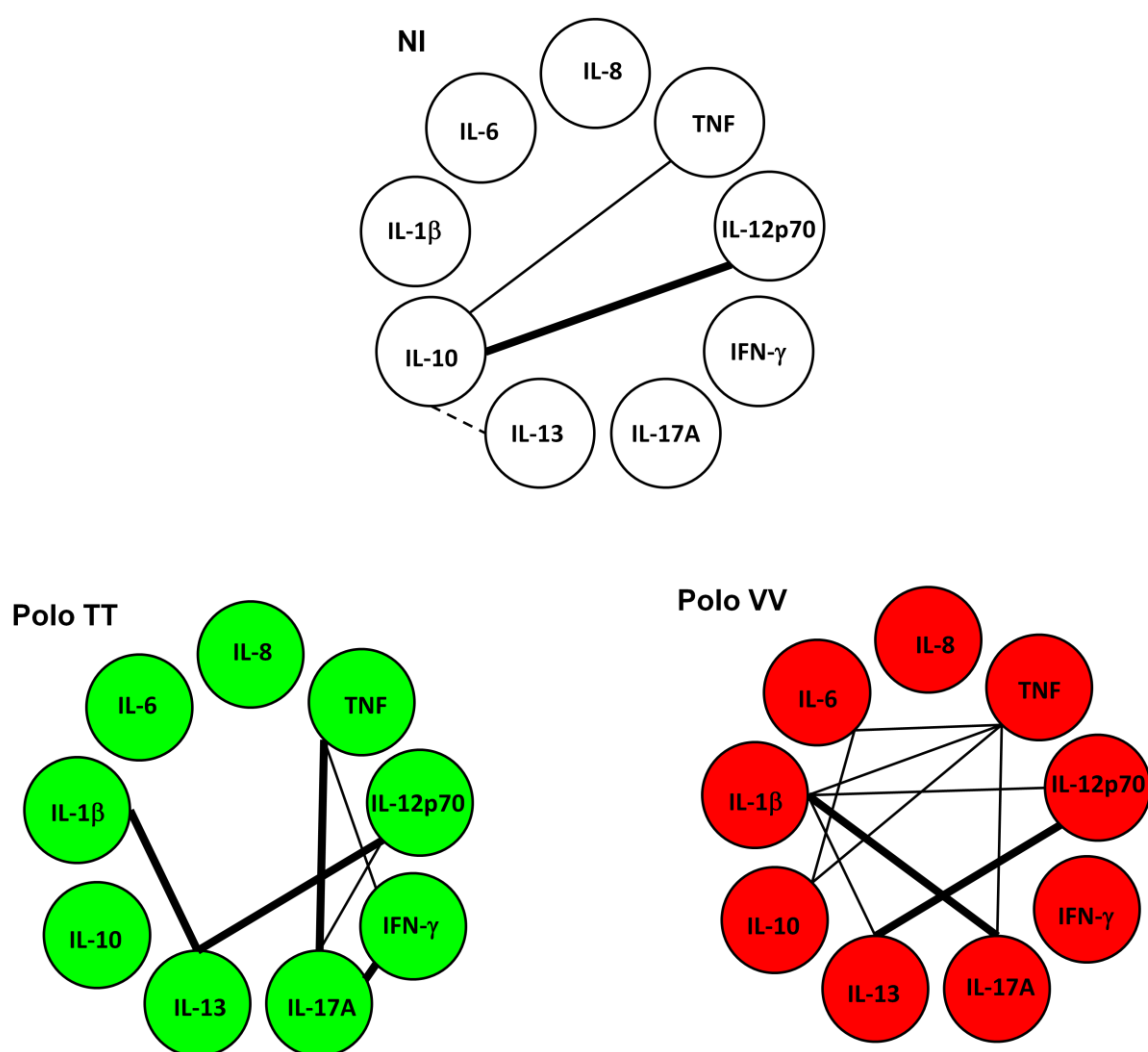


Figura 10: Rede de biomarcadores séricos para indivíduos não infectados (NI, n = 12) e pacientes recém-diagnosticados com hanseníase nas formas polares Polo TT (n = 10) e Polo VV (n = 14). As linhas destacam interações entre as citocinas séricas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, onde (---) representa as conexões negativas, (—) conexões moderadas e (—) conexões fortes.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

6.5 Análise do perfil de citocinas séricas de pacientes do Polo TT e do Polo VV antes e seis meses após início da PQT

Com o objetivo de avaliar o impacto da PQT sobre o perfil de citocinas séricas foram quantificados os níveis IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF no soro de 24 pacientes recém-diagnosticados com hanseníase, sendo 10 com as formas TT e DT (Polo TT) e 14 com as formas DV e VV (Polo VV), antes e seis meses após o início do tratamento poliquimioterápico.

A análise dos dados pareados mostrou diminuição significativa dos níveis séricos de IL-6 ($p=0,0245$) nos pacientes do Polo VV, seis meses após início da PQT. Enquanto nos pacientes do Polo TT não foi observado nenhuma alteração significativa nos níveis sérios de IL-6 (FIGURA 11B). Para as citocinas IL-1 β , IL-8 e TNF, não foram observados a presença de diferença significativa na comparação de cada grupo, antes e seis meses após início do tratamento (FIGURA 11A, 11C e 11D).

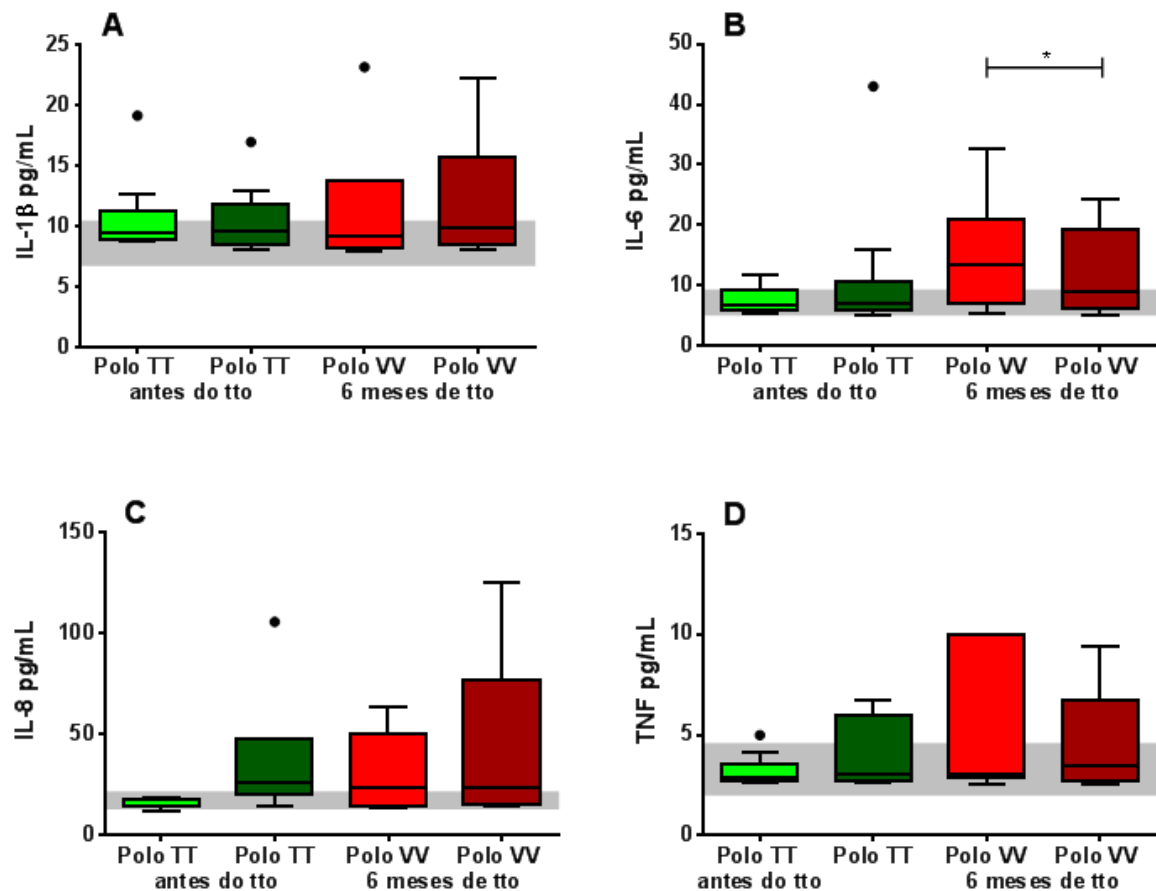


Figura 11: Análise dos níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento. Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) e representados em gráficos do tipo *boxplot* que destacam a mediana, os intervalos interquartis para cada grupo e os *outliers* (•). Retângulos em cinza demonstram a gama de concentrações observadas no soro de indivíduos não infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas de conexão e pelos símbolos: (*) para p valor entre 0,01 a 0,05; (**) para p valor entre 0,001 a 0,01; (***) para p valor entre 0,0001 a 0,001 e (****) para p valor < 0,0001.

