



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

MARIA WILIANE DO NASCIMENTO CUNHA

**ANÁLISE DOS PERFIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FORMAÇÃO DE
CLUSTERS ASSOCIADOS COM AS FORMAS E COMPLICAÇÕES CLÍNICAS
DA HANSENÍASE**

**São Cristóvão
2020**

MARIA WILIANE DO NASCIMENTO CUNHA

**ANÁLISE DOS PERFIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FORMAÇÃO DE
CLUSTERS ASSOCIADOS COM AS FORMAS E COMPLICAÇÕES CLÍNICAS
DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como requisito final à obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Ciências Biológicas
III

Orientador: Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos

São Cristóvão

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C972a	<p>Cunha, Maria Wiliane do Nascimento</p> <p>Análise dos perfis séricos de citocinas e formação de clusters associados com as formas e complicações clínicas da hanseníase / Maria Wiliane do Nascimento Cunha ; orientador Márcio Bezerra Santos. – São Cristóvão, SE, 2020.</p> <p>63 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.</p> <p>1. Hanseníase. 2. Resposta imune. 3. Citocinas. I. Santos, Márcio Bezerra, orient. II. Título.</p> <p>CDU 616-002.73</p>
-------	---



Ata da Sessão da 82ª Defesa do Curso de Mestrado em Biologia Parasitária

Ao primeiro dia do mês de julho de dois mil e vinte, com início as catorze horas, realizou-se remotamente, via videoconferência, a sessão pública de defesa de dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária de Maria Wiliane do Nascimento Cunha, intitulada "**Análise dos perfis séricos de citocinas e formação de clusters associados com as formas e complicações clínicas da hanseníase**", orientada pelo Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos (PROBP/UFS). A sessão pública de defesa foi realizada de forma virtual em razão das restrições impostas pela situação de emergência sanitária. Aberta a sessão, o Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos, Presidente da Banca Examinadora, passou a palavra à candidata para a apresentação pública de seu trabalho. Em seguida, o Presidente passou a palavra à primeira examinadora, Profa. Dra. Priscila Lima dos Santos Almeida (DESL/UFS), para arguição da candidata, que teve igual período para sua defesa. O mesmo aconteceu com a segunda examinadora, Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura (PROBP/UFS). Ao término da arguição dos examinadores, o Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos agradeceu os comentários e sugestões dos membros da banca. Encerrados os trabalhos, a banca examinadora deliberou sobre a aprovação da candidata. A banca concedeu o parecer **aprovada** à candidata, sendo atendidas as exigências da Instrução Normativa 05/2015/PROBP e da Resolução no 86/2014/CONEP, que regulamentam a apresentação e defesa de Dissertação de Mestrado. Nada mais havendo a tratar, o Orientador lavrou a presente ata que será assinada pelos examinadores e pela candidata.

Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, 01 de julho de 2020

Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos (PROBP/UFS)
Presidente

Profa. Dra. Priscila Lima dos Santos Almeida (DESL/UFS)
Examinadora Externa

Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura (PROBP/UFS)
Examinadora Interna

Maria Wiliane do Nascimento Cunha
Mestranda

Agradecimentos

Com muita alegria, concluo essa fase desafiadora e enriquecedora em minha vida pessoal e acadêmica. O mestrado não foi algo planejado por mim, mas foi algo que me escolheu e me fez desenvolver inúmeras habilidades.

É chegada a hora de agradecer. Agradeço a Deus por estar comigo ao longo desses anos. Por ter me dado sabedoria, paciência, calma e perseverança em todos os momentos.

Viver a experiência de mestrado requer de nós uma cadeia de apoio. Sem essa minha rede de apoio, eu não teria conseguido. Dessa forma, agradeço aos meus pais (Wilson e Giselia). Vocês acreditaram em mim quando eu não acreditava, me deram todo o suporte que eu precisava para seguir estudando, mesmo depois de formada. Me apoiaram quando todos questionavam o para quê de tanto estudo. A vocês, devo toda a minha caminhada estudantil. Obrigada. Agradeço a meus irmãos e sobrinhos, que sempre tinham uma palavra de apoio e conforto quando eu precisava.

Agradeço ao meu amado esposo Raphael. Não faz ideia do quanto me ajuda e me estimula a ser melhor. Antes de tudo, sou sua eterna admiradora. Admiro seu esforço desde a época de escola, até os dias de hoje. Vivemos essa batalha de mestrado juntos, eu aqui e você em Uberlândia-MG. Obrigada por cada palavra de apoio e estímulo a ser melhor sempre. Obrigada.

Agradeço grandemente aos amigos que conquistei e, principalmente, àquela que esteve comigo SEMPRE, Bianca. Como é bom ter sua amizade, parceria e ajuda na tradução dos artigos, no preparo das aulas sorteadas, no café da manhã em Celina, na ida e volta no ônibus da AIU, nas conversas intermináveis sobre os mais variados temas. Agradeço aos amigos do ProBP, minha primeira turma unida e da qual sinto muita saudade, não citarei nomes, todos estão em meu coração. Agradeço a todos do LIBM, em nome da professora Amélia e professor Roque, por ter me acolhido tão bem no laboratório. Aos parceiros de bancada (Aline, Lucas, Camila, prof. Rodrigo, Juliana), obrigada pela paciência em ensinar um universo tão novo para mim.

Agradeço, ainda, ao meu orientador professor Márcio. Obrigada pela oportunidade, pela paciência e pelo acolhimento. Admiro muito sua inteligência e seu amor pela profissão. Obrigada por tudo!

ANÁLISE DOS PERFIS SÉRICOS DE CITOCINAS E FORMAÇÃO DE CLUSTERS ASSOCIADOS COM AS FORMAS E COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA HANSENÍASE¹

Maria Wiliane do Nascimento Cunha²
Márcio Bezerra Santos³

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica e de evolução clínica lenta, causada pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*. Essa doença pode ser classificada de acordo com suas formas operacionais em paucibacilar e multibacilar; ou segundo critérios histopatológicos nas formas clínicas: indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchowiana. Na evolução clínica da doença os pacientes podem apresentar complicações como as reações hansênicas e ocorrência de incapacidade física. As manifestações clínicas e complicações da hanseníase estão relacionadas a diversos fatores como o background genético e aspectos imunológicos inerentes ao hospedeiro. Contudo, ainda não está esclarecido o papel exato das citocinas nas características da hanseníase. Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi investigar o papel das citocinas nas complicações e formas clínicas da hanseníase. Participaram da pesquisa 104 pacientes diagnosticados com hanseníase e seus controles contactantes (n = 70). Os pacientes foram classificados quanto à forma clínica e operacional da doença, bem como à ocorrência de reação hansênica e incapacidade física. Após coleta de sangue e separação do soro, foram dosadas citocinas dos perfis Th1, Th2, Treg, Th17, Th9 e Th22 através da técnica de Luminex. As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prisma e a formação de cluster foi realizada no programa R (3.6.0). Foi observado que citocinas do perfil inflamatório IL-12p70, IFN- γ , TNF- α e IL-18, apesar de pertencer ao perfil Th1, foram associados com a forma virchowiana e com a ocorrência de reação hansênica e incapacidade física. Já as citocinas IL-17 e IL-22, também do perfil inflamatório, foram associadas às formas tuberculóide. Quanto à análise de cluster, foi observado um cluster formado pelas citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-9, IL-5, IL-10 e IL-18 que estão envolvidos com as principais complicações da hanseníase. Por outro lado, houve formação do cluster composto pelas citocinas IL-12p70, IL-1 β , IL-23, IL-5, IL-2 e IL-17A em CC, este cluster pode estar relacionado a uma resposta imune eficaz contra *M. leprae*. Os resultados desse estudo demonstram que citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-18) estão envolvidas com as complicações da hanseníase. Ademais, identificamos citocinas (TNF- α , IL-18, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-27) envolvidas na ocorrência de complicações da hanseníase, as quais podem funcionar como biomarcadores para o monitoramento da evolução clínica da doença.

Palavras-chave: Hanseníase; Resposta imunológica; Citocinas; Formas clínicas; Imunopatogênese.

Dissertação de Mestrado desenvolvida pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

³ Professor doutor da Universidade Federal de Sergipe

ANALYSIS OF SERUM CYTOKIN PROFILES AND CLUSTERS FORMATION ASSOCIATED WITH CLINICAL FORMS AND COMPLICATIONS OF LEPROSY¹

Maria Wiliane do Nascimento Cunha²
Márcio Bezerra Santos³

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease with a slow clinical evolution, caused by the intracellular bacillus *Mycobacterium leprae*. This disease can be classified according to operational forms in paucibacillary and multibacillary, or according to histopathological criteria in the forms: indeterminate, tuberculoid, dimorphic and virchowian. In the clinical evolution of the disease, patients may present complications such as leprosy reactions and the occurrence of physical disability. The clinical manifestations and complications of leprosy are related to several factors such as the genetic background and immunological aspects inherent to the host. However, the exact role of cytokines in the characteristics of leprosy is still unclear. Therefore, the objective of this research was to investigate the role of cytokines in the complications and clinical forms of leprosy. 104 patients diagnosed with leprosy and their contact controls (n = 70) participated in the research. These were classified according to the clinical and operational form of the disease, as well as the occurrence of leprosy reaction and physical disability. After blood collection and serum separation, the dosage of cytokines of the profiles Th1, Th2, Treg, Th17, Th9 and Th22 produced by patients and contacts using the Luminex technique was observed. Statistical analyzes were performed using the Graphpad Prisma software and the cluster formation was performed using the R program (3.6.0). We observed that cytokines of inflammatory profile IL-12p70, IFN- γ , TNF- α and IL-18 were related to the virchowian form, as well as being linked to the occurrence of leprosy and physical disability. The cytokines IL-17 and IL-22 was associated with the tuberculoid form. As for the cluster analysis, it was observed the formation of a cluster formed by the cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-9, IL-5, IL-10 and IL-18 that are involved with the main complications of leprosy. On the other hand, there was formation of the cluster composed of the cytokines IL-12p70, IL-1 β , IL-23, IL-5, IL-2 and IL-17A in CC, this cluster may be related to an effective immune response against *M. leprae*. We conclude that cytokines of the Th1 profile (IFN- γ , TNF- α e IL-18) are involved with leprosy complications. In addition, we identified cytokines (TNF- α , IL-18, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-27) involved in the occurrence of leprosy complications, which can function as biomarkers for monitoring the clinical course of the disease.

Keywords: Leprosy; Immune response; Cytokines; Clinical forms; Immunopathogenesis.

Master's Dissertation developed by the Graduate Program in Parasitic Biology at the Federal University of Sergipe

² Master's student of the Graduate Program in Parasitic Biology.

³ PhD Professor at the Federal University of Sergipe.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo Geral.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	6
3 MATERIAL E MÉTODO.....	7
3.1 Desenho Experimental.....	7
3.2 Aspectos Éticos.....	8
3.3 Recrutamento dos Pacientes e Avaliação Clínica.....	8
3.4 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	9
3.5 Amostra do Estudo (n).....	10
3.6 Avaliação da expressão de citocinas.....	10
3.7 Análise Estatística.....	10
3.8 Análises De Cluster.....	11
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
5 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	48
APÊNDICE I – TCLE.....	52

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que possui evolução lenta e acomete nervos periféricos, pele e mucosas (Fonseca et al., 2017; Simon et al., 2011). Tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ou bacilo de Hansen, um patógeno intracelular obrigatório que infecta, preferencialmente, macrófagos e células de *Schwann*, possuindo tropismo por fibras nervosas periféricas (Fonseca et al., 2017; Freitas, Duarte, & Garcia, 2016).

Para fins de tratamento, os pacientes podem ser categorizados segundo a classificação operacional, que se baseia no número de lesões e no exame baciloscópico. Assim, são classificados como multibacilares (MB) quando há mais de cinco lesões cutâneas ou índice baciloscópico $\geq 2^+$, ou como paucibacilares (PB) quando há menos de cinco lesões cutâneas ou índice baciloscópico $< 2^+$ (Fonseca et al., 2017; Simon et al., 2011).

Além dessa classificação, há também um espectro de formas clínicas que foi estabelecido por Ridley e Jopling em 1966 (Ridley & Jopling, 1996). Eles estratificaram a hanseníase em cinco formas clínicas (abrangendo critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos e bacteriológicos). Há duas formas polares da doença, Hanseníase Tuberculoide (HT) e Hanseníase Virchowiana (HV), e há formas clínicas intermediárias que incluem Dimorfa Tuberculoide (HDT), Dimorfa (HD) e Dimorfa Virchowiana (HDV). A forma Indeterminada (HI) foi posteriormente adicionada a esta classificação (Fonseca et al., 2017; Santos et al., 2019; Simon et al., 2011). Os padrões dessas apresentações estão envolvidos com o *background* genético e fatores imunológicos inerentes ao hospedeiro (Azevedo et al., 2017), como o perfil de citocinas produzidas (Sadhu et al., 2016).

Citocinas são polipeptídeos produzidos por diversos tipos de células do sistema imunológico e atuam mediante processo parácrino ou autócrino. Diversas células podem secretar a mesma citocina e essa pode agir em diversos tipos de células. Essas substâncias influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência de células imunológicas, bem como regulam a produção e atividade de outras citocinas, podendo

aumentar a resposta inflamatória (pró-inflamatórias), como é o caso das células T *helper* tipo 1 (Th1), ou reduzir (anti-inflamatórias), como as células Th2 (Oliveira et al., 2011).

Linfócitos TCD4⁺ são divididos em diferentes subpopulações de células T, como Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Treg. As respostas das células Th1 (mediadas sobretudo por IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12) estão relacionadas com o controle da replicação e disseminação do *M. leprae* e está presente na forma tuberculóide da hanseníase (Dupnik et al., 2015; Duthie et al., 2012; Simon et al., 2011). Alternativamente, as respostas das células Th2 (mediadas por IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF) e T reguladoras (Treg – mediada sobretudo pela citocina anti-inflamatória IL-10 e TGF- β) estão associadas às apresentações clínicas multibacilares da hanseníase (Saini, Ramesh, & Nath, 2013).

A defesa contra o bacilo ocorre por meio da resposta imunológica celular, em que os bacilos são fagocitados e destruídos. Essa resposta é mediada por citocinas como IFN- γ , TNF- α e produção de mediadores oxidativos. Nas lesões tuberculóides há predomínio de células TCD4⁺ e citocinas Th1, enquanto nas lesões virchowianas o predomínio é de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (Freitas, 2015).

A dicotomia Th1/Th2 para a definição das formas clínicas da hanseníase vêm sendo modificada. Isso tem sido possível devido ao aumento de estudos na área de imunologia, que ampliou o conhecimento acerca de outros padrões de resposta (De Sousa; Sotto; Quaresma, 2017). Além dessas respostas, estudos têm apontado para o surgimento de outros subtipos dos linfócitos Th, dentre eles Th9 (mediada por IL-9), Th17 (IL-1 β e IL-17) e Th22 (mediada por IL-22). Porém, o papel dessas citocinas na apresentação clínica da hanseníase ainda não está bem definido na literatura (De Sousa; Sotto; Quaresma, 2017).

Estudos prévios demonstraram papel protetor da IL-1 β e da IL-17 (citocinas da resposta Th17) contra patógenos intracelulares (Akdis *et al.*, 2011; Burgler *et al.*, 2008). Foi demonstrado maior liberação de IL-17A em sobrenadante do PBMC de pacientes HT e controles contactantes, além disso, foi descrito que o aumento de citocinas associadas a células Th17 pode contribuir para a inflamação envolvida no eritema nodoso hansênico (ENH) (Saini *et al.*, 2016). Contudo, o envolvimento das citocinas do padrão Th17 na indução de reação hansênica é controverso na literatura, visto que, segundo Santos e colaboradores (2017), as células Th17 estão relacionadas com uma

resposta inflamatória efetiva que conduz a apresentação da forma paucibacilar, sem induzir reação (Santos *et al.*, 2017).

Apesar de pesquisas mostrarem como as respostas Th1, Th2 e Treg podem influenciar na imunopatogênese da hanseníase, o impacto de mecanismos imunológicos sobre a persistência do *M. leprae* e a gravidade da doença ainda carecem de esclarecimentos. Sabe-se que uma resposta exagerada da imunidade celular, apesar de impedir a multiplicação bacilar, pode se tornar lesiva ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais (Borges *et al.*, 2016). É necessário um melhor esclarecimento sobre a atuação das citocinas na indução de complicações na hanseníase.

Na evolução clínica da doença, os pacientes podem apresentar complicações clínicas como reações hansênicas e surgimento de incapacidade física. Embora essas complicações sejam relevantes na hanseníase, seus mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (Duthie *et al.*, 2011; D. T. De Oliveira *et al.*, 2012; Vital *et al.*, 2013). A intensidade, extensão e distribuição do acometimento nervoso dependem da forma clínica, da fase evolutiva da doença e do conjunto de citocinas estimulado (Vital *et al.*, 2013).

As reações hansênicas (RH) além de serem episódios debilitantes e por vezes de difícil controle, são eventos imuno-inflamatórios agudos que predis põem ou agravam as lesões neurológicas e são responsáveis pelas incapacidades físicas, complicação importante da doença. Essas reações podem acontecer antes, durante ou após o tratamento específico (Antonio *et al.*, 2011; Vital *et al.*, 2013). As RH podem ser classificadas como reação reversa, ou reação do tipo I (RR), e eritema nodoso hansênico (ENH), ou reação de tipo II (Khadge *et al.*, 2015). Na ausência de intervenção precoce, o paciente pode evoluir com sequelas graves que são responsáveis pelo forte estigma social e comprometimento significativo da qualidade de vida (Lockwood *et al.*, 2007).

A RR é uma reação de imunidade celular caracterizada por resposta exacerbada do hospedeiro aos antígenos liberados durante o combate ao bacilo (Oliveira *et al.*, 2012). Já o ENH, está relacionado a imunidade humoral, mediante produção de anticorpos e formação de imunocomplexo (Antonio *et al.*, 2011). Como mencionado, essas reações hansênicas podem conduzir à incapacidade física, que variam do grau 0 ao

grau 2. Para determinar o grau de incapacidade física, deve-se realizar o teste de sensibilidade, mediante avaliação dos olhos, mãos e pés (OMP). Esse teste é realizado com monofilamentos de Semmes-Weinstein, considera-se normal (grau de incapacidade 0) quando o paciente é capaz de sentir o toque com os monofilamentos e anormal (grau de incapacidade 2) quando o paciente é incapaz de sentir o toque do monofilamento com peso igual ou superior a 2g. Ainda durante a avaliação de incapacidade, verifica-se a força muscular mediante observação da capacidade de oposição à força da gravidade e à resistência manual exercida contra braços, mãos e pés (Brasil, 2017). No Brasil, entre os anos de 2009 a 2018 foram detectados mais de 20 mil casos novos de hanseníase com grau 2 de incapacidade física (Brasil, 2020). Isso evidencia diagnóstico tardio, acarretando maior grau de comprometimento físico do paciente com hanseníase.

Em aspectos epidemiológicos, o Brasil é o país responsável pela endemia da hanseníase no continente americano, abrangendo 93,8% dos casos relatados (Brito et al., 2016). A taxa de detecção de casos novos em 2014 foi de 15,44 casos por 100.000 habitantes, a taxa de grau de incapacidade física 2 foi de 0,99 por 100.000 habitantes e a taxa de detecção em menores de 15 anos foi de 5,03 casos por 100.000 habitantes. A maior prevalência tem sido relatada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Freitas et al., 2016). Em Sergipe, um estudo ecológico e de série temporal realizado por Santos e colaboradores (2019), mostrou que a taxa de incidência foi reduzida de 6,29 para 3,78 casos por 100.000 habitantes de 2002 a 2015. No entanto, Sergipe ainda foi classificado como município de alta endemicidade. No mesmo estudo, técnicas de análise espacial mostraram que as áreas de maior prevalência da doença estão distribuídas no nordeste do estado e nas cidades da região metropolitana de Aracaju (Santos et al., 2019).

Para uma melhor compreensão da dinâmica da doença, é importante conhecer os fatores de risco associados à predisposição à doença e às suas complicações, como os estados reacionais e lesões neurológicas. Diversos aspectos já foram associados à susceptibilidade à doença, como variações geográficas, sexo, idade, variações da resposta imune e polimorfismos genéticos. Contudo, o aprofundamento do entendimento dos mecanismos imunopatogênicos da hanseníase é ainda requerido, principalmente no tocante a variabilidade funcional das citocinas.

Como já mencionado, o papel exato das citocinas não foi totalmente elucidado na hanseníase. Além disso, há lacunas na literatura quanto ao conhecimento das

citocinas que estão associadas com complicações clínicas da hanseníase, tais como incapacidade física e ocorrência de reação hansênica. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar o papel dos diferentes perfis de citocinas na apresentação e complicações clínicas da hanseníase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Associar os perfis de citocinas com as formas e complicações clínicas da hanseníase.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Associar o perfil de citocinas das respostas imunes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Treg com às formas clínicas da hanseníase.

Hipótese: Citocinas das respostas imunes Th1, Th17 e Th22 estão relacionadas a forma paucibacilar da hanseníase, enquanto as citocinas de padrão Th2, Th9 e Treg são associados à forma multibacilar.

- II. Associar o perfil de citocinas das respostas imunes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Treg com a ocorrência de reação hansênica e lesão neurológica.

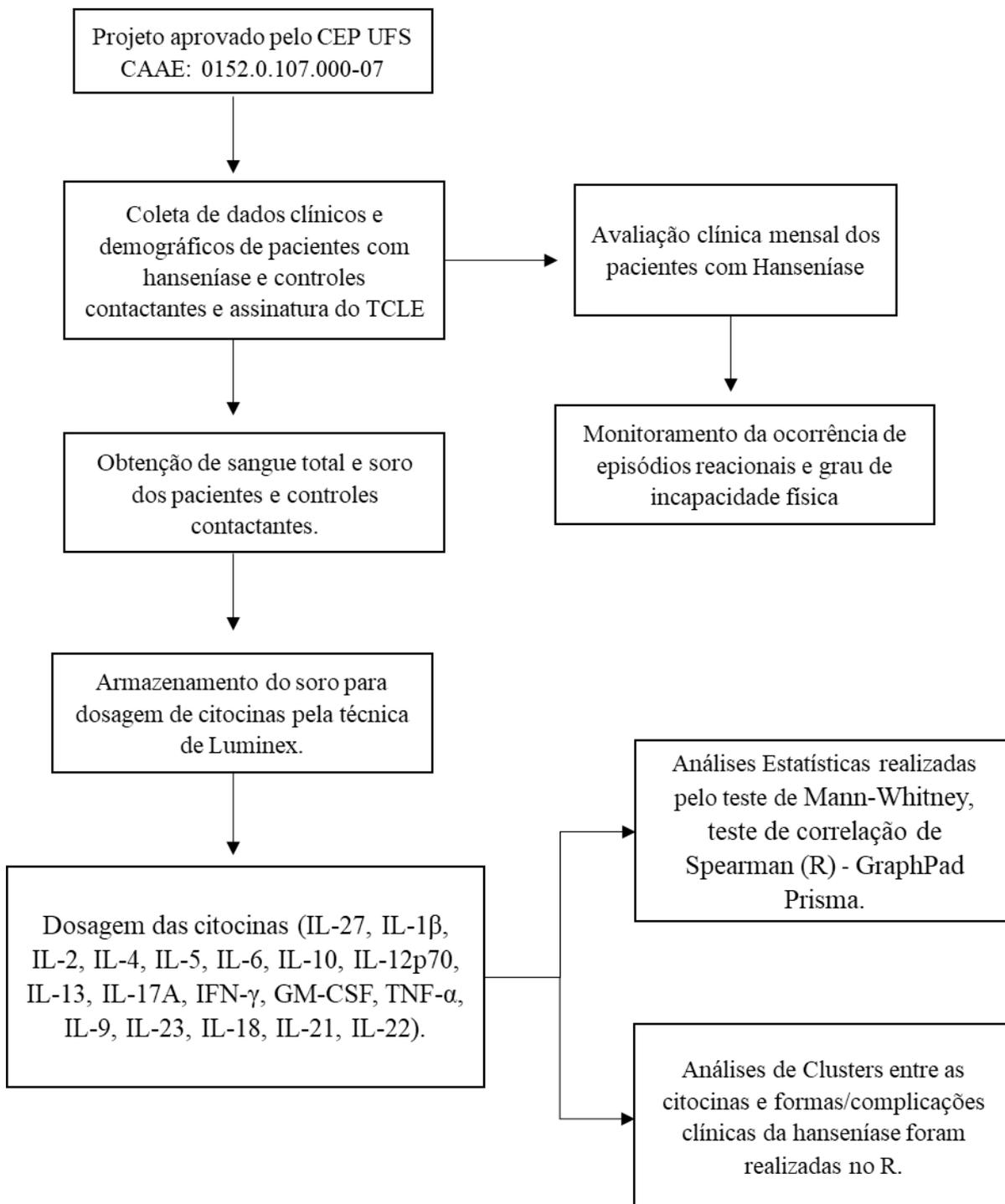
Hipótese: Citocinas das respostas imunes Th2 e Th9 estão associadas com o desenvolvimento de episódios reacionais e lesão neurológica. Enquanto citocinas do perfil Th1, Th17 e Th22 não estão envolvidos nessas incapacidades.

- III. Identificar a ocorrência de clusters das citocinas com as formas e complicações clínicas da Hanseníase.

Hipótese: A ocorrência de Clusters dos perfis Th1-Th17-Th22 estão associados com as formas paucibacilares da hanseníase, enquanto Clusters dos perfis Th2-Th9 estão associados com as formas multibacilares.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Desenho Experimental



3.2 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, CAAE 0152.0.107.000-07. A pesquisa não traz nenhum risco relevante para os participantes da pesquisa, além de pequena morbidade decorrente de procedimentos simples largamente utilizados na atenção médica aos pacientes, como punção venosa. A punção venosa foi realizada utilizando equipamento de proteção individual, estéril e descartável. Este procedimento poderia causar dor local e pequena área de equimose, a qual foi evitada por compressão da área de punctura e uso de curativo oclusivo.

Além disso, cada sujeito do estudo foi informado sobre os objetivos e a justificativa da pesquisa, e acerca das etapas as quais ele foi submetido, como a aplicação do questionário investigativo e a coleta de amostra biológica. Após a concordância para participar do estudo, o paciente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice I), conforme recomendações da normativa 466/12.

As informações pessoais de cada sujeito foram confidencialmente armazenadas, com o intuito de minimizar os riscos de publicidades desses dados. O questionário investigativo, o banco de dados e as amostras foram identificados apenas por um código do indivíduo. As amostras biológicas (soro) dos pacientes foram armazenadas no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Hospital Universitário (LIBM-HU), em freezers a -20 e -80°C, sob a responsabilidade dos Professores Dr. Márcio Bezerra Santos e Dra. Amélia Ribeiro de Jesus.

3.3 Recrutamento dos Pacientes e Avaliação Clínica

Participaram da pesquisa pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do projeto (DES)MANCHA-SE da Universidade Federal Sergipe, no Hospital Universitário (Aracaju, SE). O projeto (DES)MANCHA tem como principal objetivo detectar os casos de Hanseníase do Estado de Sergipe. Cada paciente foi inicialmente avaliado para caracterização da forma operacional e forma clínica da hanseníase, ocorrência de reações hansênicas e determinação do grau de incapacidade física.

Os pacientes foram classificados em Paucibacilares (PB) ou Multibacilares (MB), de acordo com o protocolo da poliquimioterapia (PQT) para hanseníase e os

padrões do Ministério da Saúde do Brasil e da Associação Internacional de Hanseníase (ILA). As formas clínicas foram caracterizadas pelos critérios histopatológicos das biópsias, estabelecidos por Ridley-Jopling (Ridley & Jopling, 1996): Hanseníase Indeterminada (HI), Tuberculóide (HT), Dimorfa Tuberculóide (HDT), Dimorfa (HD), Dimorfa Virchowiana (HDV) ou Virchowiana (HV). A caracterização das formas clínicas da doença foi feita através da coleta de biópsia de pele. Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes que concordaram em participar do estudo. Essas amostras foram centrifugadas para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas em freezer a -80 °C.

Ademais, os pacientes foram acompanhados mensalmente durante o tratamento da hanseníase, avaliando sinais e sintomas relacionados às reações hansênicas (febre, artralgia, linfadenomegalia, exacerbação das lesões, lesões novas na pele, nódulos subcutâneos) e sinais de incapacidade física (perda de sensibilidade ou motricidade periférica). Exame físico com avaliação do grau de incapacidade física foi realizado no início, meio e final da PQT. Os pacientes foram classificados seguindo a escala de incapacidade física estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em graus 0, 1 e 2. Além disso, eles foram agrupados caso apresentassem ou não, durante ou após o tratamento, algum tipo de episódio reacional como Reação do Tipo 1 (Reação Reversa - RR) ou Reação do Tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico – ENH).

Adicionalmente, foram coletadas informações clínicas e amostras de sangue de indivíduos saudáveis e controles contactantes dos pacientes, sem histórico de Hanseníase, de ambos os sexos, para avaliações clínicas e imunológicas. Os controles contactantes são indivíduos que vivem em contato próximo e prolongado com os pacientes, estão expostos ao bacilo, no entanto não desenvolveram a doença.

3.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

O critério de inclusão estabelecido foi ter o diagnóstico confirmado da hanseníase. Entre os critérios de exclusão estão: ter outra infecção ou condição clínica (HIV, HTLV-I, Diabetes mellitus e gestação) que interfira na resposta imunológica do paciente e dessa forma afete a forma clínica da doença ou sua gravidade. Exames laboratoriais de rotina foram realizados para que pudesse confirmar o diagnóstico e fazer o acompanhamento da terapêutica.

3.5 Amostra do Estudo (n)

A amostra foi constituída por 104 pacientes infectados pelo *M. leprae* que atenderem aos critérios de inclusão descritos, divididos entre multibacilares e paucibacilares. Além da classificação por forma clínica, os dados das dosagens de citocinas foram comparados de acordo com a ocorrência de episódios de reação hansênica e segundo o grau de incapacidade física dos pacientes. Participaram também 70 controles contactantes.

3.6 Avaliação da expressão de citocinas

Todas as avaliações imunológicas foram realizadas antes do início do tratamento com a PQT para evitar qualquer viés de interferência na resposta imune do indivíduo. O sangue de cada paciente foi coletado em tubos com heparina (10 UI/ml) e identificado para separação do soro. As amostras de soro foram analisadas para dosagem das citocinas IL-27, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-9, IL-23, IL-18, IL-21, IL-22 pela técnica de Luminex, (Kit Milliplex - Painel Magnético Th17 Human, Panomics, Affymetrix, Fremont, CA). Os resultados foram expressos em pg/ml com base em uma curva padrão utilizando comparação com os valores do meio sem estímulo.

Após a dosagem de citocinas, os níveis séricos foram comparados entre os pacientes e controles contactantes. Além disso, realizamos a associação entre a expressão de diferentes citocinas com a classificação operacional da hanseníase (Multibacilar e Paucibacilar), com as formas clínicas (Hanseníase Indeterminada, Tuberculóide, Dimorfa e Virchowiana), com a ocorrência de reação hansênica e de acordo com o grau de incapacidade física.

3.7 Análise Estatística

Os testes de D'Agostino e Pearson foram aplicados para analisar a distribuição paramétrica dos dados. As concentrações de citocinas foram comparadas entre os diferentes subgrupos (PB, MB e controle contactante), de acordo com as formas clínicas polares da hanseníase (HT e HV) e segundo a ocorrência de reação hansênica e o grau de incapacidade física. Para tanto, as diferenças estatísticas entre os grupos foram

determinadas pelo teste de Mann-Whitney. Comparações de médias para um determinado parâmetro foram feitas pelo teste T. A correlação entre os níveis de citocinas foi realizada pelo teste de correlação de Spearman (R). Todas as análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism, versão 8.0. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de $p < 0,05$.