FONTE: Dados da pesquisa (2016)

Após seis meses de PQT, pacientes do Polo TT demonstraram níveis sérios significativamente mais elevados de IFN- γ ($p = 0,0391$) em comparação com os níveis de antes do início do tratamento. Entretanto nos pacientes do Polo VV, não se observou diferença significativa desta citocina seis meses após início da PQT (FIGURA 12B). Para as citocinas IL-12p70 e IL-17A, não foram observados a presença de diferença significativa na comparação de cada grupo, antes e seis meses após o início do tratamento (FIGURA 12A e 12C).

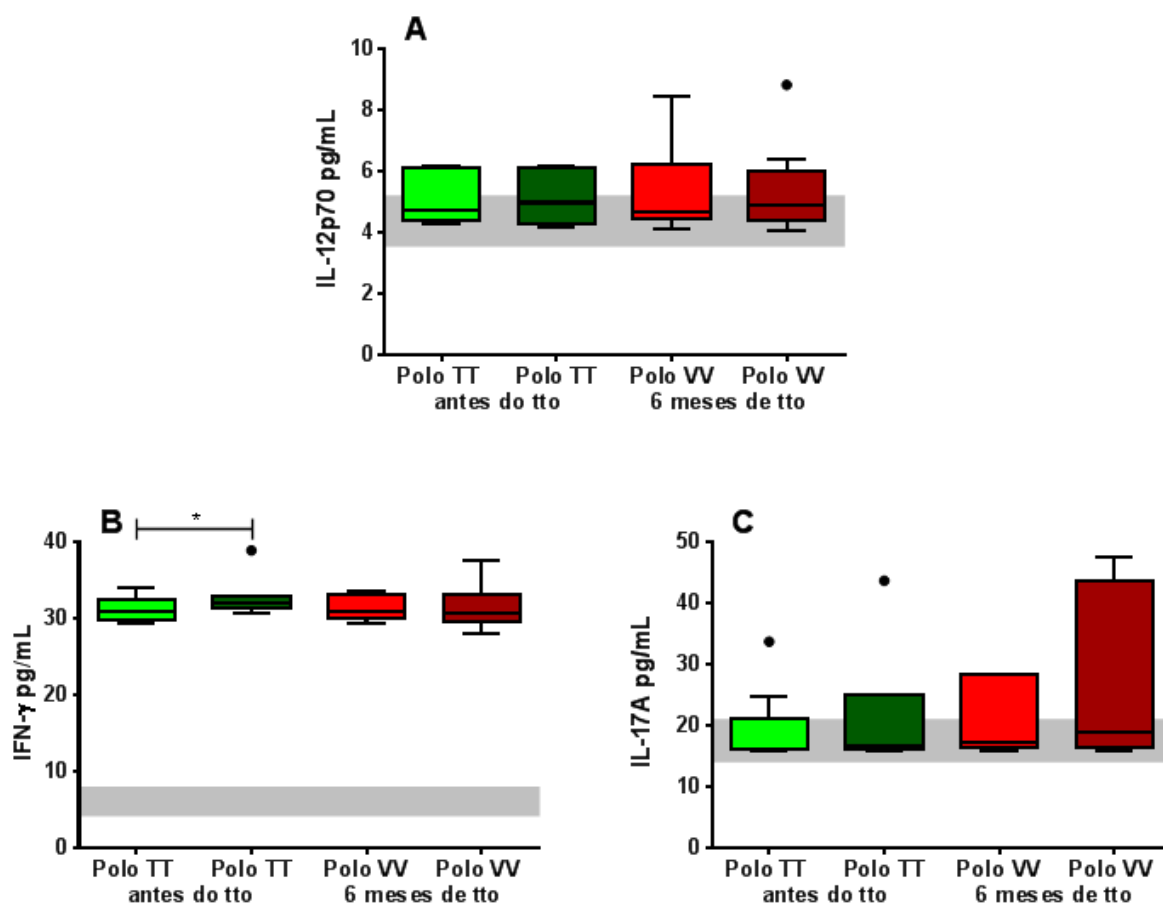


Figura 12: Análise dos níveis séricos das citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-17A mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento. Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) e representados em gráficos do tipo *boxplot* que destacam a mediana, os intervalos interquartis para cada grupo e os *outliers* (•). Retângulos em cinza demonstram a gama de concentrações observadas no soro de indivíduos não infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas de conexão e pelos símbolos: (*) para p valor entre 0,01 a 0,05; (**) para p valor entre 0,001 a 0,01; (***) para p valor entre 0,0001 a 0,001 e (****) para p valor $< 0,0001$.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

Na análise das citocinas IL-10 e IL-13, não foram observados a presença de diferença significativa na comparação pareada dos pacientes, antes e seis meses após o início do tratamento, em nenhum dos dois grupos avaliados (FIGURA 13A, 13B).

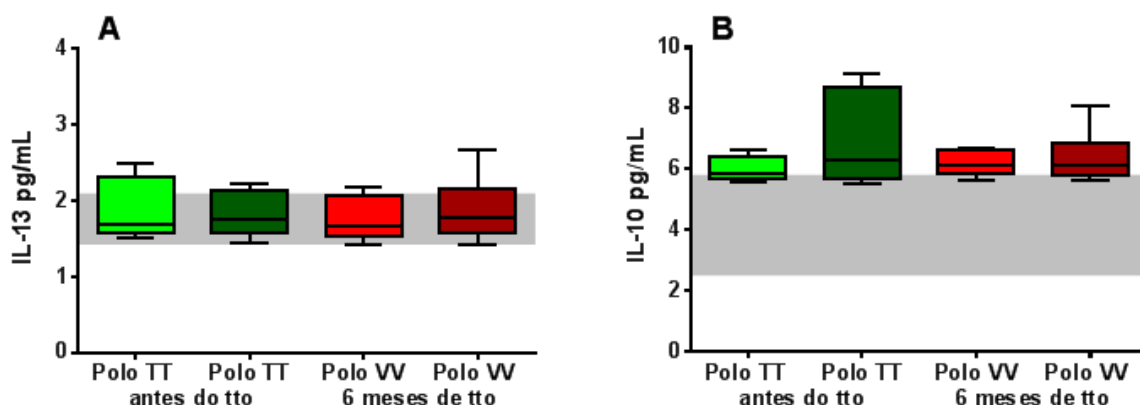


Figura 13: Análise dos níveis séricos das citocinas IL-13 e IL-10 mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento. Os resultados foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) e representados em gráficos do tipo *boxplot* que destacam a mediana, os intervalos interquartis para cada grupo e os *outliers* (•). Retângulos em cinza demonstram a gama de concentrações observadas no soro de indivíduos não infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por linhas de conexão e pelos símbolos: (*) para p valor entre 0,01 a 0,05; (**) para p valor entre 0,001 a 0,01; (***) para p valor entre 0,0001 a 0,001 e (****) para p valor < 0,0001.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

6.6 Análise da assinatura dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes do Polo TT e do Polo VV antes e seis meses após início da PQT

A análise dos dados demonstrou aumento na frequência de indivíduos considerados como “altos produtores”, seis meses após o início do tratamento, das citocinas séricas avaliadas (exceto IL-1 β) em pacientes do Polo TT, com destaque para IFN- γ que passou de 60% para 100% de “altos produtores”. Enquanto o Polo VV apresentou aumento na frequência de “altos produtores” para as citocinas IL-1 β , IL-12p70, IL-13 e IL-17A, seguido de decréscimo na frequência de “altos produtores” das citocinas IL-6, IL-8 e IFN- γ , seis meses após o início da PQT. Nesta mesma análise não foram observadas alterações na frequência dos “altos produtores” de IL-10 e TNF.