3.8 Análises De Cluster

A análise de conglomerados (cluster) é uma técnica multivariada de classificação que objetiva agrupar dados de acordo com as similaridades entre eles (Bem, Giacomini, Waismann, 2015). É um conjunto de técnicas estatísticas cujo objetivo é agrupar objetos segundo suas características, formando grupos ou conglomerados homogêneos (James *et al.*, 2013). Os conglomerados obtidos devem apresentar tanto uma homogeneidade interna, como uma grande heterogeneidade externa (Bem, Giacomini, Waismann, 2015). Como o objetivo da análise de cluster é agrupar objetos semelhantes, é necessária uma medida da distância entre as variáveis, dessa forma os objetos com menor distância entre si são mais semelhantes, logo se encontram em um mesmo conglomerado (Bem, Giacomini, Waismann, 2015).

Em nosso estudo foi usado a distância de Ward, método que tem uma métrica fixa e, dessa forma, poderá ser reproduzido por outros estudos. Esse método começa com todos os objetos em um único grupo, a soma de quadrados entre os grupos é calculada sobre todas as variáveis, apresentando como resultado agrupamentos de tamanhos aproximadamente iguais, devido a minimização da variação interna. O resultado desse método é apresentado pelo gráfico *Heatmap*, o qual agrupa as variáveis analisadas (citocinas) e os pacientes. O *heatmap* mostra a informação da distância entre o valor verificado para o indivíduo em relação à média da variável por meio do desvio-padrão. A média de todas as variáveis foi calculada, assim como o desvio-padrão de cada indivíduo. Quanto mais forte a cor do indivíduo representado no *heatmap*, maior é seu desvio-padrão (James *et al.*, 2013, Hastie, Tibshirani, Friedman, 2008).

Tomando esses dados em conjunto, citocinas que estiverem com o desvio-padrão mais alto estão associadas com a susceptibilidade a ocorrência de complicações clínicas da hanseníase, e citocinas que estiverem mais baixas estão associadas com a proteção. Essa análise foi realizada no programa R versão 3.6.0.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Título do artigo: Níveis elevados de citocinas do perfil Th1 (INF- γ , TNF- α e IL-18) estão associados com as formas multibacilares e complicações clínicas na hanseníase.

Nome da revista: Scandinavian Journal of Immunology.

Situação: Em preparação.

NÍVEIS ELEVADOS DE CITOCINAS DO PERFIL Th1 (INF- γ , TNF- α e IL-18) ESTÃO ASSOCIADOS COM AS FORMAS MULTIBACILARES E COMPLICAÇÕES CLÍNICAS NA HANSENÍASE

RESUMO

Na evolução clínica da hanseníase pode ocorrer complicações como reação hansênica (RH) e incapacidade física. Contudo, não está claro o papel das citocinas na apresentação clínica da doença. Este estudo objetivou avaliar o papel das citocinas nas formas e complicações clínicas da hanseníase. Participaram da pesquisa 104 pacientes e 70 controles contactantes (CC). Os pacientes foram classificados quanto à forma clínica e quanto à ocorrência de RH e incapacidade física. Foi realizada coleta de sangue e dosagem de citocinas dos perfis Th1, Th2, Treg, Th17, Th9 e Th22 através da técnica de Luminex. As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism e as de *cluster* foram realizadas no programa R versão 3.6.0. Citocinas do perfil inflamatório Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-18) foram associadas à forma virchowiana, à ocorrência de RH e incapacidade física. Já as citocinas IL-17 e IL-22, também do perfil inflamatório, foram associadas às formas tuberculóide. Quanto à análise de *cluster*, foi observado a formação de *cluster* com as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-9, IL-5, IL-10 e IL-18 que estão envolvidos com as principais complicações da hanseníase. Houve também formação do cluster composto pelas citocinas IL-12p70, IL-1 β , IL-23, IL-5, IL-2 e IL-17A em CC, isso pode estar relacionado a uma resposta imune eficaz contra *M. leprae*. Citocinas do perfil Th1 estão associadas com a forma multibacilar e com complicações clínicas da hanseníase. Ademais, a identificação de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-18 podem funcionar como biomarcadores para o monitoramento da evolução clínica da doença.

Palavras-chave: Hanseníase; Resposta imunológica; Citocinas.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causado pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*, que acomete nervos periféricos, pele e mucosas⁽¹⁾. Essa doença pode se manifestar através de um amplo espectro de sinais e sintomas e o diagnóstico baseia-se primariamente nos sinais clínicos e no exame histopatológico⁽²⁾. Baseado nessas características, a hanseníase pode ser subdividida segundo classificação operacional (multibacilar-MB e paucibacilar-PB)⁽²⁾ e classificação clínica histopatológica (hanseníase indeterminada-HI, tuberculoide-HT, dimorfa-HD ou virchowiana-HV)⁽³⁾.

As formas clínicas da doença apresentam distribuição espectral e estão associadas com o *background* genético e fatores imunológicos do hospedeiro, frente à infecção pelo *M. leprae*^(1,4). Ao longo do curso da doença, parte significativa dos pacientes desenvolve complicações inflamatórias agudas, também denominadas de reações hansênicas (RH) ou episódios reacionais⁽⁵⁾. Os episódios reacionais são as principais causas de internação dos pacientes com hanseníase e podem provocar sequelas neurológicas graves caracterizadas por incapacidade física grau 1 ou 2⁽⁴⁾. As RH podem ser classificadas como reação reversa, ou reação do tipo 1 (RR), e eritema nodoso hansênico (ENH), ou reação de tipo II⁽⁶⁾. A RR é uma reação de imunidade celular caracterizada por resposta exacerbada do hospedeiro aos antígenos liberados durante o combate ao bacilo⁽⁷⁾. Já o ENH, está relacionado à imunidade humoral, mediante produção de imunoglobulinas e formação de imunocomplexos⁽⁷⁾.

As reações hansênicas podem conduzir também à incapacidade física, que variam do grau 0 ao grau 2. Segundo Boletim epidemiológico da hanseníase no Brasil, entre os anos de 2009 a 2018 foram detectados mais de 20 mil casos novos de hanseníase com grau 2 de incapacidade física⁽⁸⁾. Isso evidencia diagnóstico tardio, acarretando maior grau de comprometimento físico do paciente com hanseníase⁽⁹⁾.

Para uma melhor compreensão da dinâmica da doença, é importante conhecer os fatores de risco associados a predisposição à doença e às suas complicações, como os estados reacionais e lesões neurológicas. Diversos aspectos já foram associados a susceptibilidade à doença, como variações geográficas, sexo, idade, variações da

resposta imune e polimorfismos genéticos. Contudo, o aprofundamento do entendimento dos mecanismos imunopatogênicos da hanseníase é ainda requerido, principalmente no tocante à variabilidade funcional das citocinas.

A defesa contra o bacilo ocorre por meio da resposta imunológica celular, em que os bacilos são fagocitados e destruídos. Essa resposta é mediada por citocinas como IFN- γ , TNF- α e produção de mediadores oxidativos. Nas lesões tuberculóides há predomínio de células TCD4⁺ e citocinas Th1, enquanto nas lesões virchowianas o predomínio é de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10^(1,2,5,6). Além dessas respostas, estudos têm apontado para o surgimento de outros subtipos dos linfócitos Th, dentre eles Th9 (mediada por IL-9), Th17 (IL-1 β e IL-17) e Th22 (mediada por IL-22)⁽¹⁰⁾. Porém, o papel dessas citocinas na apresentação clínica da hanseníase ainda não está bem definido na literatura. Recentemente, foi demonstrado que células Th17 estão relacionadas com uma resposta inflamatória efetiva que conduz a apresentação da forma PB, sem induzir reação hansênica⁽¹³⁾.

O papel dos diferentes perfis de citocinas não foi totalmente elucidado na hanseníase. Além disso, há lacunas na literatura quanto ao conhecimento das citocinas que estão associadas com as complicações clínicas da doença, como incapacidade física e ocorrência de RH. Estudos já demonstraram que uma resposta exagerada da imunidade celular, a exemplo de citocinas do perfil Th1, apesar de impedir a multiplicação bacilar, pode se tornar lesiva ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais⁽¹⁰⁻¹³⁾. Dessa forma, este estudo objetivou compreender o papel das citocinas, de forma isolada ou em grupos (conglomerados), na apresentação das formas clínicas e ocorrências de complicações na hanseníase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação ética: Esse projeto envolve pesquisa com seres humanos e segue as recomendações da normativa 466/12. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, CAAE 0152.0.107.000-07. Todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo e os que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Sujeitos da pesquisa: Participaram da pesquisa pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do projeto (DES)MANCHA-SE da Universidade Federal Sergipe, no Hospital Universitário (Aracaju, SE). Cada paciente foi inicialmente avaliado para caracterização da forma operacional e forma clínica da hanseníase, ocorrência de reações hansênicas e determinação do grau de incapacidade física. Os pacientes foram classificados em PB (n= 40), MB (n= 64), de acordo com o protocolo da poliquimioterapia (PQT) para hanseníase e estabelecido pelo Ministério da Saúde do Brasil e da Associação Internacional de Hanseníase (ILA). Os pacientes também foram classificados de acordo com as formas clínicas, segundo critérios histopatológicos das biópsias: HI (n= 11), HT (n= 20), HDT (n=06), HD (n=22), HDV (n= 09), HN (n= 09) ou HV (n=19). Também foram classificados quanto a ocorrência de reação hansênica em RH+ (n= 27) e RH- (n= 52). Um total de 70 controles contactantes (CC) participaram da pesquisa. Os CC eram indivíduos que conviviam no mesmo domicílio que o paciente, geralmente o cônjuge, e que estavam continuamente expostos ao bacilo, mas não desenvolveram a doença. Foi coletado sangue total de todos os envolvidos na pesquisa. As amostras foram centrifugadas e o soro foi armazenado em freezer a -80°C.

Avaliação da expressão de citocinas: Todas as avaliações imunológicas foram realizadas antes do início do tratamento com a PQT para evitar qualquer viés de interferência na resposta imune do indivíduo. Foram excluídos pacientes com comorbidades como HIV, HTLV, diabetes, gravidez ou qualquer condição clínica que afetasse a resposta imune. As amostras de soro foram analisadas pela técnica de Luminex, (Kit Milliplex - Painel Magnético Th17 Human, Panomics, Affymetrix, Fremont, CA) para dosagem das citocinas IL-27, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-9, IL-23, IL-18, IL-21, IL-22. Após a dosagem de citocinas, os níveis séricos foram comparados entre os pacientes e controles contactantes. Realizamos também a associação entre a expressão de diferentes citocinas com a classificação operacional da hanseníase, com as formas clínicas, com a ocorrência de reação hansênica e com o grau de incapacidade física.

Análise estatística: Os testes de D'Agostino e Pearson foram aplicados para analisar a distribuição paramétrica dos dados. As concentrações de citocinas foram comparadas entre os diferentes subgrupos (PB, MB e controle contactante), de acordo com as formas clínicas da hanseníase (HI, HT e HV) e segundo a ocorrência de reação hansênica e o

grau de incapacidade física. Para tanto, as diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney. Comparações de médias para um determinado parâmetro foram feitas pelo teste T. A correlação entre os níveis de citocinas foi realizada pelo teste de correlação de Spearman (R). Todas as análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism, versão 8.0. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de $p < 0,05$.

Análise de cluster: A análise de conglomerados (*cluster*) é uma técnica multivariada de classificação que objetiva agrupar dados de acordo com as similaridades entre eles ⁽¹⁴⁾. É um conjunto de técnicas estatísticas cujo objetivo é agrupar objetos segundo suas características, formando grupos ou conglomerados homogêneos ⁽¹⁵⁾. Os conglomerados obtidos devem apresentar tanto uma homogeneidade interna, como uma grande heterogeneidade externa ⁽¹⁴⁾. Como o objetivo da análise de *cluster* é agrupar objetos semelhantes, é necessária uma medida da distância entre as variáveis, dessa forma os objetos com menor distância entre si são mais semelhantes, logo se encontram em um mesmo conglomerado ⁽¹⁶⁾. Em nosso estudo foi usado a distância de *Ward*, método que tem uma métrica fixa e, dessa forma, poderá ser reproduzido por outros estudos. Esse método começa com todos os objetos em um único grupo, a soma de quadrados entre os grupos é calculada sobre todas as variáveis, apresentando como resultado agrupamentos de tamanhos aproximadamente iguais, devido a minimização da variação interna. O resultado desse método é apresentado pelo gráfico *Heatmap*, o qual agrupa as variáveis analisadas (citocinas) e os pacientes. O *heatmap* mostra a informação da distância entre o valor verificado para o indivíduo em relação à média da variável por meio do desvio-padrão. A média de todas as variáveis foi calculada assim como o desvio-padrão de cada indivíduo. Quanto mais forte a cor do indivíduo representado no *heatmap*, maior é seu desvio-padrão ^(15,17). Tomando esses dados em conjunto, citocinas que estiverem com o desvio-padrão mais alto estão associadas com a susceptibilidade a ocorrência de complicações clínicas da hanseníase, e citocinas que estiverem mais baixas estão associadas com a proteção. Essa análise foi realizada no programa R versão 3.6.0.

RESULTADOS

Características clínicas e sociodemográficas dos participantes do estudo

Não foram observadas diferenças em relação à média de idade entre os grupos (Tabela 1). No entanto, a proporção de homens com a forma MB (72,41%) foi significativamente maior do que aqueles com a forma PB (27,59%; p -valor = 0,01; Odds Ratio/OR = 2,86). A maioria dos pacientes MB se consideram negros/pardos, se comparado com os PB (72,41% versus 27,59%). Como esperado, os pacientes MB tiveram maior número de lesões (média \pm desvio padrão = $7,6 \pm 5,29$) do que os PB ($1,46 \pm 1,21$; p -valor $<0,0001$). Similarmente, a ocorrência de episódios reacionais também foi significativamente maior entre os MB do que PB (59,37% versus 17,5%; p -valor $< 0,0001$; OR = 6,89). Observamos também que a maioria dos MB desenvolveu incapacidade física grau 1 (39,6%; p -valor = 0,01; OR = 3,63) e grau 2 (25%; p -valor = 0,03; OR = 4,11), quando comparado aos PB.

Tabela 1. Dados demográficos e características clínicas de pacientes agrupados de acordo com as formas operacionais da hanseníase Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB) e controles contactantes (CC).

Variáveis		MB (n=64)	PB (n=40)	CC (n=70)	p -valor	Odds Ratio	IC (95%)
Idade	Variação	06-88	10-74	07-82			
	Média \pm DP	47,27 \pm 17,82	45,23 \pm 15,20	41,64 \pm 15,63			--
Gênero (masculino)	n (%)	42 (72,41) ^a	16 (27,59) ^b	17 (31,48)	**0,01	2,86	1,26 a 6,47
Etnia (negro/pardo)	n (%)	48 (63,16) ^a	28 (36,84) ^b	40 (57,14)	0,91	1,05	0,38 a 2,85
Número de lesões	Variação	2-40	0-5	--	* $<0,0001$	--	--
	Média \pm DP	7,6 \pm 5,29	1,46 \pm 1,21				
Forma Clínica (HV/HDV)	n (%)	28 (43,75)	00 (0,0)	--	* $<0,0001$	--	--
Reação Hansênica	n (%)	38 (59,37)	07 (17,5)	--	** $<0,0001$	6,89	2,64 a 17,93
Lesão Neurológica	n (%)	41 (64,06)	9 (22,5)	--	** $<0,0001$	5,65	2,31 a 13,81
GIF	Grau 1 n (%)	25 (39,6)	06 (15)	--	**0,01	3,63	1,33 a 9,9
	Grau 2 n (%)	16 (25)	03 (7,5)	--	**0,03	4,11	1,11 a 15,17

DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; GIF: Grau de Incapacidade Física; *Mann-Whitney test; **Fisher exact test; ^{ab}Análise pelo Exato de Fisher.