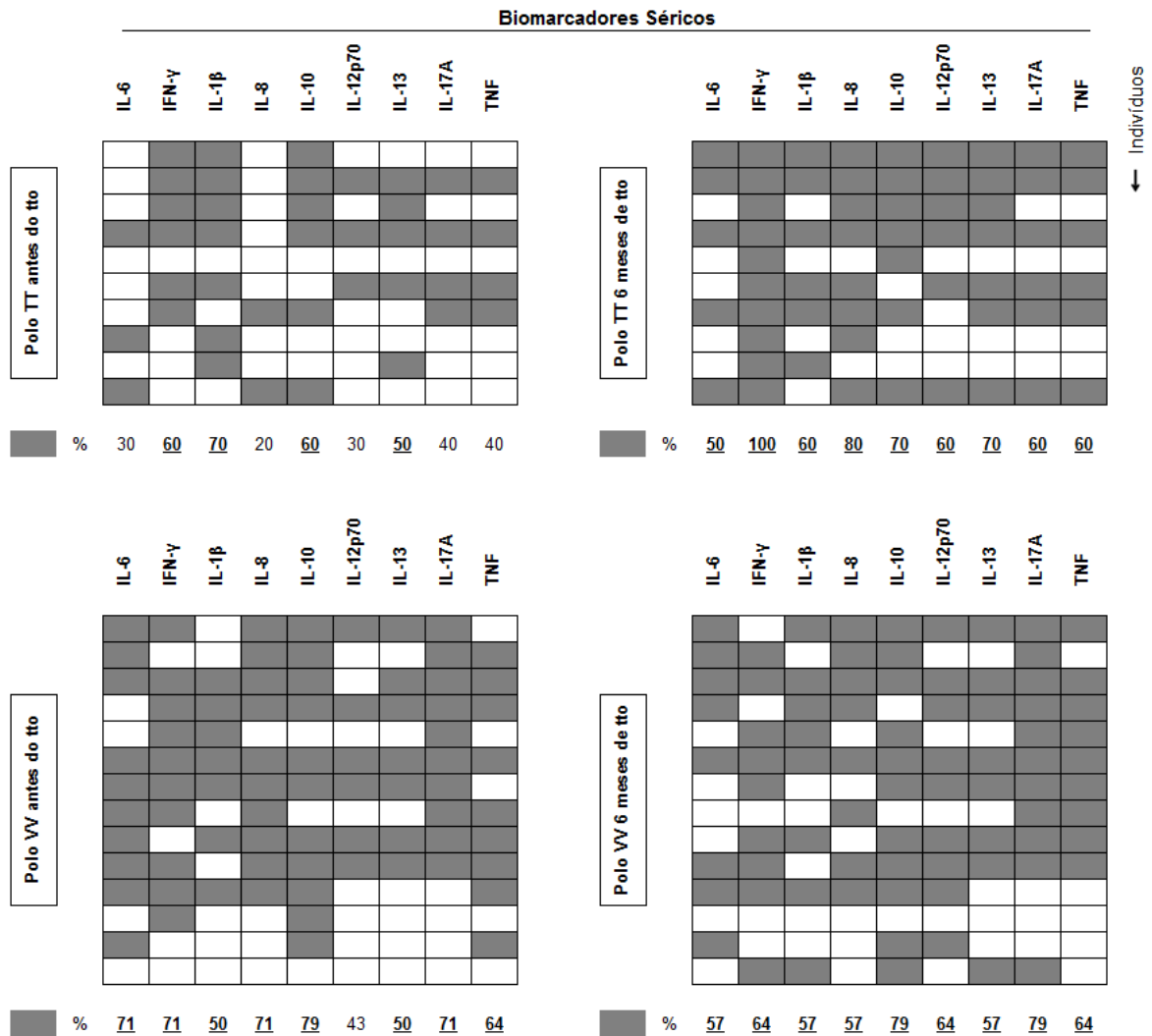


Figura 14: Assinatura geral de citocinas séricas – frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por Cytometric Bead Array (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento. Diagramas em cinza e branco foram usados para calcular a frequência final de "altos produtores" em cada grupo. Frequências relevantes dos "altos produtores" ($\geq 50\%$) são destacadas em negrito sublinhado. Os indivíduos foram classificados como baixos produtores (branco) ou altos produtores (cinza) com base em seus níveis de biomarcadores séricos, de acordo com a distribuição mediana dos dados globais.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

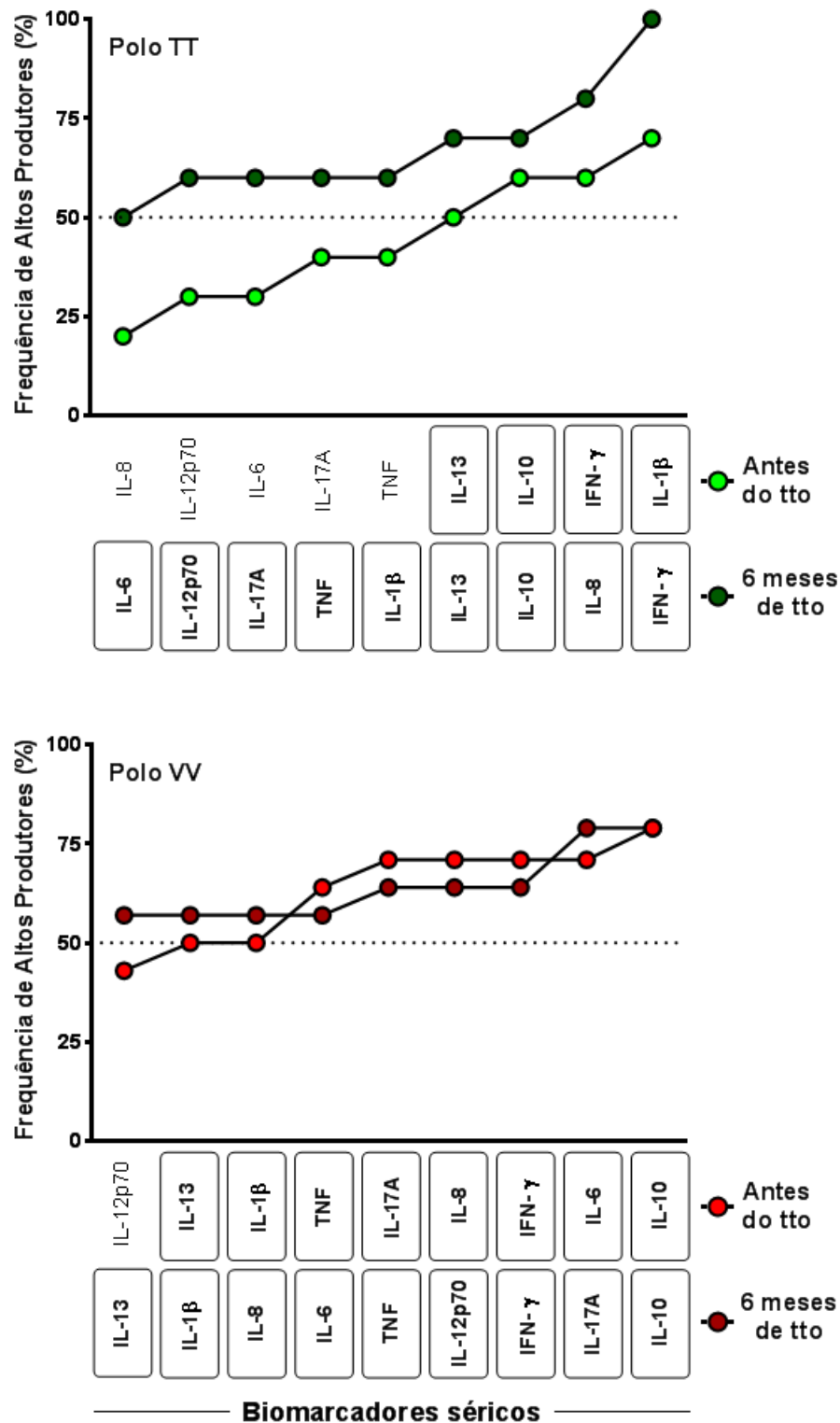


Figura 15: Assinatura ascendente de citocinas séricas – curva ascendente da frequência de "altos produtores" dos biomarcadores IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF mensurados por *Cytometric Bead Array* (CBA) em pacientes do Polo TT (n = 10) e do Polo VV (n = 14), antes e seis meses após início do tratamento. Sobreposição de assinatura de citocinas ascendentes foi montada e as citocinas com frequência maior ou igual ao percentil 50 são destacadas em negrito e por retângulos no painel abaixo da curva. A linha pontilhada no gráfico evidencia o percentil 50.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

6.7 Análise das correlações dos biomarcadores séricos IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF em pacientes do Polo TT e do Polo VV antes e seis meses após início da PQT

Para a análise de dados, utilizou-se o *software Prisma 5.0 (San Diego, USA)* na criação das matrizes de correlação (ANEXO IV) e o *Cytoscape (versão 2.8)* na elaboração das redes, como uma representação da correlação entre as citocinas avaliadas, antes e seis meses após início do tratamento poliquimioterápico (FIGURA 16).