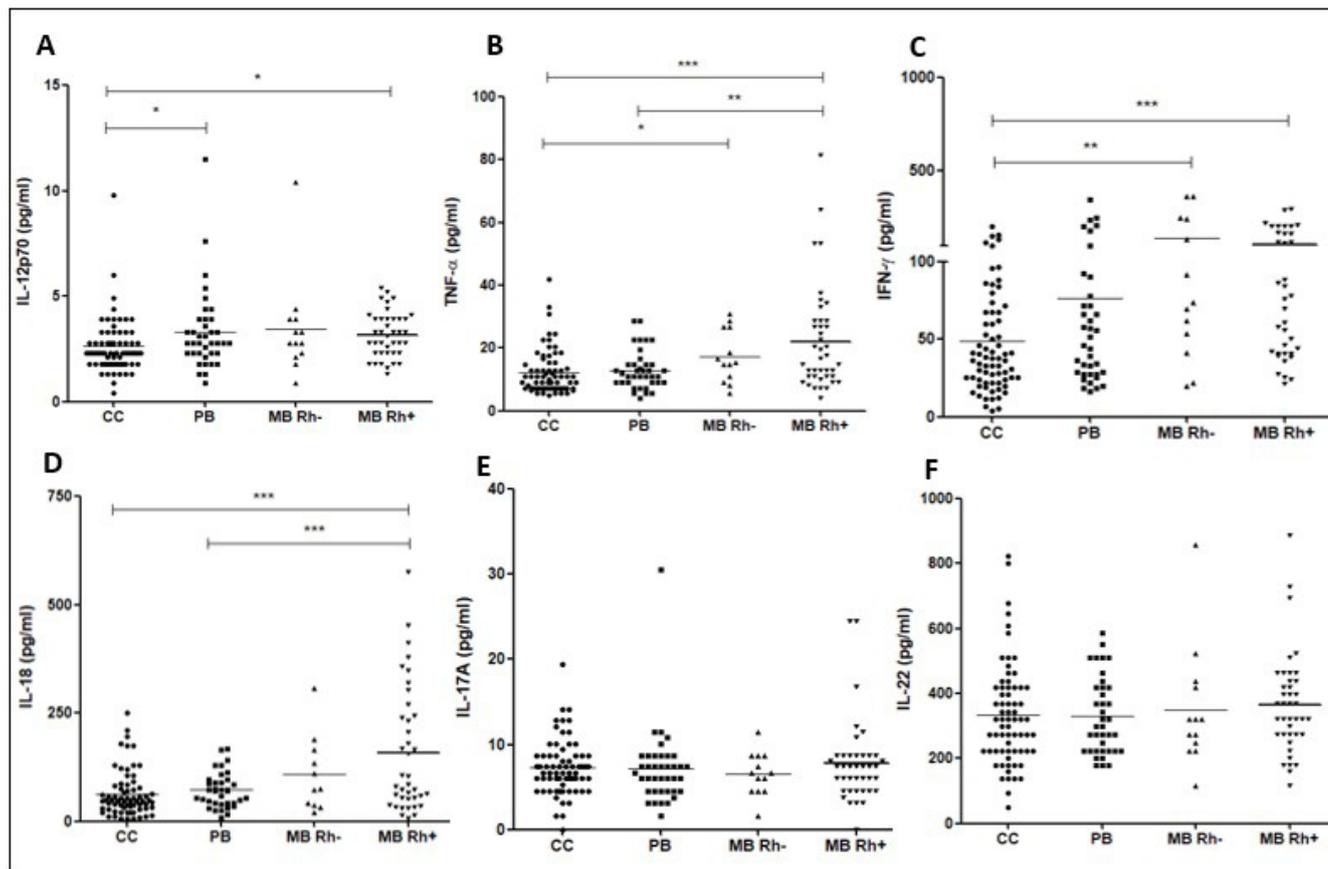
Associação de citocinas com formas e complicações clínicas da Hanseníase

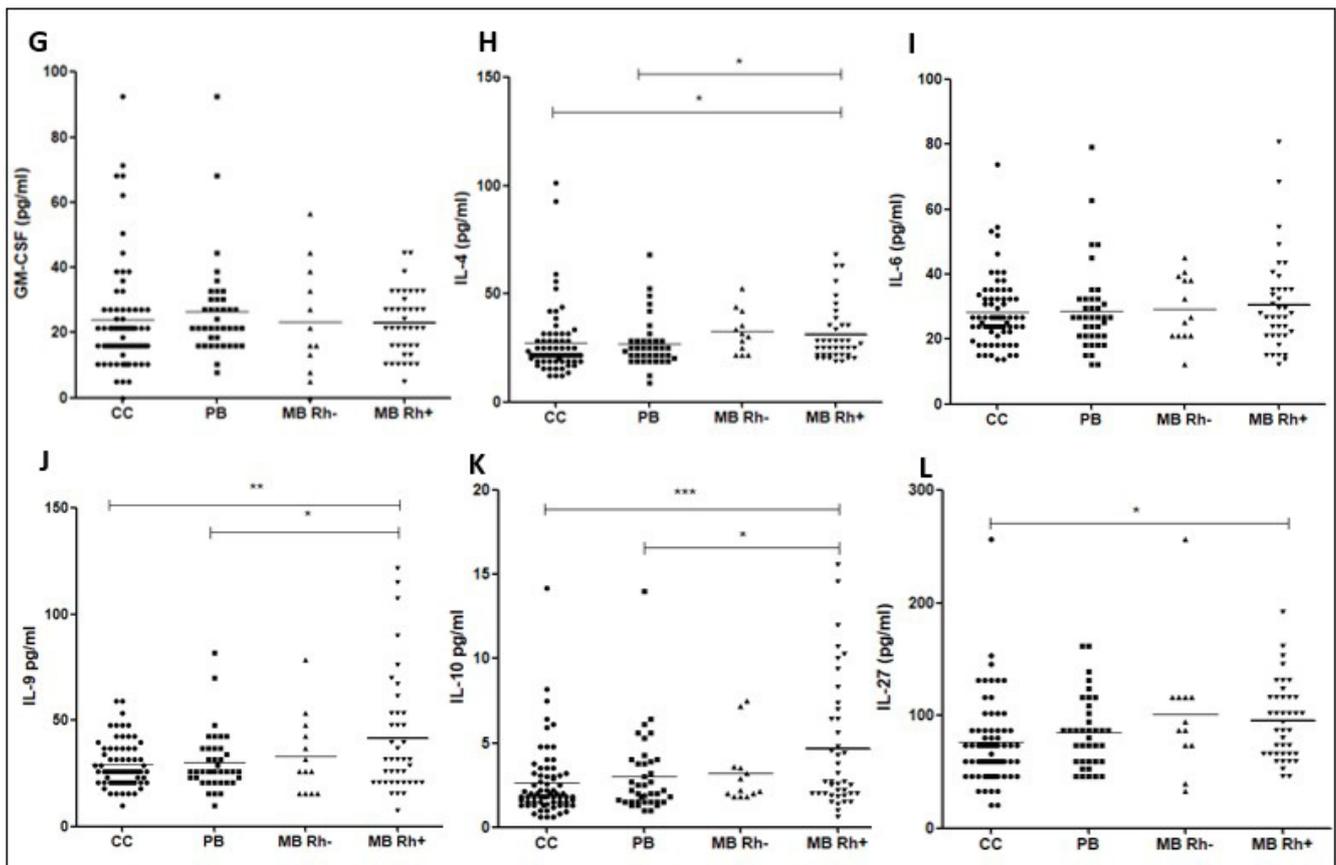
Em seguida, foram analisados os níveis séricos de citocinas (perfil inflamatório e anti-inflamatório) dos pacientes para avaliar a resposta imune sistêmica. Para essas análises, os pacientes MB foram agrupados em duas categorias, aqueles sem reação hansênica (RH-) e aqueles com reações (RH+) (Figura 1A-L).

Em relação ao perfil inflamatório Th1, foram observadas maiores concentrações de TNF- α no soro dos pacientes MB RH+ ($22,1 \pm 16,66$ pg/ml), quando comparado aos PB ($12,9 \pm 6,14$ pg/ml; p -valor = 0,002) e CC ($12,3 \pm 7,09$ pg / ml; p -valor <0,001; Fig. 1B). Da mesma forma, houve maior concentração de IFN- γ no soro de pacientes MB RH+ ($104,3 \pm 78,98$ pg/ml; p -valor <0,0001) e MB RH- ($138,3 \pm 125,0$ pg/ml; p -valor =0,01) quando comparado com CC ($48,7 \pm 38,63$ pg/ml; Fig. 1C). Níveis mais elevados da IL-18 também foram identificados nos MB RH+ ($158,0 \pm 144,3$ pg/ml; p -valor =0,0002; Fig. 1D) quando comparado com os demais grupos. Não foram observadas diferenças em relação aos níveis de IL-17A e IL-22 (Fig. 1E e F).

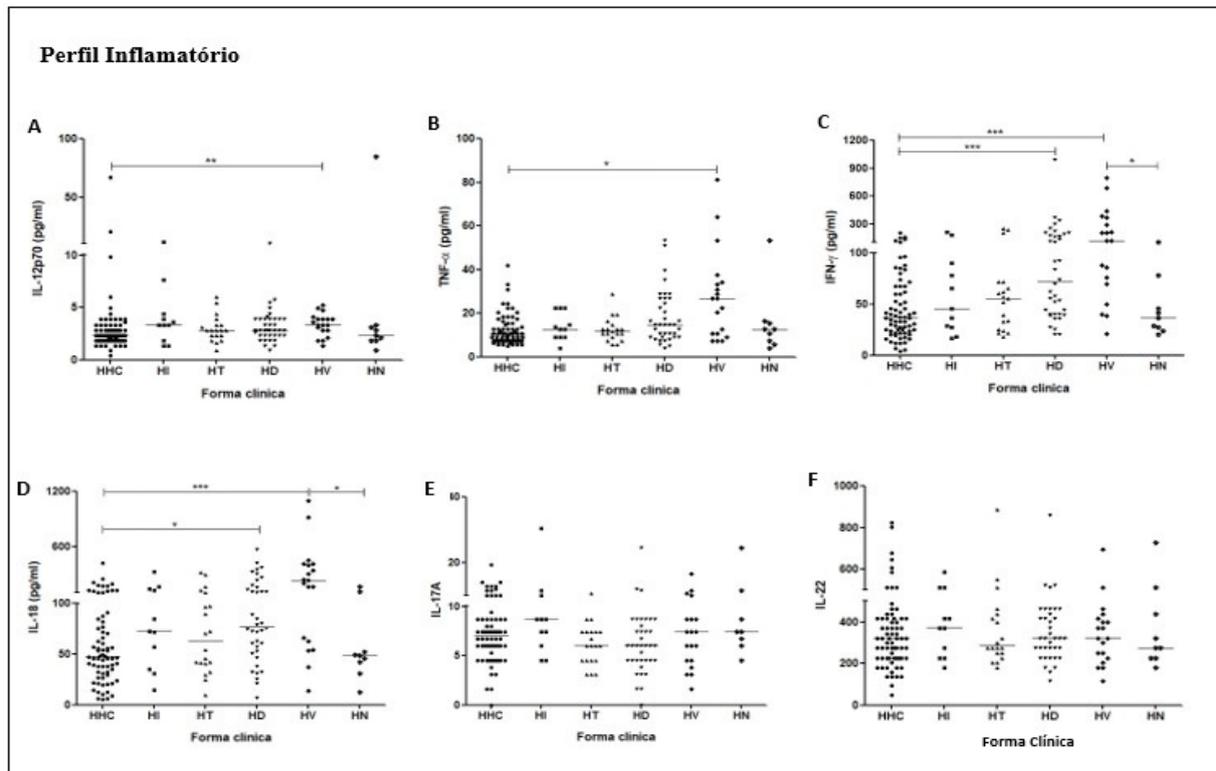
Em relação ao perfil anti-inflamatório, foram identificados níveis mais elevados das citocinas IL-4, IL-9, IL-10 e IL-27 (p -valor <0,05) nos pacientes MB RH+ quando comparado aos demais grupos. Em conjunto, esses resultados demonstram que pacientes MB RH+ exibem maior produção de diversas citocinas, principalmente uma resposta inflamatória sistêmica de citocinas do perfil Th1 (TNF- α ; IFN- γ e IL-18).

Figura 1. Níveis séricos de citocinas A) IL-12p70; B) TNF- α ; C) IFN- γ ; D) IL-18; E) IL-17A e F) IL-22; G) GM-CSF; H) IL-4; I) IL-6; J) IL-9; K) IL-10 e L) IL-27, nas formas operacionais de pacientes com hanseníase (PB e MB RH+ e MB RH-, com e sem reação hansênica, respectivamente) e em controles contactantes (CC).

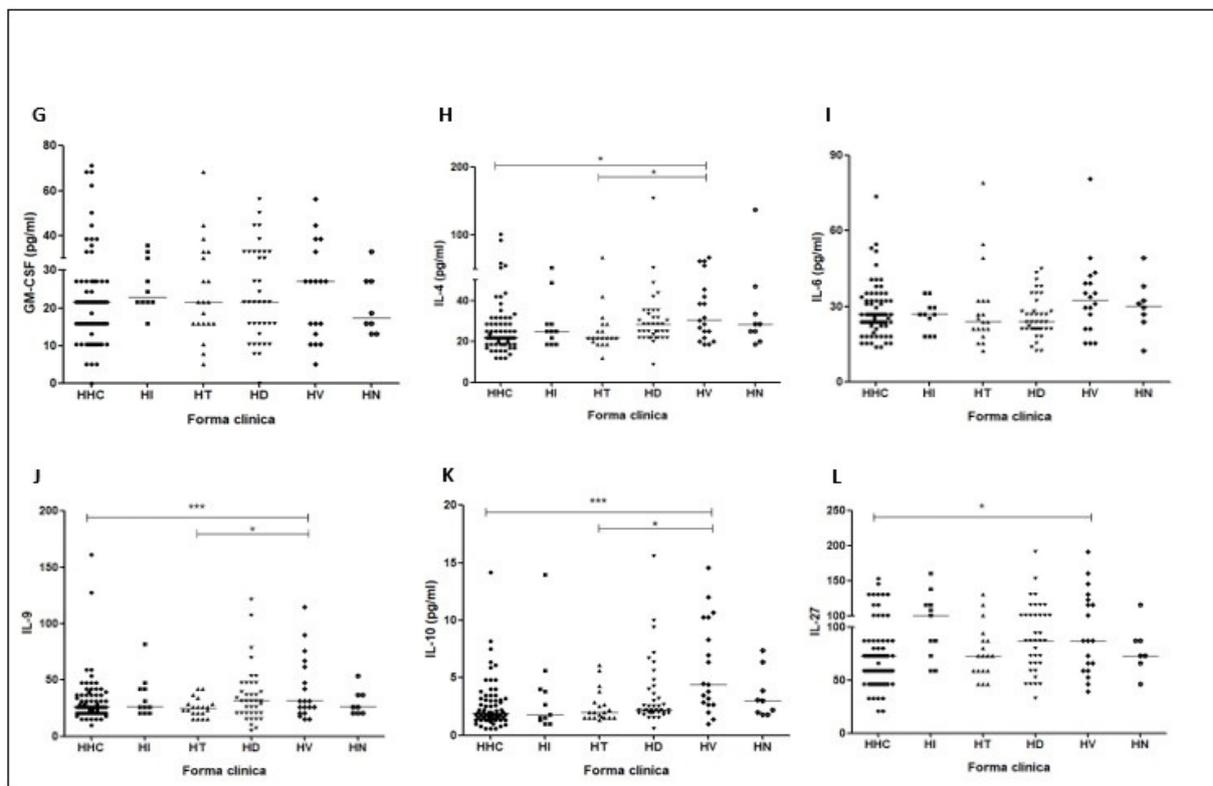




Dados similares foram observados quando os pacientes foram classificados segundo as formas clínicas da hanseníase (Material Suplementar 1A-L). Seguindo os padrões das formas operacionais, identificamos níveis mais elevados de citocinas inflamatórias do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-18) em pacientes com a forma HV, quando comparado com os controles contactantes ou com as outras formas clínicas da doença. Similarmente, observamos níveis elevados de citocinas do perfil anti-inflamatório (IL-4, IL-9, IL-10 e IL-27) na forma HV.

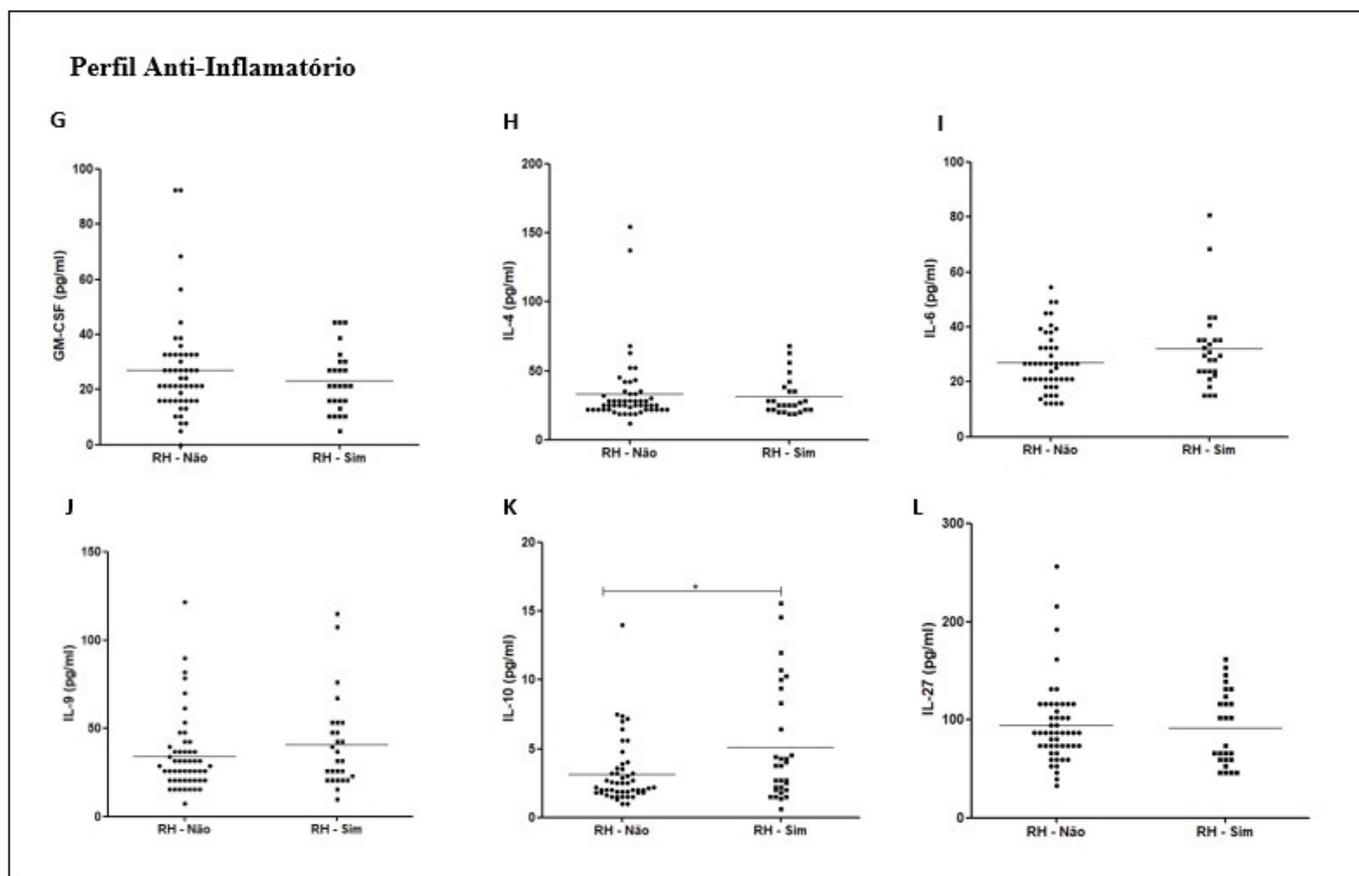
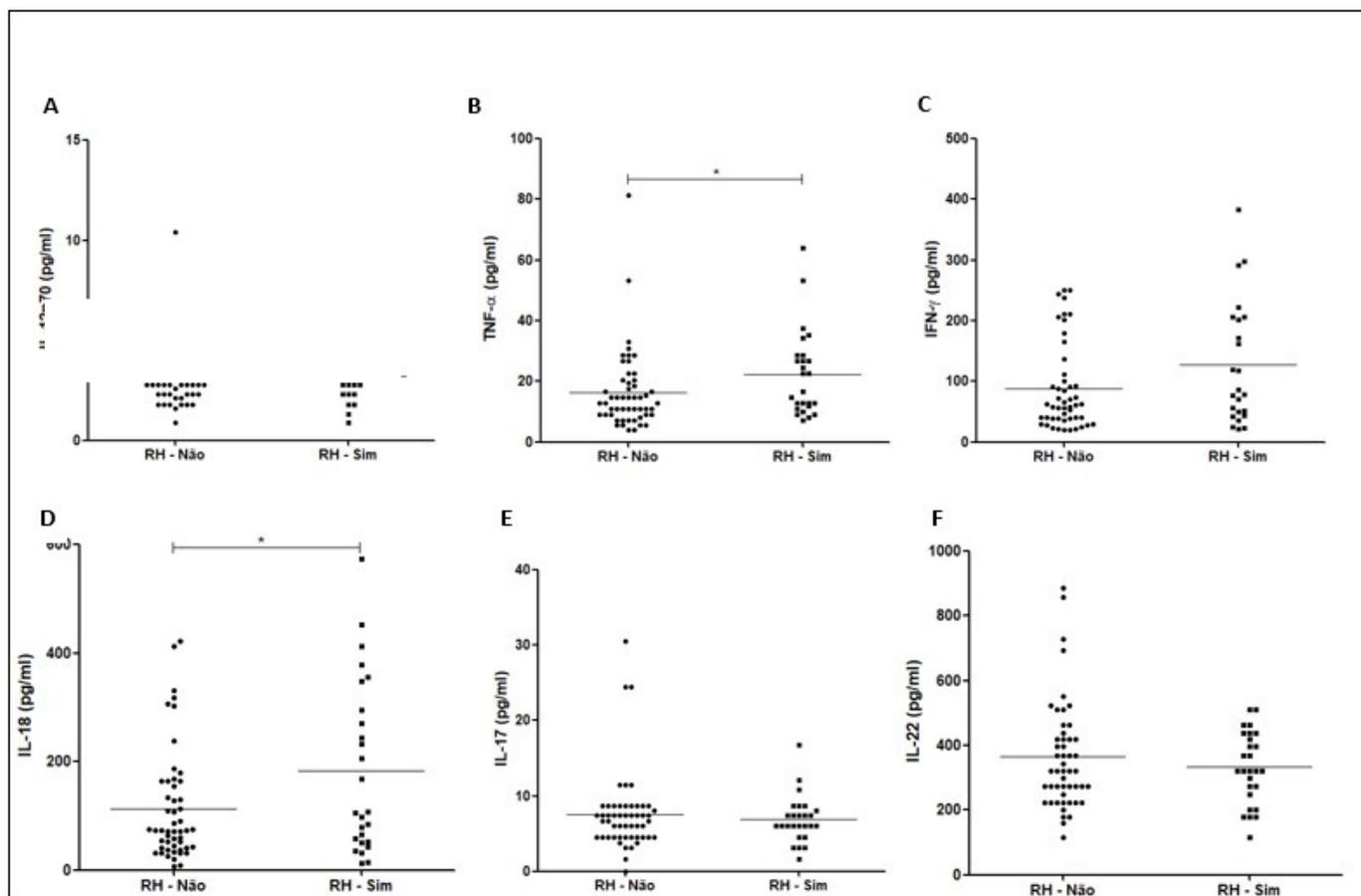


Material suplementar 1. Níveis séricos de citocinas A) IL-12p70; B) TNF- α ; C) IFN- γ ; D) IL-18; E) IL-17A e F) IL-22; G) GM-CSF; H) IL-4; I) IL-6; J) IL-9; K) IL-10 e L) IL-27, nas formas clínicas de pacientes com hanseníase (HI, HT, HD, HV e HN) e em controles contactantes (HHC).



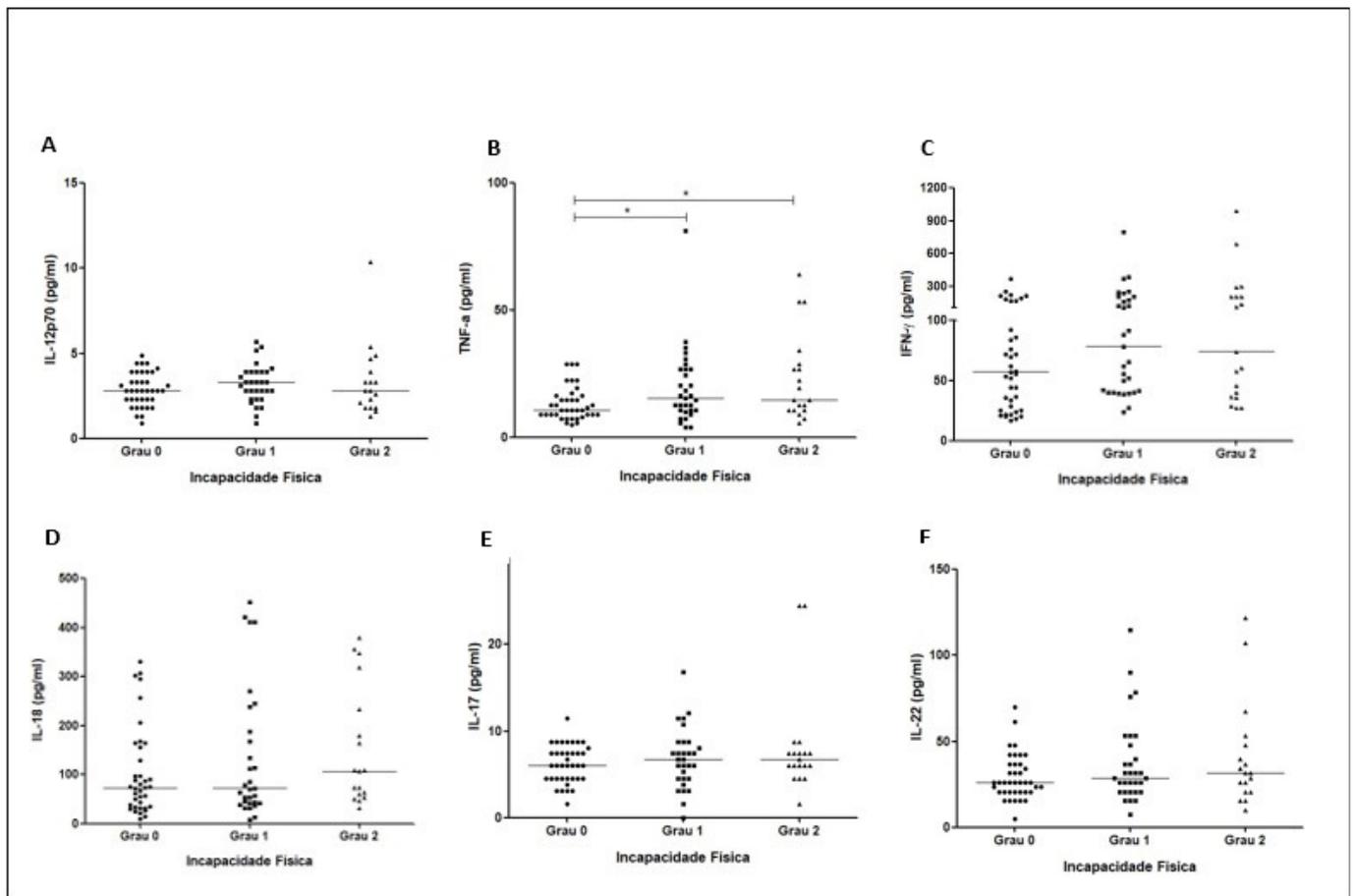
nos os níveis de citocinas de acordo com a ocorrência ou não de reação hansênica (Figura 2A-L). Em relação ao perfil inflamatório Th1, foram observadas maiores concentrações de TNF- α no soro dos pacientes com reação hansênica ($22,1 \pm 16,66$ pg/ml), quando comparado àqueles sem reação ($17,4 \pm 8,39$ pg/ml; p -valor $< 0,0001$; Fig. 2B). Similarmente, níveis mais elevados de IL-18 também foram identificados nos pacientes com reação ($158,0 \pm 144,3$ pg/ml) do que naqueles sem episódio reacional ($155,4 \pm 140,4$ pg/ml; p -valor = $0,0002$; Fig. 1D). Identificamos também níveis séricos mais elevados de INF- γ nos pacientes RH+, mas sem diferença estatística (Fig. 2C). Não foram observadas diferenças em relação aos níveis de IL-12p70, IL-17A e IL-22 (Fig. 1E e F). No perfil anti-inflamatório, só foram observadas diferenças significativas em relação aos níveis de IL-10 (RH+ vs. RH-; $4,6 \pm 3,85$ vs. $3,2 \pm 1,95$ pg/ml; p -valor $< 0,0001$; Fig. 1K).

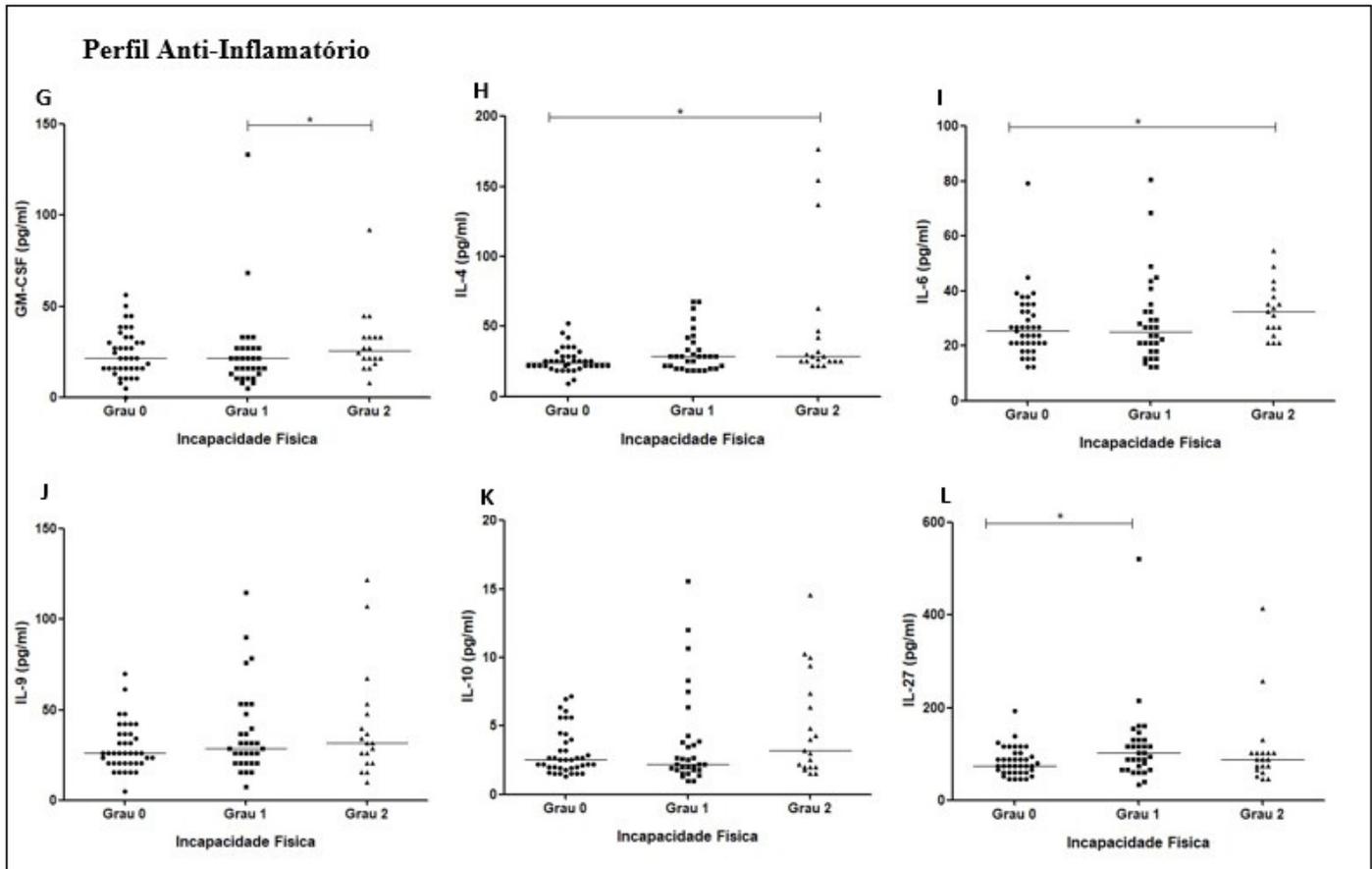
Figura 2. Níveis séricos de citocinas A) IL-12p70; B) TNF- α ; C) IFN- γ ; D) IL-18; E) IL-17A e F) IL-22; G) GM-CSF; H) IL-4; I) IL-6; J) IL-9; K) IL-10 e L) IL-27, de acordo com a ocorrência ou não de reação hansênica.