O Anexo IV apresenta as matrizes de correlação utilizadas neste estudo para estabelecer as interações e a força das correlações entre as citocinas séricas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, antes e seis meses após início do tratamento poliquimioterápico, onde os valores destacados com retângulos e em negrito correspondem aos valores dos coeficientes de correlação de Spearman que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A análise dos dados de pacientes do Polo TT, seis meses após início da PQT, mostrou a perda das correlações significativas ($p < 0,05$) do IFN- γ com as citocinas IL-17A e TNF, juntamente com perda da interação IL-1 β e IL-13. Em contrapartida, observou-se a presença de correlações positivas, forte e significativas entre as citocinas IL-10 e IL-6 ($p = 0,017$). Também se observou a presença de novas correlações positivas, forte e significativas entre as citocinas séricas IL-1 β e IL-17A ($p = 0,020$); IL-1 β e TNF ($p = 0,027$); IL-6 e IL-8 ($p = 0,007$); IL-6 e TNF ($p = 0,014$); TNF e IL-12p70 ($p = 0,003$); TNF e IL-13 ($p = 0,008$); IL-17A e IL-13 ($p = 0,007$). Já entre as moléculas IL-6 e IL-17A, houve correlação significativamente moderada e positiva ($p = 0,042$).

Quanto à avaliação do Polo VV, seis meses após início da PQT, observou-se aumento no número de interações significativas da citocina IL-10, surgindo correlação significativamente moderada e positiva entre a IL-10 e as citocinas IL-1 β e IL-12p70 ($p = 0,049$ e $p = 0,040$, respectivamente). Bem como a presença de novas correlações positivas, moderadas e significativas entre a IL-13 e as citocinas IL-6, IL-8 e IL-17A ($p = 0,014$, $p = 0,015$ e $p = 0,034$, respectivamente). Observou-se também a presença de novas correlações positivas, forte e significativas entre as moléculas IL-6 e IL-8 ($p = 0,004$); IL-6 e IL-12p70 ($p = 0,002$); e entre TNF e IL-13 9 ($p = 0,002$),

seguido da perda das correlações significativas ($p < 0,05$) entre o TNF e as citocinas IL-6 e IL-10; e entre a IL-1 β e as citocinas IL-12p70 e IL-13.

Em suma, observa-se que as redes se tornaram mais complexas após o tratamento poliquimioterápico, sendo esse aspecto mais evidente no Polo TT em comparação com o Polo VV. Após o tratamento, no Polo TT, observa-se a perda a microrrede (TNF, IFN- γ e IL-17A) e o destaque da IL-6 que passa a desempenhar um papel de protagonista das interações e mantém uma relação direta com IL-10, enquanto no Polo VV a IL-10 interage diretamente com IL-1 β e IL-12p70, interações estas que não estavam presentes antes do tratamento.

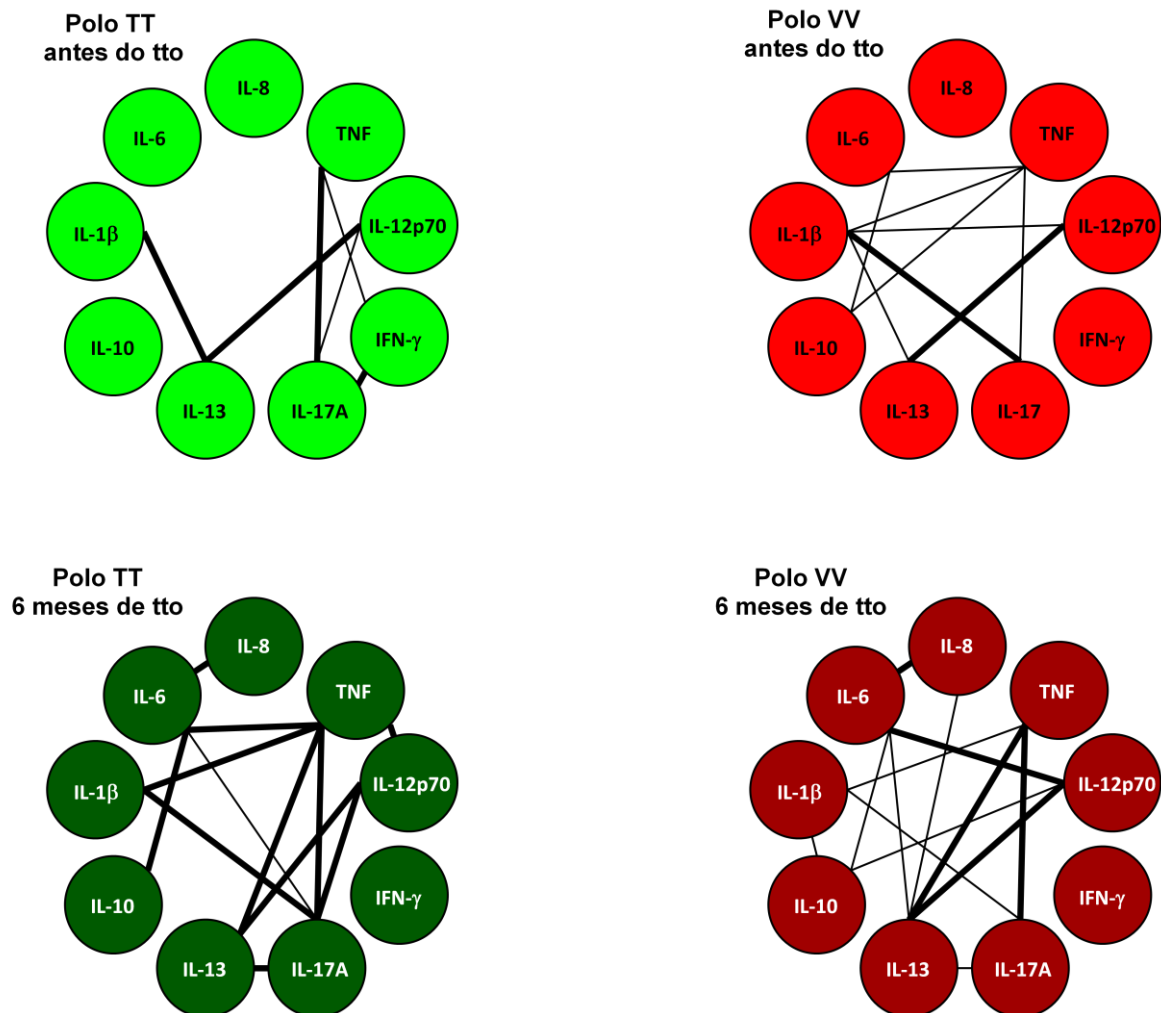


Figura 16: Rede de biomarcadores séricos para pacientes recém-diagnosticados com hanseníase nas formas polares Polo TT ($n = 10$) e Polo VV ($n = 14$), antes e seis meses após início do tratamento. As linhas destacam interações entre as citocinas séricas IFN- γ , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, onde (---) representa as conexões negativas, (—) conexões moderadas e (==) conexões fortes.

FONTE: Dados da pesquisa (2016).

7 DISCUSSÃO

Com o intuito de melhor compreender os mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento/manutenção e resistência à infecção pela *M. leprae*, o presente estudo caracterizou o perfil de citocinas séricas em pacientes recém-diagnosticados no Centro de Referência em Hanseníase de Minas Gerais com as formas polares da hanseníase, antes e seis meses após iniciar o tratamento.

A infecção pelo *M. leprae* envolve inúmeros mecanismos imunológicos importantes que levam ao reconhecimento do micro-organismo e a elaboração de uma resposta imune inata e adaptativa eficaz, capaz de controlar a replicação do parasito. A ativação do sistema imune, aliada a fatores genéticos que envolvem o hospedeiro e o bacilo, podem ser cruciais na dinâmica das manifestações clínicas evidenciadas nos pacientes durante o curso da doença (SCOLLARD *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2006). A heterogeneidade das manifestações clínicas na hanseníase é, até hoje, um dos pontos a ser desvendados pela ciência. Ainda não há um mecanismo exato que esclareça por que alguns pacientes desenvolvem alterações tão graves, enquanto outros não apresentam sinais ou sintomas relacionados à infecção (QUARESMA *et al.*, 2014).

A variabilidade das manifestações clínicas pode ser observada nos pacientes que desenvolvem características TT e VV de acordo com o grau de comprometimento neural e da exacerbação das lesões pré-existentes ou surgimento de novas lesões, antes, durante e até depois do tratamento e representam complicações no manejo clínico desses pacientes, pois podem causar conseqüentemente, deformidades e incapacidades irreversíveis (SCOLLARD *et al.*, 2006; JACOB *et al.*, 2008). A lesão neural é a manifestação de maior morbidade, provoca deformidades físicas que podem evoluir para lesões incapacitantes e permanentes e responde pela importância histórica, social e econômica da doença. O diagnóstico da hanseníase nas fases mais incipientes de sua evolução é de fundamental importância para que o tratamento seja iniciado no momento oportuno, visando a evitar tais complicações.