Verificamos também se os níveis séricos das citocinas poderiam estar associados com os graus de incapacidade física (0, 1 e 2) (Figura 3A-L). Referente às citocinas do perfil inflamatório Th1, foram observados níveis séricos mais elevados de TNF- α no soro dos pacientes com grau 1 e 2 ($19,5 \pm 14,87$ pg/ml e $23,0 \pm 17,13$ pg/ml, respectivamente), quando comparado com pacientes de grau 0 ($13,2 \pm 6,54$ pg/ml; p -valor = 0,01; Fig. 3B). Observamos também níveis séricos mais elevados de INF- γ nos pacientes com grau 1 e 2, em comparação com os de grau 0, mas sem diferença estatística (Fig. 3C). Por outro lado, observamos níveis mais elevados de GM-CSF ($29,7 \pm 18,33$ pg/ml; p -valor $<0,0001$; Fig. 3G), IL-4 ($50,3 \pm 18,56$ pg/ml; p -valor $<0,0001$; Fig. 3H) e IL-6 ($32,9 \pm 9,93$ pg/ml; p -valor $<0,0001$; Fig. 3I) em pacientes com o grau 2, em comparação com aqueles com grau 0 ou 1.

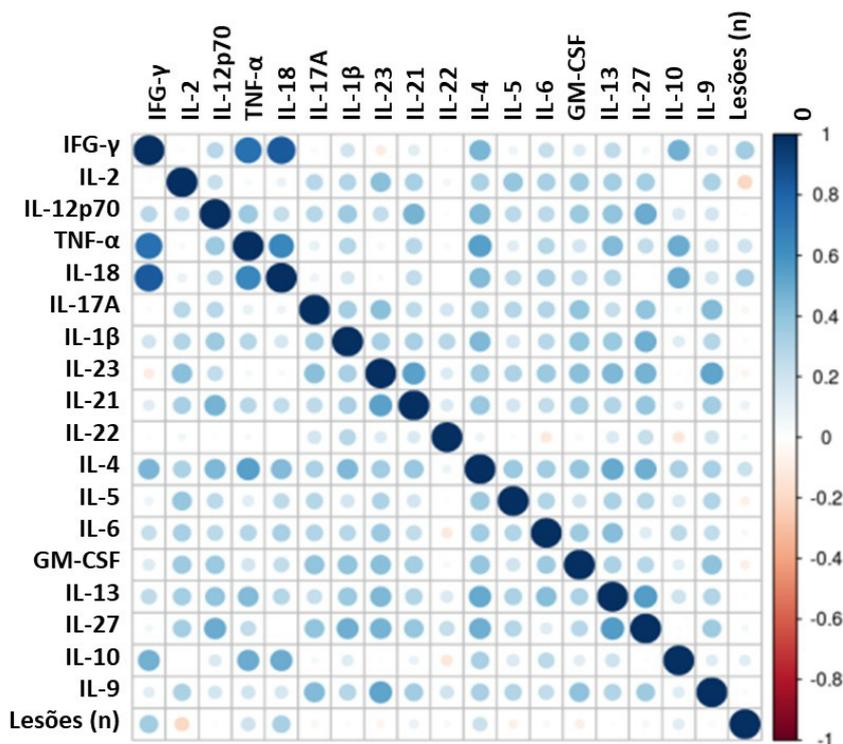
Figura 3. Níveis séricos de citocinas A) IL-12p70; B) TNF- α ; C) IFN- γ ; D) IL-18; E) IL-17A e F) IL-22; G) GM-CSF; H) IL-4; I) IL-6; J) IL-9; K) IL-10 e L) IL-27, de acordo com a ocorrência dos diferentes graus de incapacidade física





Uma vez que os níveis de citocinas do perfil Th1 estavam elevados nas formas MB e na ocorrência de RH e incapacidade física na hanseníase, decidimos analisar a associação dos níveis de citocinas entre si e com o número de lesões nos pacientes com hanseníase (Figura 4). Para tanto, realizamos a análise de correlação pelo teste de Spearman (R). Observamos correlação positiva e significativa entre as citocinas inflamatórias do perfil Th1: IL-18 e IFN- γ ($R = 0,84$; p -valor $<0,0001$); IL-18 e TNF- α ($R = 0,49$; p -valor $<0,0001$); e IFN- γ e TNF- α ($R = 0,61$; p -valor $<0,0001$). Observamos também correlação positiva entre o número de lesões (NL) nos pacientes com hanseníase e as citocinas IL-18 ($R = 0,33$; p -valor $=0,0008$), IFN- γ ($R = 0,35$; p -valor $=0,0004$), TNF- α ($R = 0,206$; p -valor $=0,03$) e correlação negativa entre NL e IL-2 ($R = -0,21$; p -valor $=0,03$).

Figura 4. Mapa de correlação entres as citocinas dosadas e o número de lesões nos pacientes com hanseníase. Círculos de cor azul representam correlação positiva. Círculos de cor avermelhada representam correlação negativa.



Análises de *Cluster* das Citocinas

Haja vista que foi identificada associação entre os níveis sistêmicos de citocinas e a apresentação clínica da hanseníase e a ocorrência de RH e incapacidade física, realizamos a análise de *cluster* com as dosagens séricas das citocinas para identificar a formação de agrupamento de citocinas com a ocorrência da doença e suas complicações clínicas. A legenda mostra a variação do desvio-padrão nas análises realizadas com base em uma escala de cores. Analisando o *heatmap* da Figura 5A é possível perceber o agrupamento das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-9, IL-6, IL-10 e IL-18 que são as citocinas que mais se distanciam da média para o valor de +4 (cores mais avermelhadas) e estão, portanto, conjuntamente associadas com a ocorrência da hanseníase e corroboram com as análises da Figura 1. Por outro lado, na Figura 5B (CC) podemos perceber a formação de conglomerados opostos ao dos pacientes. À direita do *heatmap* observamos o desvio padrão próximo à normalidade, com cores mais claras. Podemos inferir que citocinas que são expressas em maior quantidade em CC podem estar relacionadas a uma resposta imune eficaz contra *M. leprae*, a exemplo das citocinas IL-

2, IL-17A, IL-21, IL-1 β , IL-23 e IL-5. Foi realizado a análise de *cluster* para observar possíveis formações de conglomerados em pacientes que manifestaram os dois polos extremos da forma clínica na hanseníase (HT e HV) (Figura 5C). O que difere os polos entre os pacientes é a dispersão das citocinas IL-10, IL-18, IL-9, IL-23 e IL-5 em pacientes HV, para o valor +6. O que não ocorre no polo HT, onde as citocinas se distribuem entre o valor do desvio padrão para -2.

Posteriormente, observamos o comportamento de *Cluster* das citocinas na ocorrência de RH e incapacidade física. Foram observados conglomerados das citocinas IL-10, IL-18, IL-6 e IFN- γ no *heatmap* 1 referente aos pacientes com RH (Figura 6A). Na Figura 6B é apresentado o *heatmap* referente aos conglomerados de citocinas segundo o grau de incapacidade 0 e 1-2. Pode-se perceber que há o envolvimento de um cluster formado principalmente pelas citocinas IL-18, IL-10 e IFN- γ (com maior expressão de cores vermelhas e próxima ao valor de +6) associadas com a ocorrência de grau de incapacidade física 1 e 2.

Figura 5. *Heatmap* com a expressão das dosagens de citocinas nos A) pacientes com hanseníase, B) em controles contactantes e C) de acordo com as formas clínicas da hanseníase (Tuberculóide e Virchowiana).

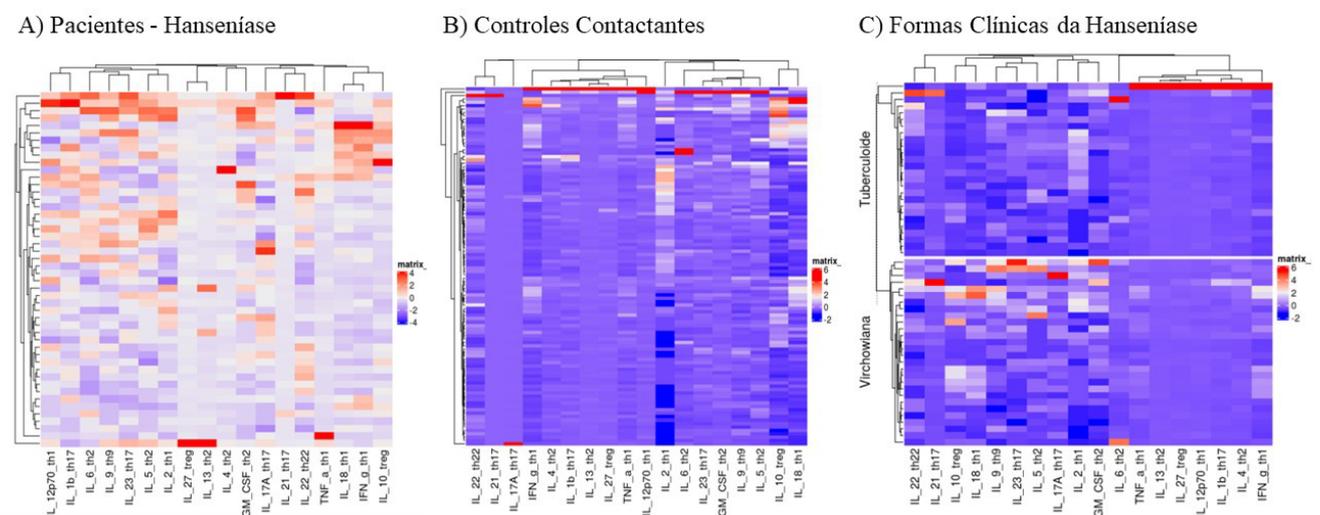
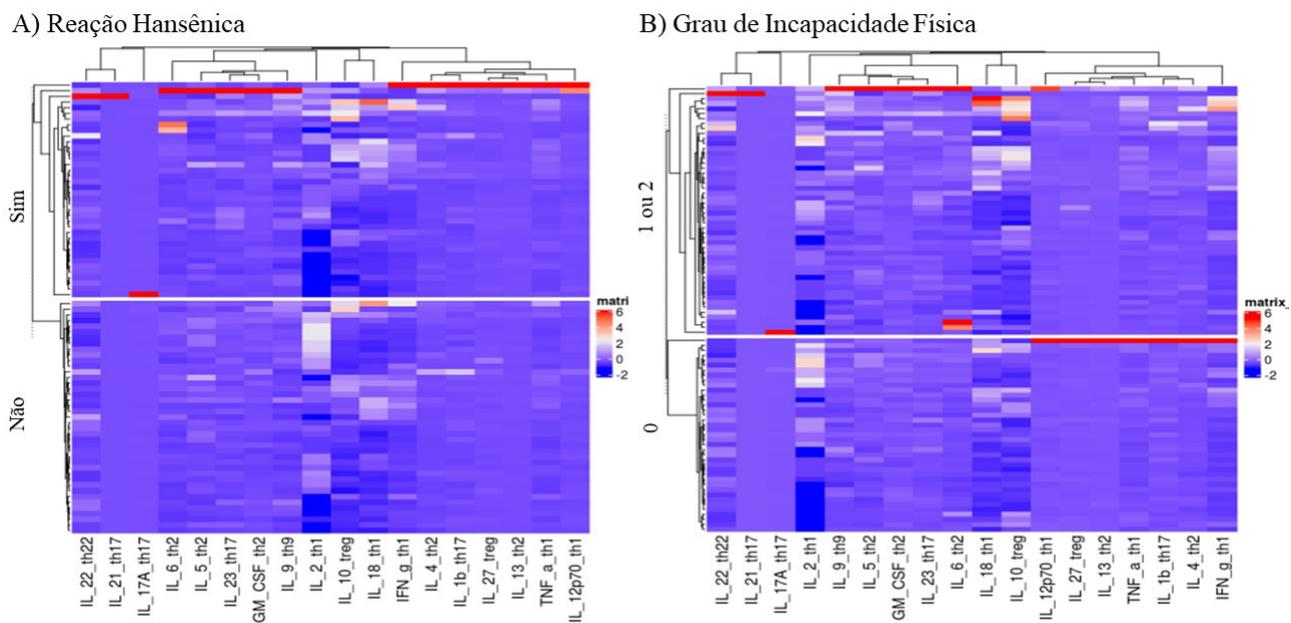


Figura 6. *Heatmap* com a expressão das dosagens de citocinas de acordo com A) ocorrência ou não de reação hansênica e B) grau de incapacidade física.



DISCUSSÃO

Há muito se discute na literatura científica o papel de citocinas na apresentação clínica da hanseníase. Diversos estudos reportam que citocinas do perfil Th1 (IFN- γ e TNF- α) estariam associadas com às formas clínicas PB da doença^(2,5,18,19). Contudo, neste estudo avaliamos uma amostra de 104 pacientes com hanseníase e 70 CC e demonstramos que níveis séricos elevados de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-18) estão envolvidas com a ocorrência das formas graves da hanseníase e suas principais complicações clínicas. Além disso, IFN- γ , TNF- α , IL-18 foram correlacionados com maior número de lesões em pacientes com hanseníase e as análises de *cluster* também corroboraram a maior expressão dessas citocinas no grupo dos pacientes com hanseníase e na forma HV.

Neste estudo, identificamos que níveis séricos elevados de IFN γ estão associados à forma clínica HV e com a ocorrência de reação hansênica e desenvolvimento de incapacidade física grau 2. O IFN- γ é considerada a citocina inflamatória mais importante do perfil Th1^(20,21). Ele é produzido principalmente por linfócitos da imunidade adquirida e tem como principal função iniciar a cascata de resposta pró-inflamatória e ativação de fagócitos como macrófagos^(21,22). Diversos estudos já demonstraram o papel protetor do IFN- γ , especialmente em infecção intracelular como na tuberculose⁽²³⁾ e na leishmaniose⁽²⁴⁻²⁶⁾. Contudo, outros autores contrapõem que níveis elevados de IFN- γ podem induzir resposta inflamatória exacerbada, com intensa ativação de linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) que causam lesão e dano tecidual, podendo ser prejudicial ao paciente. Essas hipóteses já foram demonstradas em estudos com leishmaniose⁽²⁶⁻²⁸⁾. Em pesquisa anterior realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado que níveis elevados de IFN- γ foram associados com a forma MB da hanseníase e que desenvolveram episódios reacionais⁽¹³⁾.

TNF é outra citocina do perfil Th1 que também se apresentou associada às formas MB e complicações clínicas da hanseníase neste estudo. Ele é produzida principalmente por macrófagos e linfócitos T e, durante infecções, é um dos mediadores mais precoces de resposta inflamatória exacerbada e um potente indutor do metabolismo muscular⁽²¹⁾. Estudos prévios demonstraram que na hanseníase o TNF- α aumenta a resposta inflamatória no local da lesão, atua no controle da replicação do bacilo e contribui para

a ocorrência de formas clínicas mais brandas da doença e menor número de lesões^(2,19). Entretanto, níveis elevados dessa citocina e a ativação de outros mediadores inflamatórios como a IL-1 β , NO e as MMPs potencializam o dano tecidual. Além disso, o aumento de sua concentração em sítios lesionados aumenta a infiltração de macrófagos e estimula a dor⁽¹⁹⁾.