Portanto, o principal desafio na fisiopatologia da hanseníase envolve fatores que precedem o dano neural, a fim de conhecer biomarcadores imunológicos para as fases mais incipientes da evolução clínica da hanseníase, que pode ser um ponto

de intervenção para impedir a progressão da doença em pacientes que ainda apresentam a forma clínica indeterminada ou estão no estágio inicial do acometimento periférico/lesões (BRASIL, 2002). Em busca destes biomarcadores, alguns grupos de pesquisas apontaram as citocinas como orquestradoras do desenvolvimento das lesões (BELGAUMKAR *et al.*, 2007).

Entretanto, para tais descobertas, a correta caracterização da população de estudo se faz fundamental, assim como as características demográficas destes indivíduos.

No presente estudo, a predominância das mulheres foi observada em 58% dos casos novos, apontando para o maior zelo e preocupação do gênero feminino tanto com a saúde quanto aos aspectos físicos, diretamente afetados pela doença (LANA *et al.*, 2003).

A maioria dos pacientes apresentou idade na faixa etária entre 46 a 65 anos (Polo TT, 70% e Polo VV, 64%), reforçando que, apesar de todo avanço em diagnóstico e tratamento, casos novos de hanseníase estão sendo tardiamente descobertos (WHO, 2002; ARAÚJO, 2003). Tendo em vista que o bacilo tem multiplicação lenta, levando assim a um longo período de incubação, geralmente entre 2 a 7 anos. Desta forma, a infecção pode se permanecer silenciosa podendo manifestar-se até 20 anos após o contato com indivíduos infectantes (BRASIL, 2002). Demonstrando possível falha no rastreamento e acompanhamento de contatos domiciliares de pacientes previamente diagnosticados com a doença ou até mesmo falta de capacitação dos profissionais da atenção básica em saúde no diagnóstico precoce da hanseníase, conforme demonstrado em estudos realizados no Vale do Jequitinhonha – Minas Gerais (LANA *et al.*, 2004; LANA *et al.*, 2006).

Quanto ao número de lesões cutâneas, 45,8% dos pacientes apresentaram seis ou mais lesões, correspondendo à forma MB da classificação operacional proposta pela OMS, percentual pouco maior que os 39,5% encontrados em um estudo realizado em Minas Gerais entre os anos de 2002 e 2004 incluindo 1041 casos novos de hanseníase (GROSSI *et al.*, 2008).

Na hanseníase, o envolvimento de nervos periféricos é um importante preditor de incapacidades e deformidades físicas. Neste estudo, 33% dos pacientes apresentaram dois ou mais nervos acometidos, aproximando-se dos 39% encontrados em outro estudo realizado no mesmo centro de referência, envolvendo 110 pacientes, entre os anos de 2006 e 2007 (SARUBI, 2008).

A análise dos resultados do teste sorológico ML Flow, que detecta com alta sensibilidade e especificidade anticorpos IgM contra o PGL-1 do *M. leprae*, mostrou que 86% dos pacientes MB apresentaram resultados positivos, sendo coerente com a característica humoral observada nesta forma clínica (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003). Outros estudos mostram que a presença de anticorpos IgM contra o PGL-1 está intimamente relacionada à carga bacilar do paciente (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2000).

Os pacientes MB são caracterizados pelos altos níveis de anticorpos específicos ao PGL-1 do *M. leprae*, sem conferir proteção contra o bacilo, que é intracelular obrigatório, proporcionando a multiplicação e disseminação dos bacilos, na ausência de uma resposta imune celular efetiva com a produção de citocinas majoritariamente anti-inflamatórias (HOLZER *et al.*, 1986; GOULART *et al.*, 2002; BARKER, 2006).

As citocinas são moléculas solúveis secretadas por células da imunidade inata ou adaptativa em resposta a micro-organismos e outros antígenos, que medeiam muitas funções dessas células. As citocinas têm um papel fundamental na imunorregulação da resposta de leucócitos, regulam a intensidade, duração e a qualidade da resposta imune (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000; SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

No presente estudo, a análise dos resultados demonstrou que pacientes do Polo VV apresentaram maior expressão dos níveis séricos de IL-6 em comparação com pacientes do Polo TT e indivíduos não infectados. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia tanto na reação inflamatória quanto na resposta imune antígeno-específica. Desempenha importante papel pró-inflamatório, estimulando a síntese hepática de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa, além de estimular a produção de neutrófilos, sendo estes recrutados para o foco inflamatório na fase precoce da interação patógeno-hospedeiro efetuando fagocitose e liberando mediadores pró-inflamatórios, atraindo monócitos/macrófagos e potencializando o processo inflamatório (HEINRICH *et al.*, 1990).

Alguns dados da literatura relatam maiores concentrações de IL-6 nas formas polares tuberculóide-tuberculóide e dimorfa-tuberculóide em oposto às outras formas dimorfa-virchowiana e virchowiana-virchowiana (REYNARD *et al.*, 2003; ANTAS *et al.*, 2004; SCOLLARD *et al.*, 2006 e FULYA *et al.*, 2006). Entretanto, verificou-se que a IL-6 também participa na proliferação e diferenciação de linfócitos B em células

secretoras de anticorpos (ALCAIS *et al.*, 2005; RADA *et al.*, 2005), o que pode contribuir para o desenvolvimento da imunidade humoral característica das formas clínicas multibacilares (VV e DV) que exibem altos níveis de anticorpos frente a antígenos específicos do *M. leprae* (MENDONÇA *et al.*, 2008).

O IFN- γ , importante citocina pró-inflamatória, atua na ativação de macrófagos, promovendo a liberação de reativos de oxigênio e nitrogênio, fundamentais na destruição dos bacilos capturados no interior destes macrófagos. Dados da literatura relatam maior expressão dos níveis de IFN- γ em pacientes do polo tuberculóide, que apresentam um perfil mais pró-inflamatório (Th1) (MODLIN *et al.*, 1988).

Através da análise dos dados, observou-se que os pacientes com hanseníase expressaram níveis séricos mais elevados de IFN- γ em comparação ao grupo de indivíduos não infectados. No entanto, na comparação entre as formas clínicas polares (Polo TT e Polo VV), não houve diferenças significativas nos níveis séricos desta molécula. Durante a análise deste biomarcador através do diagrama de “altos” e “baixos” produtores, verificou-se que em 71% dos indivíduos do Polo VV se comportam como “altos produtores” de IFN- γ , sobressaindo aos 60% observados no Polo TT. Entretanto, ao observar as redes de citocinas, verificou-se que o Polo VV não apresenta nenhuma correlação significativa entre esta citocina e os demais biomarcadores. Sugere-se que os níveis mais elevados de IFN- γ no Polo VV, possa ser uma tentativa de compensação do sistema imune desses pacientes frente ao bacilo dado que, os macrófagos de indivíduos virchowianos não são eficientes na eliminação dos bacilos fagocitados, o que propicia a sua sobrevivência e multiplicação no interior desses fagócitos, levando a disseminação do *M. leprae* no organismo destes indivíduos. (WALKER; LOCKWOOD, 2006; BARKER, 2006). Desta forma, níveis elevados de IFN- γ mensurados no soro destes pacientes possa ser um reflexo sistêmico desta sua ineficiência de atuação nos locais da infecção causada por este bacilo. Para os pacientes que compõem o Polo TT, os níveis sistêmicos desta citocina podem não estar tão acentuados, uma vez que parte desta citocina é consumida no próprio sítio da lesão. Sobretudo, ao analisar a rede de citocinas, verificou-se correlação significativa do IFN- γ apenas no Polo TT. Foi observada interação positiva do IFN- γ com TNF, o que demonstra ativa presença do braço pró-inflamatório neste grupo. De acordo com alguns autores, a citocina TNF- α é, predominantemente, produzida por macrófagos e tem papel fundamental na

defesa contra patógenos intracelulares. Ao avaliar o espectro clínico da hanseníase e a produção de citocinas observou-se, no polo TT, predomínio de uma resposta imune celular e produção de citocinas pró-inflamatórias, onde o IFN- γ age sobre macrófagos, estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular, levando a maior produção de TNF- α , que potencializa a ativação macrofágica através de um mecanismo sinérgico cíclico (ANTAS *et al.*, 2004; BARKER, 2006).

A IL-10 é uma citocina que atua na regulação negativa da resposta imune inflamatória, desempenhando importante papel modulador. A IL-10 inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (ZHANG; AN, 2007; CRUZ *et al.*, 2008).

A análise da expressão sérica de IL-10 dentro dos grupos estudo demonstrou que os pacientes com hanseníase apresentam níveis mais elevados desta citocina em comparação ao grupo de indivíduos não infectados. Entretanto, na comparação entre as formas clínicas polares (Polo TT e Polo VV), não houve diferença significativa nos níveis séricos de IL-10. No entanto, ao observar o diagrama de “altos” e “baixos” produtores, verificou-se que a citocina IL-10 apresentou-se como o biomarcador com a maior frequência de indivíduos classificados como “altos produtores” dentro do grupo polar VV (79%). Além disso, se observou, na rede de biomarcadores, correlações significativas da IL-10 com as moléculas TNF e IL-6 dentro do Polo VV, não sendo o mesmo observado dentro do Polo TT. Desta forma, os dados obtidos neste estudo reforçam o destaque da IL-10 no Polo VV. A IL-10 tem como característica ser uma citocina reguladora, atuando principalmente em macrófagos ativos, onde desempenha seu papel modulador da resposta imune. Isso permite a proliferação do *M. leprae*, o aparecimento de muitas lesões e infiltrados inflamatórios, característicos do polo virchowiano (MENDONÇA *et al.*, 2008; DEGANG *et al.*, 2014; NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

Na análise da rede de biomarcadores, observou-se que indivíduos não infectados (NI) apresentam naturalmente, tanto citocinas pró-inflamatórias quanto reguladoras, em níveis basais e de maneira modulada. Já os pacientes com hanseníase apresentaram resposta imune inflamatória evidente, sendo que, os indivíduos do Polo TT exibem modesta rede geral de citocinas com baixo envolvimento de citocinas reguladoras, enquanto o Polo VV revela-se fortemente

influenciado pela ação moduladora da IL-10, possibilitando assim a disseminação descontrolada do bacilo neste grupo.

Sobretudo, apesar do conhecimento dos últimos anos sobre a participação da resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*, pouco se sabe sobre o impacto do tratamento nesses indivíduos. De acordo com alguns autores, a produção de citocinas em pacientes com hanseníase é devido à estimulação das células do sistema imune por antígenos de *M. leprae*, e, quando estes antígenos são reduzidos por meio de tratamento, a produção de citocina pode ser reduzida ou mesmo atingir os níveis encontrados em indivíduos não infectados (MOUBASHER *et al.*, 1998a; MOUBASHER *et al.*, 1998b).

Em 1998 Moubasher e colaboradores concluíram que a carga bacteriana pode ser o fator determinante para os níveis séricos de citocinas em pacientes com hanseníase. Tendo em vista que as células do sistema imune produzem citocinas em resposta à estimulação antigênica, cabe ressaltar que embora o tratamento atue diminuindo a carga bacteriana, também expõe determinantes antigênicos que não estavam expostos antes da terapêutica, isso pode ser do ponto de vista da resposta imune, um fator para estimulação crônica constante e prolongada da resposta imune. Portanto, avaliou-se também o impacto do tratamento na produção de citocina nos dois polos da hanseníase (Polo TT e Polo VV), após seis meses de PQT em comparação com os níveis de antes do início do tratamento.

Na amostra estudada, a concentração sérica de IL-6 ($p < 0,01$) foi elevada em pacientes do Polo VV antes do tratamento, quando comparados com os indivíduos NI. Entretanto, observou-se uma queda nos níveis séricos de IL-6 ($p < 0,05$) em pacientes do Polo VV no período de seis meses após intervenção poliquimioterápica, chegando a níveis próximos aos do grupo NI. Outros trabalhos demonstram a importância da triagem da IL-6 no acompanhamento da evolução do tratamento em doenças agudas. Sobretudo, não foram encontrados estudos desta citocina durante ou pós o tratamento de doenças crônicas. Os níveis elevados de IL-6 no soro de pacientes do Polo VV sugerem que esta citocina pode desempenhar papel importante na patogênese da doença, sendo útil como biomarcador da resposta à PQT em pacientes com hanseníase multibacilar.

Observou-se neste estudo aumento dos níveis séricos de IFN- γ em pacientes do Polo TT após seis meses do início da PQT, comparados aos níveis antes do tratamento. Entretanto, verificou-se a perda da correlação deste IFN- γ com TNF,

juntamente com o ganho da correlação positiva entre a molécula anti-inflamatória IL-10 e a citocina IL-6, mostrando a possível efetividade do braço imunorregulatório neste polo, seis meses após a intervenção poliquimioterápica. Em contrapartida outro estudo descreveu uma redução na produção de TNF- α e IFN- γ em lesões cutâneas de pacientes TT após PQT (ARNOLDI *et al.*, 1990).

Um fator adicional é o possível efeito inibidor direto da quimioterapia combinada sobre a produção de citocinas. A clofazimina tem efeito anti-inflamatório e pode inibir a estimulação induzida por mitógenos de células mononucleares de sangue periférico (PBMC's) (ARBISER; MOSCHELLA, 1995). Além disso, a dapsona tem efeito anti-inflamatório não relacionado à sua ação antibacteriana (KATZ, 1993). Entretanto, embora o efeito inibidor da PQT possa diminuir a produção de citocinas, observa-se neste estudo que a terapêutica aumenta a complexidade de interações entre elas. Desta forma, mais estudos são necessários para compreender a participação efetiva das citocinas na polaridade da doença e verificar as possíveis alterações durante o curso do tratamento poliquimioterápico na hanseníase. Faz-se necessário também, a mensuração das citocinas estudadas e o acompanhamento do índice baciloscópico destes pacientes após término do tratamento, possibilitando assim, a comparação da alteração do perfil destas citocinas com a real redução bacilar após a intervenção da PQT.

8 CONCLUSÃO

Os níveis elevados de IL-6 e IFN- γ no soro de pacientes com hanseníase, juntamente com aumento da IL-10 sérica em pacientes do Polo VV reforçam o importante papel que estas citocinas desempenham na patogênese da doença. Além disso, a redução de IL-6 durante o tratamento sugere que esta citocina pode ser útil como biomarcador da resposta ao tratamento em pacientes com a forma multibacilar da hanseníase. Os pacientes do Polo TT apresentaram níveis elevados de IFN- γ , sendo estes ainda mais altos durante o tratamento. Entretanto a resposta imune inflamatória apresentada antes do tratamento passa a ser modulada durante a poliquimioterapia.

Em síntese, o efeito do tratamento mostrou que a terapêutica PQT desliga as respostas de citocinas com alterações importantes no balanço da IL-6, IL-10 e IFN- γ .

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAIS, A.; MIRA, M.; CASANOVA, J. L.; SCHURR, E.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 1, p. 44-48, fev. 2005.

ALTER, A.; GRANT, A.; ABEL, L.; ALCAIS, A.; SCHURR, E. Leprosy as a genetic disease. **Mammalian Genome**, Canadá, v. 22, n. 1, p. 19-31, out. 2011.

ANDRADE, A. R. C.; GROSSI, M. A. F.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ANTUNES, C. M. F. Soroprevalência do teste ML Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, supl. II, p. 56-59, 2008.

ANTAS, P. R.; SALES, PEREIRA, K. C.; OLIVEIRA, E. B.; CUNHA, K. S.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 8, p. 1119-1129, ago. 2004.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. Artigo de atualização. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 3, p. 373-382, jun. 2003.

ARMOUR, K. S.; SCOLYER, R. A.; BARNETSON, R. S. Borderline lepromatous leprosy presenting as a single cutaneous plaque. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 46, n. 3, p. 181-183, ago. 2005.

BAIALARDI, K. S. O estigma da hanseníase: relato de experiência em grupo com pessoas portadoras. **Hansenologia Internationalis**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2007.

BARKER, L. P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 6, p. 748-759, jun. 2006.

BELGAUMKAR, V. A.; GOKHALE, N. R.; MAHAJAN, P. M.; BHARADWAJ, R.; PANDIT, D. P.; DESHPANDE, S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 78, n. 3, p. 223-230, set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o controle da hanseníase. 3. ed. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde: Dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose. 2. ed. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de procedimentos técnicos – Baciloscopia em hanseníase. 1. ed. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Portaria nº 149 de 3 de fevereiro de 2016: Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública. 1. ed. Brasília, DF, 2016.

BRENNAN, P. J.; BARROW, W. W. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases**, v. 48, n. 4, p.382-387, dez. 1980.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, abr. 2004.

BÜHRER-SÉKULA, S.; SARNO, E. N.; OSKAM, L.; KOOP, S.; WICHERS, I.; NERY, J. A.; VIEIRA, L. M.; de MATOS, H. J.; FABER, W. R.; KLATSER, P. R. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 68, n. 4, p. 456-463, dez. 2000.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, mai. 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia PGL-I na hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, supl. II, p. 3-5, 2008.