Esse é o primeiro estudo a demonstrar a associação entre IL-18 sérica e a ocorrência de das formas MB e HV, além de estar relacionada com reação hansênica e a incapacidade física grau 1 e 2. Estudos anteriores avaliaram a expressão da IL-18 em biópsias de lesões e observaram maior expressão de IL-18 em amostras de pacientes TT^(29,30). A IL-18 é secretada por macrófagos e células dendríticas quando estimuladas⁽²¹⁾ e desempenha um papel importante na produção de IFN- γ a partir de células T e células NK⁽³⁰⁾. IL-18 participa também da formação de inflamassoma, como já foi demonstrado na hanseníase⁽³⁰⁾. Estudos prévios já demonstraram o potencial inflamatório e lesivo do IFN- γ , TNF- α e IL-18 em algumas doenças autoimunes em humanos⁽²¹⁾, como lúpus eritematoso sistêmico⁽³¹⁾, artrite reumatoide⁽³²⁾, doença de Crohn⁽³³⁾ e psoríase⁽³⁴⁾. Conjuntamente, pode-se inferir que IL-18 associada com IFN- γ são requeridas para controlar a proliferação do bacilo e dessa forma, a ocorrência de menor número de lesões. Entretanto, níveis elevados podem estar associados com respostas inflamatórias exacerbadas que levam a um pior prognóstico clínico, como ocorre nas RH e lesões neurológicas das incapacidades físicas⁽³⁵⁾.

Outras citocinas pertencentes ao perfil de células inflamatórias (IL-17 e IL-22), contudo, não foram associadas com as formas MB ou complicações clínicas da hanseníase. Em estudo anterior, foi demonstrado que o perfil de citocinas Th17 (IL-17 e IL-1 β) foram associadas com as formas PB da hanseníase. Porém, não houve associação com a ocorrência de episódios reacionais⁽¹³⁾. Nossos dados corroboram com estudo anterior e demonstram que IL-17 e IL-22 séricas não estão associadas com a ocorrência de RH.

Dados do nosso estudo demonstram também que citocinas do perfil anti-inflamatório estão envolvidas com a forma HV e RH. Níveis elevados de IL-4 (perfil Th2), IL-9 (perfil Th9), IL-10 e IL-27 (perfil Treg) foram identificados em pacientes MB e com

RH e corroboram a associação de citocinas do perfil anti-inflamatório com a apresentação clínica mais grave e incapacitante da hanseníase^(1,2,13,36-38).

Além disso, podemos inferir conjuntamente que os pacientes com as formas MB e nos que ocorrem episódios reacionais e incapacidade física apresentam níveis sistêmicos elevados de diversas citocinas dos perfis Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-18), Th2 (IL-4 e IL-6), Th9 (IL-9) e Treg (IL-10 e IL-27), produzindo um efeito sistêmico denominado de tempestade de citocinas. Isso leva à ocorrência de reposta inflamatória exacerbada, com maior número de lesões teciduais e dano neural, manifestações comuns nos episódios reacionais e incapacidades físicas da hanseníase. Similarmente, o efeito clínico severo da tempestade de citocinas já foi demonstrado em outras infecções por patógenos intracelulares, como na Leishmaniose Visceral⁽²⁵⁾ e mais recentemente nos casos graves de SARS-CoV-2^(39,40).

Os dados do nosso estudo corroboram a pesquisa de Kahawita e Lockwood que demonstrou que a imunidade celular está presente no surgimento do ENH, principalmente citocinas como TNF- α e IL-6⁽¹¹⁾. Na ausência de intervenção precoce, o paciente pode evoluir com sequelas graves que são responsáveis pelo forte estigma social e comprometimento significativo da qualidade de vida⁽⁴¹⁾.

Desta forma, concluímos que, embora citocinas do perfil Th1 sejam consideradas importantes para o controle do bacilo na infecção por *M. leprae*, níveis séricos elevados estão envolvidos com a forma clínica HV e complicações da hanseníase. Além disso, nossos dados reportam que, conjuntamente, diversas citocinas dos perfis Th1-Th2-Th9-Treg estão envolvidas na ocorrência das complicações clínicas mais graves da hanseníase (RH e lesão neurológicas com incapacidade física), corroborando o efeito de tempestade de citocinas na severidade da doença. Com isso, essas citocinas podem funcionar como biomarcadores para o monitoramento da evolução clínica da doença. Ademais, mostramos que as citocinas formam conglomerados distintos quando analisamos as complicações clínicas da hanseníase, mostrando quais *clusters* de citocinas estão envolvidos com reação hansênica e incapacidades física, análise até então inédita no tocante a imunopatogenia da hanseníase.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), Edital MS/CNPq/FAPITEC/SE/SES – Nº 06/2018 (ARJ). ARJ e RPA são pesquisadores do CNPq. Gostaríamos de agradecer também aos residentes e dermatologistas da Clínica de Dermatologia-HU/UFS. Atestamos que os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise dos dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os pesquisadores afirmam não haver conflito de interesse na elaboração desse artigo.

REFERÊNCIAS

1. Fonseca AB de L, Simon M do V, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2017;6(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-016-0229-3>
2. Simon M, Scherlock J, Duthie MS, Ribeiro De Jesus A. Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy. *Drug Dev Res*. 2011;72(6):509–27.
3. Ridley DS, Jopling W. Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. *Nature* [Internet]. 1996;33(3):1215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348338>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765279>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X14002296>
<http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1502-9>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/>
4. Andrade PJS de. A GRAVIDADE DOS EPISÓDIOS DE REAÇÃO REVERSA EM PACIENTES COINFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA

- HUMANA E PELA MYCOBACTERIUM LEPRAE. Fundação Oswaldo Cruz; 2013.
5. Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, Amorim FM, Costa MR, Keesen TSL, et al. Transcriptional Changes That Characterize the Immune Reactions of Leprosy. *IMMUNE React Lepr.* 2015;211.
 6. Khadge S, Banu S, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Goulart IM, Thapa P, et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis [Internet].* 2015;15(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1128-0>
 7. Antonio JR, Soubhia RMC, Paschoa VD, Oliveira GB de, Rossi NCP, Maciel MG, et al. Avaliação epidemiológica dos estados reacionais e incapacidades físicas em pacientes com hanseníase na cidade de São José do Rio Preto TT - Epidemiological study of reactions and physical disabilities in leprosy. *Arq ciênc saúde [Internet].* 2011;18(1):9–14. Available from: [http://repositorio-racs.famerp.br/racs_ol/vol-18-1/IDS 8 - jan-mar 2011.pdf](http://repositorio-racs.famerp.br/racs_ol/vol-18-1/IDS%208%20-%20jan-mar%202011.pdf)
 8. BRASIL. Boletim Epidemiológico. Bol epidemiológico. 2020;
 9. Santos MB, Dantas A, Barreto AS, Souza R, Aurélio M, Goes DO, et al. Clinical and epidemiological indicators and spatial analysis of leprosy cases in patients under 15 years old in an endemic area of Northeast Brazil : an ecological and time series study. *BMJ Open.* 2019;
 10. Bezerra-Santos M, do Vale-Simon M, Barreto AS, Cazzaniga RA, de Oliveira DT, Barrios MR, et al. Mycobacterium leprae Recombinant Antigen Induces High Expression of Multifunction T Lymphocytes and Is Promising as a Specific Vaccine for Leprosy. *Front Immunol.* 2018;9(December):2920.
 11. Kahawita IP, Lockwood DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(4):329–37.
 12. Borges DPL, Reis ACS de M, D'Ávila VG de FC, Barbosa MS, Ternes YMF, Santiago SB, et al. SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde 108. SAÚDE CIÊNCIA EM AÇÃO – Rev Acadêmica do Inst Ciências da Saúde. 2016;3:108–17.

13. Santos MB, de Oliveira DT, Cazzaniga RA, Varjão CS, dos Santos PL, Santos MLB, et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. *Scand J Immunol.* 2017;86(1):40–9.
14. Bem JS de, Giacomini NMR, Waismann M. Utilização da técnica da análise de clusters ao emprego da indústria criativa entre 2000 e 2010 : estudo da Região do Consinos , RS Using clusters analysis techniques in benefit of the creative industry between 2000 and 2010 , Consinos region ' s study. *Interações.* 2015;16:27–41.
15. James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R. *Introduction to Statistics Using R.* 8ª. Vol. 11, *An Introduction to Statistical Learning with applications in R.* Springer; 2013. 1–235 p.
16. Bem JS de, Giacomini NMR, Waismann M. Utilização da técnica da análise de clusters ao emprego da indústria criativa entre 2000 e 2010: estudo da Região do Consinos, RS. *Interações (Campo Gd.* 2015;16(1):27–41.
17. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. *The Elements of Statistical Learning.* 2ª. Springer Series in Statistics. 2008. 649–654 p.
18. Duthie MS, Saunderson P, Reed SG. The potential for vaccination in leprosy elimination: New tools for targeted interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(SUPPL.1):190–6.
19. de Sousa JR, Sotto MN, Quaresma JAS. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):18–21.
20. Lima HR. *Análise do envolvimento de células T reguladoras na hanseníase.* 2012.
21. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):701–21.
22. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. FoxP3 provides

- competitive fitness to CD4+CD25+T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur J Immunol*. 2014;44(2):431–9.
23. Oliveira RM, Hungria EM, De Araújo Freitas A, De Sousa ALOM, Costa MB, Reed SG, et al. Synergistic antigen combinations for the development of interferon gamma release assays for paucibacillary leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(8):1415–24.
 24. Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon ?? to promote protection against leishmania infantum infection. *J Infect Dis*. 2015;211(6):1015–26.
 25. Santos PL, Oliveira FA De, Santos MLB, Celina L, Reed G, Almeida RP De. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6 , IL-27 and sCD14. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:1–16.
 26. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):581–92.
 27. Singh OP, Stober CB, Singh AK, Blackwell JM, Sundar S. Cytokine Responses to Novel Antigens in an Indian Population Living in an Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10).
 28. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7).
 29. Silva LM, Sousa JR De, Oliveira FR. The inflammasome in leprosy skin lesions : an immunohistochemical evaluation. 2018;2231–40.
 30. García VE, Uyemura K, Sieling PA, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, et al. IL-18 Promotes Type 1 Cytokine Production from NK Cells and T Cells in Human Intracellular Infection. 2020;
 31. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 2013;4(OCT):1–10.
 32. Banda NK, Vondracek A, Kraus D, Dinarello CA, Kim S-H, Bendele A, et al. Mechanisms of Inhibition of Collagen-Induced Arthritis by Murine IL-18 Binding Protein. *J Immunol*. 2003;170(4):2100–5.

33. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is upregulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *Gastroenterology*. 1999;114:A1062.
34. Rasmy H, Mikhael N, Ismail S. Clinical research interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with psoriasis. *Clin Res*. 2011;7(4):713–9.
35. Yadav AR, Mohanty KK, Natrajan M, Sengupta U. Elevated Level of Plasma Interleukin-18 (IL-18) in Leprosy Patients with Reversal (T1R) and Enl (T2R) Reactions. *Arch Immunol Allergy*. 2019;2(1):8–18.
36. Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath R, Ito L, et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(2):298–303.
37. Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DNJ. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. *Front Immunol*. 2017;8(MAR).
38. Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):1–21.
39. Rojas M, Rodriguez Y, Monsalve DM, Camacho B, Gallo JE, Rojas-villarraga A, et al. Convalescent plasma in Covid-19: Possible mechanisms of action. *Autoimmun Rev*. 2020;102554.
40. Ruscitti P, Berardicurti O, Iagnocco A, Giacomelli R. Cytokine storm syndrome in severe COVID-19. *Autoimmun Rev*. 2020;(102562).
41. Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution ? 2007;78.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Níveis séricos elevados de citocinas inflamatórias do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-18) estão envolvidos com as formas MB e complicações da hanseníase;
- ✓ Citocinas dos perfis Th1-Th2-Th9-Treg estão envolvidas na ocorrência das complicações clínicas mais severas da hanseníase (RH e lesão neurológicas com incapacidade física), corroborando o efeito de tempestade de citocinas na severidade da doença;
- ✓ Observamos correlação positiva e significativa entre as citocinas inflamatórias do perfil Th1 (IL-18 e IFN- γ TNF- α);
- ✓ Observados também correlação positiva entre o número de lesões (NL) nos pacientes com hanseníase e as citocinas IL-18, INF- γ e TNF- α . Porém houve correlação negativa entre NL e IL-2;
- ✓ Citocinas formam conglomerados distintos quando analisamos as complicações clínicas da hanseníase, mostrando *clusters* de citocinas envolvidos com reação hansênica e incapacidades física, análise até então inédita no tocante a imunopatogenia da hanseníase;
- ✓ As dosagens dessas citocinas podem funcionar como biomarcadores para o monitoramento da evolução clínica da doença.

REFERÊNCIAS

- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., & Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(3), 701–721. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Andrade, P. J. S. de. (2013). *A GRAVIDADE DOS EPISÓDIOS DE REAÇÃO REVERSA EM PACIENTES COINFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E PELA MYCOBACTERIUM LEPRAE*. Fundação Oswaldo Cruz.
- Antonio, J. R., Soubhia, R. M. C., Paschoa, V. D., Oliveira, G. B. de, Rossi, N. C. P., Maciel, M. G., & Nardi, S. M. T. (2011). Avaliação epidemiológica dos estados reacionais e incapacidades físicas em pacientes com hanseníase na cidade de São José do Rio Preto TT - Epidemiological study of reactions and physical disabilities in leprosy. *Arq. Ciênc. Saúde*, *18*(1), 9–14. http://repositorio-racs.famerp.br/racs_ol/vol-18-1/IDS 8 - jan-mar 2011.pdf
- Azevedo, M. de C. S., Marques, H., Binelli, L. S., Malange, M. S. V., Devides, A. C., Silva, E. A., Fachin, L. R. V., Ghidella, C. C., Soares, C. T., Garlet, G. P., Rosa, P. S., Belone, A. de F. F., & Trombone, A. P. F. (2017). Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. *Medical Microbiology and Immunology*, *206*(6), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0519-9>
- Banda, N. K., Vondracek, A., Kraus, D., Dinarello, C. A., Kim, S.-H., Bendele, A., Senaldi, G., & Arend, W. P. (2003). Mechanisms of Inhibition of Collagen-Induced Arthritis by Murine IL-18 Binding Protein. *The Journal of Immunology*, *170*(4), 2100–2105. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2100>
- Bem, J. S. de, Giacomini, N. M. R., & Waismann, M. (2015a). Utilizaçãoda técnica da análise de clusters ao emprego da indústria

- criativa entre 2000 e 2010: estudo da Região do Consinos, RS. *Interações (Campo Grande)*, 16(1), 27–41. <https://doi.org/10.1590/151870122015102>
- Bem, J. S. de, Giacomini, N. M. R., & Waismann, M. (2015b). Utilização da técnica da análise de clusters ao emprego da indústria criativa entre 2000 e 2010 : estudo da Região do Consinos , RS Using clusters analysis techniques in benefit of the creative industry between 2000 and 2010 , Consinos region ' s study. *Interações*, 16, 27–41.
- Bezerra-Santos, M., do Vale-Simon, M., Barreto, A. S., Cazzaniga, R. A., de Oliveira, D. T., Barrios, M. R., Ferreira, A. R., Santos-Bio, N. C., Reed, S. G., de Almeida, R. P., Corrêa, C. B., Duthie, M. S., & de Jesus, A. R. (2018). Mycobacterium leprae Recombinant Antigen Induces High Expression of Multifunction T Lymphocytes and Is Promising as a Specific Vaccine for Leprosy. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 2920. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02920>
- Borges, D. P. L., Reis, A. C. S. de M., D'Ávila, V. G. de F. C., Barbosa, M. S., Ternes, Y. M. F., Santiago, S. B., & Santos, R. da S. (2016). SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde 108. *SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica Do Instituto de Ciências Da Saúde*, 3, 108–117.
- Brasil. (2017). Guia prático sobre a hanseníase. In *Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis*. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hansenise.%0Apdf
- BRASIL. (2020). Boletim Epidemiológico. *Boletim Epidemiológico*.
- Brito, A. L., Monteiro, L. D., Ramos Junior, A. N., Heukelbach, J., & Alencar, C. H. (2016). Tendência temporal da hanseníase em uma capital do Nordeste do Brasil: epidemiologia e análise por pontos de inflexão, 2001 a 2012. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 19(1), 194–204. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201600010017>
- Burgler, S., Ouaked, N., Bassin, C., Basinski, T. M., Mantel, P.-Y., Siegmund, K., Meyer, N., Akdis, C. A., & Schmidt-Weber, C. B. (2008). Differentiation and functional analysis of human TH17 cells. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 123(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-26>
- de Sousa, J. R., Sotto, M. N., & Quaresma, J. A. S. (2017). Leprosy as a complex

- infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 18–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01635>
- Dinarello, C. A., Novick, D., Kim, S., & Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in Immunology*, 4(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00289>
- Dupnik, K. M., Bair, T. B., Maia, A. O., Amorim, F. M., Costa, M. R., Keesen, T. S. L., Valverde, J. G., Queiroz, C. A. P., Medeiros, L. L., Lucena, N. L. De, Wilson, M. E., Nobre, M. L., Jr, W. D. J., & Jeronimo, S. M. B. (2015). Transcriptional Changes That Characterize the Immune Reactions of Leprosy. *IMMUNE REACTIONS OF LEPROSY*, 211. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu612>
- Duthie, M. S., Gillis, T. P., & Reed, S. G. (2011). Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine. *Human Vaccines*, 7(11), 1172–1183. <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.16848>
- Duthie, M. S., Saunderson, P., & Reed, S. G. (2012). The potential for vaccination in leprosy elimination: New tools for targeted interventions. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(SUPPL.1), 190–196. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900027>
- Faleiro, R. J., Kumar, R., Hafner, L. M., & Engwerda, C. R. (2014). Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002914>
- Fonseca, A. B. de L., Simon, M. do V., Cazzaniga, R. A., de Moura, T. R., de Almeida, R. P., Duthie, M. S., Reed, S. G., & de Jesus, A. R. (2017). The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0229-3>
- FREITAS, A. de A. (2015). *Resposta imune celular e humoral a proteínas recombinantes do Mycobacterium leprae em pacientes com hanseníase após a multidrogaterapia e em pacientes com outras dermatoses*. Universidade Federal de Goiás.
- Freitas, L. R. S., Duarte, E. C., & Garcia, L. P. (2016). Trends of main indicators of

- leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001-2012. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1798-2>
- Freitas, L. R. S., Duarte, E. C., Garcia, L. P., Yadav, N., Kar, S., Madke, B., Dashatwar, D., Singh, N., Prasad, K., Barreto, M., Teixeira, M., Bastos, F., Ximenes, R., Barata, R., Rodrigues, L., Alencar, C., Ramos, A., Barbosa, J., Kerr, L., ... Madichie, N. (2016). Trends of main indicators of leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001–2012. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 472. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1798-2>
- García, V. E., Uyemura, K., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Morita, C. T., Okamura, H., Rea, T. H., & Modlin, R. L. (2020). *IL-18 Promotes Type 1 Cytokine Production from NK Cells and T Cells in Human Intracellular Infection*.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J. (2008). The Elements of Statistical Learning. In *Springer Series in Statistics* (2^a). <https://doi.org/10.1109/SITIS.2013.106>
- James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2013). Introduction to Statistics Using R. In *An Introduction to Statistical Learning with applications in R* (8^a, Vol. 11, Issue 4). Springer. <https://doi.org/10.2200/S00899ED1V01Y201902MAS024>
- Kahawita, I. P., & Lockwood, D. N. J. (2008). Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(4), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.004>
- Khadge, S., Banu, S., Bobosha, K., van der Ploeg-van Schip, J. J., Goulart, I. M., Thapa, P., Kunwar, C. B., van Meijgaarden, K. E., van den Eeden, S. J. F., Wilson, L., Kabir, S., Dey, H., Goulart, L. R., Lobato, J., Carvalho, W., Bekele, Y., Franken, K. L. M. C., Aseffa, A., Spencer, J. S., ... Geluk, A. (2015). Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1128-0>
- Kumar, S., Naqvi, R. A., Ali, R., Rani, R., Khanna, N., & Rao, D. N. (2014). FoxP3 provides competitive fitness to CD4+CD25+T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *European Journal of Immunology*, 44(2), 431–439. <https://doi.org/10.1002/eji.201343649>
- Lima, H. R. (2012). *Análise do envolvimento de células T reguladoras na hanseníase*.

- Lockwood, D. N. J., Sarno, E., & Smith, W. C. (2007). *Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution ?* 78.
- Nascimento, M. S. L., Carregaro, V., Lima-Júnior, D. S., Costa, D. L., Ryffel, B., Duthie, M. S., De Jesus, A., De Almeida, R. P., & Da Silva, J. S. (2015). Interleukin 17A acts synergistically with interferon ?? to promote protection against leishmania infantum infection. *Journal of Infectious Diseases*, 211(6), 1015–1026. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu531>
- Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol*, 61, 260–265.
- Oliveira, D. T. De, Bezerra, M. M., Antônio, J., Almeida, P. De, Duthie, M., Reed, S., & Jesus, A. R. De. (2012). *Neurological disability in leprosy : incidence and gender association in Sergipe , Brazil*. 6(3), 125–129.
- Oliveira, R. M., Hungria, E. M., De Araújo Freitas, A., De Sousa, A. L. O. M., Costa, M. B., Reed, S. G., Duthie, M. S., & Stefani, M. M. A. (2014). Synergistic antigen combinations for the development of interferon gamma release assays for paucibacillary leprosy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(8), 1415–1424. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2077-z>
- Pizarro, T. T., Michie, M. H., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M. F., Foley, E., Moskaluk, C. A., Bickston, S. J., & Cominelli, F. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is upregulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *Gastroenterology*, 114, A1062. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)84319-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)84319-9)
- Polycarpou, A., Walker, S. L., & Lockwood, D. N. J. (2017). A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00233>
- Rasmy, H., Mikhael, N., & Ismail, S. (2011). Clinical research interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with psoriasis. *Clinical Research*, 7(4), 713–719. <https://doi.org/10.5114/aoms.2011.24144>
- Ridley, D. S., & Jopling, W. . (1996). Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. *Nature*, 33(3), 1215. <https://doi.org/10.1126/science.1238286>

- Rojas, M., Rodriguez, Y., Monsalve, D. M., Camacho, B., Gallo, J. E., Rojas-villarraga, A., Ramírez-santana, C., Juan, C., Manrique, R., & Mantilla, R. D. (2020). Convalescent plasma in Covid-19: Possible mechanisms of action. *Autoimmunity Reviews*, 102554. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102554>
- Ruscitti, P., Berardicurti, O., Iagnocco, A., & Giacomelli, R. (2020). Cytokine storm syndrome in severe COVID-19. *Autoimmunity Reviews*, 102562. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102562>
- Sadhu, S., Khaitan, B. K., Joshi, B., Sengupta, U., Nautiyal, A. K., & Mitra, D. K. (2016). Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004338>
- Saini, C., Ramesh, V., & Nath, I. (2013). CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002338>
- Saini, C., Siddiqui, A., Ramesh, V., & Nath, I. (2016). Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004592>
- Santos, M. B., de Oliveira, D. T., Cazzaniga, R. A., Varjão, C. S., dos Santos, P. L., Santos, M. L. B., Correia, C. B., Faria, D. R., Simon, M. do V., Silva, J. S., Dutra, W. O., Reed, S. G., Duthie, M. S., de Almeida, R. P., & de Jesus, A. R. (2017). Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. *Scandinavian Journal of Immunology*, 86(1), 40–49. <https://doi.org/10.1111/sji.12558>
- Santos, M. L. B., Nico, D., de Oliveira, F. A., Barreto, A. S., Palatnik-de-Sousa, I., Carrillo, E., Moreno, J., de Luca, P. M., Morrot, A., Rosa, D. S., Palatnik, M., Bani-Corrêa, C., de Almeida, R. P., & Palatnik-de-Sousa, C. B. (2017). Leishmania donovani nucleoside Hydrolase (NH36) domains induce T-cell cytokine responses in human visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00227>

- Santos, Márcio Bezerra, Dantas, A., Barreto, A. S., Souza, R., Aurélio, M., Goes, D. O., Antônio, J., Alves, B., Daniel, I., Barreto, C., Silva, J. S., Oliveira, D. T. De, Araújo, K. C. G. M. De, Duthie, M. S., & Jesus, A. R. De. (2019). Clinical and epidemiological indicators and spatial analysis of leprosy cases in patients under 15 years old in an endemic area of Northeast Brazil : an ecological and time series study. *BMJ Open*. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023420>
- Santos, P. L., Oliveira, F. A. De, Santos, M. L. B., Celina, L., Reed, G., & Almeida, R. P. De. (2016). The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6 , IL-27 and sCD14. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004375>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Silva, L. M., Sousa, J. R. De, & Oliveira, F. R. (2018). *The inflammasome in leprosy skin lesions : an immunohistochemical evaluation*. 2231–2240.
- Simon, M., Scherlock, J., Duthie, M. S., & Ribeiro De Jesus, A. (2011). Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy. *Drug Development Research*, *72*(6), 509–527. <https://doi.org/10.1002/ddr.20457>
- Singh, O. P., Stober, C. B., Singh, A. K., Blackwell, J. M., & Sundar, S. (2012). Cytokine Responses to Novel Antigens in an Indian Population Living in an Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001874>
- VITAL, R. T., ILLARRAMENDI, X., ANTUNES, S. L. G., NASCIMENTO, M., NERY, J. A. D. C., NASCIMENTO, O., SARNO, E. N., & JARDIM, M. R. (2013). ISOLATED MEDIAN NEUROPATHY AS THE FIRST SYMPTOM OF LEPROSY. *MUSCLE & NERVE*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/mus.23731>
- Yadav, A. R., Mohanty, K. K., Natrajan, M., & Sengupta, U. (2019). Elevated Level of Plasma Interleukin-18 (IL-18) in Leprosy Patients with Reversal (T1R) and Enl (T2R) Reactions. *Archives of Immunology and Allergy*, *2*(1), 8–18.

ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Cover Letters

Cover letters are not mandatory, but authors are recommended to write a cover letter in which they make a case for why their paper should be considered for the Scandinavian Journal of Immunology.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

i. Title page:

- a. A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips);
- b. A short running title of less than 50 characters (including spaces);
- c. The full names of the authors;
- d. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- e. Corresponding author's full name, address and e-mail address; the name(s) of one or two corresponding author(s) can be provided;
- f. List of abbreviations;
- g. Word count;
- h. For Regular Articles, an appropriate scientific heading from among the following: Experimental Immunology, Human Immunology, Immunological Methods.

ii. Abstract and keywords;

iii. Acknowledgments;

- a. Funding information;
- b. Conflict of interest statement;

iv. Main text;

v. Author Contributions;

vi. References;

vii. Tables (each table complete with title and footnotes);

viii. Figure legends.

Abstract

Abstracts and keywords are required for some manuscript types. For details on manuscript types that require abstracts and/or keywords, as well as how to prepare them, please refer to the 'Manuscript Types and Criteria' section.

Keywords

Please provide three keywords.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Main Text

Materials and Methods. This section should be divided by subheadings and contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. In particular, it should contain:

The name of producer and catalogue number for all purchased reagents and consumables.

The gating strategies used for flow cytometry experiments.

The original source for purchased or shared animals used to generate a colony, including the commercial vendor nomenclature that specifies the strain.

The source of experimental and control animals, including whether they are littermates and/or co-housed.

The number and gender of animals analysed per experiment.

Clone names for monoclonal antibodies.

An ethics approval statement for experiments reporting results on animal or human subject research.

The journal uses British/US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.

Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter (but sparingly).

Author Contributions

All authors must indicate their specific contributions to the work described in the manuscript. Examples of contributions: performed experiments, collected the data, contributed data or analysis tools, provided key/unique reagents, analyzed the data, interpreted the data, conceived and designed the study, supervised the study, wrote the paper, approved the final version of the manuscript.

Please refer to the journal's Authorship Policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in superscript. References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustration.

Published abstracts can be used as references. Manuscripts accepted but not yet published can also be included in the references; designate the journal followed by 'in press' (in parentheses). Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as 'unpublished observations' (in parentheses). 'Unpublished observations' and 'personal communications' may not be used as references, although references to written, not verbal, communications may be inserted (in parentheses) in the text.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as separate and editable files, not pasted as images in the main text of the manuscript. Each table should have a brief, specific, descriptive title, giving sufficient explanation to make the data intelligible without reference to the text. Number all tables and cite in numerical order in the text, using Arabic numerals. Use footnotes under the table to provide all the required information to understand the data presented in a table. Footnotes should be concise but comprehensive – the table with its footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figures

Cite figures in the text in numerical order using Arabic numerals. Figures should be submitted in high resolution and in the highest-quality possible, in the ready for publication format, as described in the post-acceptance figure requirements here. Additional instructions:

For graphs, there must be a self-explanatory label (including units) along each axis. The thinnest lines in the final figure should be no smaller than one point wide.

For text in Figures, select Helvetica or Arial font and use the same font for all figures. Use 'symbols' font for Greek letters. Labelling must be of sufficient size and contrast to

be readable. The minimum text size allowed is 10. For figures with more than one panel, panels should be clearly indicated using upper-case letters (A, B, C, etc.) as labels.

Permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

Image acquisition and manipulation. The following information must be provided about the acquisition and processing of images: (1) maker and model of microscope, (2) magnification, (3) fixation method, (4) fluorochromes, (5) camera maker and model, (6) acquisition software, and (7) any subsequent software used for image processing, with details about types of operations involved.

Scale bars should be used with the length of the bar defined on the bar itself rather than in the legend.

Colour Figures. Figures submitted in colour may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

No specific feature within an image may be modified (e.g. enhanced, obscured, moved, recycled, removed or added). The grouping of images from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and if the changes do not alter the information illustrated in the figure. Digital images in manuscripts accepted for publication will be scrutinized for any indication of improper manipulation. As a result, the Editors may request the original data from the authors for comparison to the prepared figures. Cases of deliberate misrepresentation of data will be reported to the corresponding author's home institution or funding agency.

Figure Legends

All legends must begin with a short descriptive sentence that sums up the intent and content of the data contained in the figure. This sentence should be in bolded font. A more detailed explanation of the data contained in the figure and/or its parts should follow. The detailed description should be in Roman type (i.e., not in bolded font). Sufficient information must be provided in Figure Legends for the readers to understand and evaluate the data presented in the Figures, such as methods of analysis, gating strategy for flow cytometry experiments, number and gender of animals analyzed per experiment, and test used for statistical analysis.

APÊNDICE I – TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Maiores de 18 anos)

Consentimento Informado para o Estudo da Resposta Imune

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

Registro HU: _____ Nº: ____ - ____

NOME DO PACIENTE: _____

Investigador Principal: Amélia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracaju, -Brasil. Tel.: (79)3218-1805.

Convite e Objetivo:

Você é convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm Hanseníase. Este estudo incluirá 90 pessoas com esta doença que apresentam formas diferentes de feridas na pele. Além das informações deste documento você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da Hanseníase.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela bactéria que causa esta doença. Para isto estudaremos o seu sangue e uma parte do exame de biópsia de sua ferida na pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão, teste intradérmico e exame de secreção de sua orelha, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença, você doará 40ml de sangue (mais ou menos 3 colheres de sopa) para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material poderá ser utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a bactéria que causa a doença. Caso o diagnóstico de Hanseníase não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo é de 5 anos, a contar do primeiro dia de tratamento, caso você tenha Hanseníase. Periodicamente, você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de novo tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas (Comitê de ética do Hospital Universitário). Você e qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica.

Análises de riscos e benefícios: A retirada de seu sangue e de um pedaço da ferida são feitos se você tiver ferida, ainda antes do tratamento, para confirmar o diagnóstico da doença. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele. Como anestesia local é utilizada, a retirada de um pedaço da ferida não é acompanhada de dor. O tratamento que você receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará como benefício um acompanhamento clínico mais frequente. Um médico lhe visitará em sua casa para examinar também sua família. Você deve retornar às consultas médicas regularmente de acordo com marcação de seu cartão do Ambulatório do HU

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: A Hanseníase é relacionada a reação do seu organismo contra a bactéria que causa a doença e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle os sintomas e também formas de prevenir a doença.

Custos: Você não terá custos com o tratamento. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79)3237-7353: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, Dr. Emerson Ferreira da Costa ou Dr. Roque Almeida. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do participante	Data	Hora
Assinatura do pesquisador	Data	Hora
Assinatura da testemunha (apenas analfabetos)	Data	Hora