CAMPI-AZEVEDO, A. C.; ARAÚJO-PORTO, L. P.; LUIZA-SILVA, M.; BATISTA, M. A.; MARTINS, M. A.; SATHLER-AVELAR, R.; SILVEIRA-LEMOS, D.; CAMACHO, L. A. B.; MARTINS, R. M.; MAIA, M. L. S.; FARIAS, R. H. G.; FREIRE, M. S.; GALLER, R.; HOMMA, A.; RIBEIRO, J. G. L.; LEMOS, J. A. C.; AUXILIADORA-MARTINS, M.; CALDAS, I. R.; ELÓI-SANTOS, S. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, T.; MARTINS-FILHO, O. A. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. e49828, dez. 2012.

COHEN, J. Statistical power analysis. **Current Directions in Psychological Science**, v. 1, n. 3, p. 98-101, jun. 1992.

CRUZ, D.; WATSON, A. D.; MILLER, C. S.; MONTOYA, D.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; GUTIERREZ, M. A.; NAVAB, M.; REDDY, S. T.; WITZTUM, J. L.; FOGELMAN, A. M.; REA, T. H.; EISENBERG, D.; BERLINER, J.; MODLIN, R. L. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **The Journal of Clinical Investigation**, Los Angeles, v. 118, n. 8, p. 2917-2928, ago. 2008.

DEGANG, Y.; NAKAMURA, K.; AKAMA, T.; ISHIDO, Y.; LUO, Y.; ISHII, N.; SUZUKI, K. Leprosy as a model of immunity. **Future Microbiology**, Tóquio, v. 9, n. 1, p. 43-54, jan. 2014.

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n.4, p. 318-324, ago. 2000.

FINEZ, M. A.; SALOTTI, S. R. A. Identificação do grau de incapacidades em pacientes portadores de hanseníase através da avaliação neurológica simplificada. **Journal of the Health Sciences Institute**, São Paulo, v. 29, n.3, p.171-175, set. 2011.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto, v.30, p. 335-339, jul./set. 1997.

FOSS, N. T. Episódios reacionais na Hanseníase. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto, v.36, p. 453-459, abr./dez. 2003.

FULYA, I.; MEHMET, O.; HANDAN, A.; VEDAT, B. Cytokine measurement in lymphocyte culture supernatant of inactive lepromatous leprosy patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 121-123, abr. 2006.

GELUK, A; OTTENHOFF, T. H. M. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. **Human Immunology**, Leiden, v. 67, n. 6, p. 439-445, jun. 2006.

GODAL, T.; LOFGREN, M.; NEGASSI, K. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 40, n. 3, p. 243-250, set. 1972.

GOULART, I. M. B.; PENA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.35, n.4, p. 365-375, jul./ago. 2002.

GROSSI, M. A. F.; LEBOEUF, M. A. A.; ANDRADE, A. R. C.; LYON, S.; ANTUNES, C. M. F.; BÜHRER-SÉKULA, S. A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. Suplemento 2, p. 34-38, 2008.

HARBOE, M. Overview of host-parasite relations. In: HASTINGS, R. C. *Leprosy*. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 1994. v. 1, cap. 5, p. 87-112.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621-636, fev. 1990.

HOLZER, T. J.; NELSON, K. E.; CRISPEN, R. G.; ANDERSEN, B. R. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 2, p. 514-520, fev. 1986.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 147, n. 3, p.728-735, set. 1981.

JACOB, J. T.; KOZARSKY, P.; DISMUKES, R.; BYNOE, V.; MARGOLES, L.; LEONARD, M.; TELLEZ, I.; FRANCO-PAREDES, C. Five-year experience with type

1 and type 2 reactions in Hansen disease at a US travel clinic. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 452-454, set. 2008.

KAHAWITA, I. P.; WALKER, S. I.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 1, p. 75-82, 2008.

KAR, H. K.; GUPTA, R. Treatment of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 55-65, fev. 2015.

KRAHENBUHL, J.; ADAMS, L. B. Exploitation of gene knockout mice models to study the pathogenesis of leprosy. **Leprosy Review**, v. 71, suppl, p. 170-175, dec. 2000.

KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGDARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-532, mai. 2003.

LANA, F. C. F.; LANZA, F. M.; MELÉNDEZ, G. V.; BRANCO, A. C.; TEIXEIRA, S.; MALAQUIAS, L. C. C. Distribuição da hanseníase segundo sexo no Município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. **Hansenologia Internationalis (Online)**, Bauru, v. 28, n. 2, p. 131-137, 2003.

LANA, F. C. F.; AMARAL, E. P.; FRANCO, M. S.; LANZA, F. M. Detecção da hanseníase no Vale do Jequitinhonha – Minas Gerais: redução da tendência epidemiológica ou problemas operacionais para o diagnóstico? **Hansenologia Internationalis**, Bauru, v. 29, n. 2, p. 118-123, 2004.

LANA, F. C. F.; CARVALHO, A. C. N.; SALDANHA, A. N. S. L.; AMARAL, E. P.; DINIZ, L. G. Análise da tendência epidemiológica da hanseníase na microrregião de Almenara/Minas Gerais – Período: 1998-2004. **Revista Mineira de Enfermagem**, Belo Horizonte, v. 10, n. 2, p. 107-112, abr/jun. 2006.

LANGRISH, C. L.; MCKENZIE, B. S.; WILSON, N. J.; DE WAAL MALEFYT, R.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 202, n. 1, p. 96-105, dez. 2004.

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

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D.; MELO, G. E. B. A.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 343-350, ago. 2008.

MIRANDA, A. M.; ANTUNES, S. L.; NERY, J. A.; SALES, A. M.; PEREIRA, M. J.; SARNO, E. N. Erythema multiforme in leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, suppl1, p. 34-42, dez. 2012.

MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. **Japanese Journal of Dermatology and Urology**, Tóquio, v. 19, n. 1, p. 697-708, 1919.

MODLIN, R. L.; MELANCON-KAPLAN, J.; YOUNG, S. M. M.; PIRMEZ, C.; KINO, H.; CONVIT, J.; REA, T. H.; BLOOM, B. R. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 4, p. 1213-1217, fev. 1988.

MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion Immunology**, Los Angeles, v. 22, n. 1, p. 48-54, fev. 2010.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPÉE, J. Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J. S.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S. N.; Ji, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P. E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P. J.; COLE, S. T. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p.1040-1042, mai. 2005

MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 189-202, set. 2006.

MOUBASHER, A. D.; KAMEL, N. A.; ZEDAN, H.; RAHEEM, D. D. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 10, p. 733-740, out. 1998a.

MOUBASHER, A. D.; KAMEL, N. A.; ZEDAN, H.; RAHEEM, D. D. Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 10, p. 741-746, out. 1998b.

MUIR, E. Report on the Madrid Congress. An Editorial. **International Journal of Leprosy**, v. 21, p. 477-557. 1953.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology and challenges in leprosy. **Clinics in Dermatology**, Nova Dheli, v. 33, n.1, p. 90-98, fev. 2015.

OLIVEIRA, D. T.; SHERLOCK, J.; MELO, E. V.; ROLLEMBERG, K. C.; PAIXÃO, T. R.; ABUAWAD, Y. G.; SIMON, M. V.; DUTHIE, M.; JESUS, A. R. Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Aracaju, v. 46, n. 5, p. 600-604, set. 2013.

OPROMOLLA, D. V. A. Noções de Hansenologia. 1. ed. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

PINHEIRO, R. O.; SALLES, J. S.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 217-230, fev. 2011.

QUARESMA, J. A. S.; ESTEVES, P. C.; AARÃO, T. L. S.; SOUSA, J. R.; PINTO, D. S.; FUZII, H. T. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. **Microbial Pathogenesis**, Belém, v. 76, n. 1, p. 84-88, nov. 2014.

RADA, E.; NACARID, A.; CONVIT, J. Some immunological aspects in the reaccional states of Hansen disease. **Investigación Clínica**, v. 46, n. 4, p. 381-389, dez. 2005.

REA, T. H.; MODLIN, R. L. Leprosy. In: FREEDBERG, I.M.; EISEN, A.Z.; WOLF, K.; AUSTEN, K.F.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 8. ed. Nova Iorque: Medicine & Health Science Books, 2010. v. 2, p.1787-1796.

REES, R. J. W. The Microbiology of Leprosy. In: HASTINGS, R.C. (ed). Leprosy. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985. cap.3, p. 31-52.

REYNARD, M. P.; TURNER, D.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; RAMOS DE SOUZA M, MORENO, C.; NAVARRETE, C. V. Allele frequencies for an interferon-gamma microsatellite in a population of Brazilian leprosy patients. **European Journal of Immunogenetics**, v. 30, n. 2, p. 149-151, abr. 2003.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: five group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, Londres, v. 34, n. 3, p. 255-273, jul. 1966.

SARUBI, J. C. Estudo comparativo das técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O na baciloscopia do raspado dérmico de quatro e seis sítios em casos novos de hanseníase, em serviço de referência de Belo Horizonte. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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**, Louisiana, v. 19, n. 2, p. 338-381, abr. 2006.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 1, p. 76-102, dez. 2001.

TAYLOR, R. E. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, v. 6, n. 1, p. 35-39, 1990.

TRUMAN, R. W.; SHANNON, E. J.; HAGSTAD, H. V.; HUGH-JONES, M. E.; WOLFF, A.; HASTINGS, R. C. Evaluation of the origin of *Mycobacterium leprae* infections in the wild armadillo, *Dasypus novemcinctus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 3, p.588-593, mai. 1986.

VAN BRAKEL, W. H.; SIHOMBING, B.; DJARIR, H.; BEISE, K.; KUSUMAWARDHANI, L.; YULIHANE, R.; KURNIASARI, I.; KASIM, M.; KESUMANINGSIH, K. I.; WILDER-SMITH, A. Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. **Global Health Action**, Amsterdam, v.5, n. 1, p. 1-11, jul. 2012.

VAN DE VOSSE, E.; HOEVE, M. A.; OTTENHOFF, T. H. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against

mycobacteria and salmonellae. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 12, p. 739-749, dez. 2004.

VISSCHEDIJK, J.; VAN de BROEK, J.; EGGENS, H.; LEVER, P.; VAN BEERS, S.; KLATSER, P. *Mycobacterium leprae* - Millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. **Tropical Medicine and International Health**, v.5, n.6, p.388-399, jun. 2000.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77-78, n. 1, p. 103-121, nov. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of a WHO Study Group: chemotherapy of leprosy for control programmes. Tech 0052ep Ser 1982: 675.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Current global situation of leprosy. Latest available information, July 1999. *Weekly Epidemiological Record*.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leprosy-global situation. *Weekly epidemiological Record* [on line], Disponível na Internet: <<http://www.who.int/wer>> 77: 1-8, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy situation 2010. *Weekly Epidemiological Record*. 2010; 85(35): 337-348.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Weekly Epidemiological Record*. v. 88, n. 35, p. 365–380, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy update, 2013. *Weekly Epidemiological Record*. 2014; 89(36): 389-400.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leprosy. Geneva: WHO, 2015. Disponível em [http: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/). Acesso em: 17 mai. 2016.

YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R. J.; WEINBERG, K.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277-279, out. 1991.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, fev. 2007.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, fev. 2000.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CASO –

Projeto de Pesquisa

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

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

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário (você pode escolher se quer participar ou não). Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar aos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa.

Esta pesquisa irá estudar a Hanseníase, uma doença que acomete pele e nervos e que pode causar grandes deformidades. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, podendo ajudar na prevenção, no tratamento das deformidades provocadas pela doença e melhora da qualidade de vida do paciente. **Será colhida uma pequena amostra de sangue (35 mL) em tubos estéreis para as dosagens bioquímicas e imunológicas.** E também será realizada uma biópsia de pele. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

Se você concordar em participar, você estará ajudando diversos pesquisadores a entender melhor a hanseníase e como se pode melhorar seu tratamento e a cura dos doentes. Assim, poderá ajudar muitas pessoas que, como você, hoje estão com essa doença ou podem vir a ficar doentes no futuro.

Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento nenhum para participar da pesquisa; a qualquer momento, você poderá desistir de fazer parte dela, sem qualquer prejuízo.

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

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

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo

poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na Hanseníase, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos saudáveis que constituirão o grupo controle.

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

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

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

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG)

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

Pós-doutoranda: Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG/FIOCRUZ)

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com o Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, as terças e sextas-feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisas (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil CEP: 31270-901 ou pelo telefone (31) 3409-4592 ou no Comitê de Ética em Pesquisas da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

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

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da testemunha: _____

Ass. do orientando: _____

Ass. do pesquisador responsável / orientador: _____

ANEXO II



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

Projeto: CAAE – 14887414.0.0000.5149

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

DECISÃO

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

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



Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO III

IFN- γ	-0,3357							
IL-1 β	-0,2657	0,3077						
IL-8	0,2797	-0,3217	-0,5175					
IL-10	-0,0736	-0,1191	0,0070	0,0736				
IL-12p70	0,1016	-0,3538	-0,5324	0,4799	0,7263			
IL-13	-0,0564	0,3069	-0,4621	0,1340	-0,5848	-0,0795		
IL-17A	0,2448	0,3077	0,2238	-0,4196	-0,0701	-0,1891	0,0988	
TNF	-0,0737	-0,2456	0,0316	-0,0982	0,6397	0,4605	-0,4991	-0,4351
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

IFN- γ	-0,5046							
IL-1 β	0,4802	0,0183						
IL-8	-0,0304	0,0183	-0,5879					
IL-10	0,1280	-0,0826	-0,0243	-0,0912				
IL-12p70	0,1829	0,4465	0,3465	-0,1581	0,5793			
IL-13	0,0795	0,4509	0,7256	-0,4512	0,2324	0,6942		
IL-17A	-0,0518	0,7034	0,3526	-0,2432	0,3201	0,6707	0,5291	
TNF	-0,0915	0,6728	0,1337	0,2553	0,2957	0,6220	0,3456	0,8110
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

IFN- γ	0,1771							
IL-1 β	0,3393	0,3095						
IL-8	0,4750	0,1896	0,3821					
IL-10	0,5635	0,2159	0,3775	0,3292				
IL-12p70	0,2179	0,2916	0,5321	0,2179	0,4043			
IL-13	0,4090	0,3258	0,5532	0,3243	0,3953	0,7532		
IL-17A	0,3128	0,3142	0,8382	0,3164	0,2175	0,4665	0,5140	
TNF	0,5845	0,2748	0,5308	0,4111	0,5730	0,0643	0,3147	0,6333
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

Anexo III: Matriz de Correlação. Ilustra as matrizes de correlação utilizadas neste estudo para estabelecer as interações e a força das correlações entre as citocinas séricas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, onde os valores destacados com retângulos e em negrito correspondem aos valores dos coeficientes de correlação de Spearman que foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

FONTE: Dados da pesquisa (2016)

ANEXO IV

IFN- γ	-0,5046							
IL-1 β	0,4802	0,0183						
IL-8	-0,0304	0,0183	-0,5879					
IL-10	0,1280	-0,0826	-0,0243	-0,0912				
IL-12p70	0,1829	0,4465	0,3465	-0,1581	0,5793			
IL-13	0,0795	0,4509	0,7256	-0,4512	0,2324	0,6942		
IL-17A	-0,0518	0,7034	0,3526	-0,2432	0,3201	0,6707	0,5291	
TNF	-0,0915	0,6728	0,1337	0,2553	0,2957	0,6220	0,3456	0,8110
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

IFN- γ	0,2500							
IL-1 β	0,3769	0,5535						
IL-8	0,8061	0,2622	0,1702					
IL-10	0,7455	-0,1768	0,2188	0,6242				
IL-12p70	0,5030	0,2744	0,4499	0,2970	0,2364			
IL-13	0,4061	0,3049	0,5046	0,2606	0,2121	0,9152		
IL-17A	0,6626	0,3211	0,7287	0,3526	0,3830	0,8450	0,8085	
TNF	0,7599	0,3028	0,7043	0,4377	0,5410	0,8450	0,7964	0,9756
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

IFN- γ	0,1771							
IL-1 β	0,3393	0,3095						
IL-8	0,4750	0,1896	0,3821					
IL-10	0,5635	0,2159	0,3775	0,3292				
IL-12p70	0,2179	0,2916	0,5321	0,2179	0,4043			
IL-13	0,4090	0,3258	0,5532	0,3243	0,3953	0,7532		
IL-17A	0,3128	0,3142	0,8382	0,3164	0,2175	0,4665	0,5140	
TNF	0,5845	0,2748	0,5308	0,4111	0,5730	0,0643	0,3147	0,6333
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

IFN- γ	-0,0377							
IL-1 β	0,3250	0,3986						
IL-8	0,7131	0,0701	0,2645					
IL-10	0,6047	0,4308	0,5188	0,3491				
IL-12p70	0,7571	0,1454	0,3607	0,4808	0,5403			
IL-13	0,6286	0,2316	0,4071	0,6220	0,4920	0,7321		
IL-17A	0,2433	0,2914	0,5707	0,3429	0,3172	0,3596	0,5546	
TNF	0,4821	0,2819	0,6643	0,4754	0,4973	0,5071	0,7464	0,8730
	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A

Anexo IV: Matriz de Correlação. Ilustra as matrizes de correlação utilizadas neste estudo para estabelecer as interações e a força das correlações entre as citocinas séricas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A e TNF, antes e seis meses após início do tratamento poliquimioterápico, onde os valores destacados com retângulos e em negrito correspondem aos valores dos coeficientes de correlação de Spearman que foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

FONTE: Dados da pesquisa (2016)