



**Universidade Federal de Sergipe
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Doutorado em Ciências da Saúde**

DANIELA TELES DE OLIVEIRA

**ASPECTOS HORMONAIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS FORMAS GRAVES
E COMPLICAÇÕES DA HANSENÍASE**

**ARACAJU
2017**

DANIELA TELES DE OLIVEIRA

**ASPECTOS HORMONAIIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS FORMAS GRAVES
E COMPLICAÇÕES DA HANSENÍASE**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus

**Aracaju
2017**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O482a	Oliveira, Daniela Teles de Aspectos hormonais e imunológicos associados às formas graves e complicações da hanseníase / Daniela Teles de Oliveira; orientadora Amélia Maria Ribeiro de Jesus. – Aracaju, 2017. 117 f. : il. Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2017. 1. Hanseníase - complicações. 2. Hormônios. 3. Imunologia. I. Jesus, Amélia Maria Ribeiro de, orient. II. Título. CDU 616-002.73
-------	---

DANIELA TELES DE OLIVEIRA

**ASPECTOS HORMONAIS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS FORMAS GRAVES
E COMPLICAÇÕES DA HANSENÍASE**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Prof^a. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus

1^o Examinador: Prof. Dr. Francisco de Assis Pereira

2^o Examinador: Prof^a. Dra. Lorena Almeida de Melo

3^o Examinador: Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos

4^o Examinador: Prof^a. Dra. Priscila Lima dos Santos

Dedico este trabalho aos meus pais, Sândala e Rui, por serem essenciais em minha vida, socorro presente nas horas de angústia e por não medirem esforços para vibrar com minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Sempre achei que essa seria a parte mais difícil de escrever pois, nesse instante, me vem a retrospectiva de tantos momentos vividos e pessoas importantes que estiveram presentes ao longo desses anos. De forma singela agradeço aos que contribuíram para que esse dia se concretizasse.

Inicialmente agradeço a Deus que, caprichosamente, me permitiu conhecer pessoas tão especiais ao longo dessa jornada. Meu apoio espiritual nas horas difíceis. A quem pedi, por tantas vezes, força e orientação para conquistar os meus objetivos.

A minha família em nome dos meus pais Rui e Sândala que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas.

Aos meus irmãos e amigos, Eduardo e Leonardo, que, apesar de mais novos, são grandes exemplos de foco e determinação em tudo que se propõem a fazer. Partilharam, junto comigo, todos os momentos de dificuldades e vitórias. Amo vocês!

A minha "para sempre" orientadora Dra. Amélia Ribeiro de Jesus. Frases de agradecimento serão muito pequenas diante de tudo que a senhora fez por mim. Serei eternamente grata!! Hoje quero te agradecer por ter me orientado de uma forma tão sublime e especial, afinal, foram muito mais que reuniões de orientações e pesquisas foram conselhos que levarei para toda vida. Agradeço, também, por ter me conduzido pelo caminho do bem, por me ensinar que a cada dia podemos recomeçar, por me fazer acreditar em mim. Quanto amadureci e desejei ser um pouquinho da senhora. Sem seu apoio de "mãe" esse caminho teria sido bem mais difícil. Nossa parceria não termina por aqui, ela será para todo e sempre! Que nossas agradáveis conversas tenham vida longa!

Agradeço, também ao Prof. Dr. Roque Pacheco, exemplo de homem e dedicação pelo que faz. Mesmo não atuando diretamente no ambulatório, esteve sempre de olhos atentos e disponível para auxiliar no que foi preciso. Obrigada por ter aberto as portas da sua casa e me permitir aprender sempre com o senhor e a Profa. Amélia.

Ao meu companheiro de caminhada Dr. Márcio Bezerra. Obrigada por todo auxílio em diversos momentos ao longo da execução da pesquisa. Pela sua inteligência e dedicação em tudo que faz. Você faz parte dessa conquista. Obrigada por tudo!

Ao meu colega de coleta de dados no ambulatório Dr. Rodrigo Cazzaniga. As quintas não teriam a mesma graça sem você! Foram árduos dias de entrevistas, coletas de sangue e muitas emoções. Aprendemos a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir.

Ao apoio incondicional das médicas do ambulatório de dermatologia, em especial: Dra. Jonnia, Dra. Lenise, Dra. Ana Luíza e Dra. Martha. Agradeço, também, a Dra. Viviane Correia, pelas contribuições em momentos importantes. As enfermeiras Kátia e Patrícia que conduzem, com tanta dedicação, o acompanhamento mensal dos pacientes.

Ao Laboratório LAMAC, gerenciado pela Dra. Tiziane, que com muita compreensão e valorização do nosso trabalho, não mediu esforços para fornecer as avaliações hormonais.

Estendo meus agradecimentos a todos os alunos de iniciação científica que estiveram presentes nos treinamentos, reuniões e dias de atendimento no ambulatório de hanseníase bem como a todos os colegas do laboratório de patologia.

Agradeço, também, a todos os colegas e gestores da Universidade Tiradentes, instituição onde fui acolhida e que me proporcionou o encantamento pela docência.

Por fim, um agradecimento especial a todos os pacientes que, de igual forma, me permitiram chegar até aqui. Meu muito obrigada a todos que ofereceram parte de si para contribuição científica da hanseníase.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

“O fruto de um trabalho de amor atinge sua plenitude na colheita, e esta chega sempre no seu tempo certo”

Autor desconhecido

RESUMO

Aspectos hormonais e imunológicos associados às formas graves e complicações da Hanseníase. Daniela Teles de Oliveira. Aracaju-SE, 2017.

A Hanseníase é uma doença crônica, infecto-contagiosa, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. Este é transmitido por via aérea superior e infecta células fagocíticas da pele e as células de Schwann dos nervos periféricos. Apesar do tratamento clínico, os pacientes podem apresentar complicações inflamatórias como as reações hansênicas e lesões em nervos periféricos o que pode evoluir para incapacidade física. A doença pode apresentar diferentes perfis de respostas imunológicas que estão relacionadas com as suas manifestações clínicas. Embora se conheça sobre a resposta imune na hanseníase e da influencia hormonal na evolução de infecções, ainda não há entendimento para gerar marcadores que possam definir as formas clínicas mais graves e complicações inflamatórias da doença. Diante disso, esse trabalho objetivou identificar aspectos imunológicos e hormonais associados à apresentação clínica e complicações da hanseníase. A metodologia incluiu um estudo transversal de comparação de grupos baseado na coleta de dados clínicos e marcadores séricos (imunológicos e hormonais) de controles contactantes sadios e pacientes com hanseníase. Além disso foi realizado um estudo de coorte com acompanhamento mensal e até um ano após a alta clínica a fim de avaliar o surgimento de episódios reacionais e/ou incapacidade física. Foram realizadas dosagem séricas de hormônios (adenocorticotrófico-ACTH, cortisol, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1- IGF-1 e testosterona) e de citocinas (INF- γ , IL-12p70, IL-17A, IL1- β , IL-10 e TNF- α) e, em seguida, relacionados às formas clínicas (Indeterminada- HI, Tuberculóide- HT, Dimorfa- HD e Virchowiana- HV), classificação operacional (Paucibacilar-PB e Multibacilar-MB), presença de episódios reacionais e incapacidade física. Os resultados encontraram maior proporção de homens MB (54,3%). Os pacientes MB também apresentaram maior frequência de episódios reacional (44,4%) e incapacidade física (76,5%) em comparação aos pacientes PB. Quanto à presença de hormônios circulantes foi encontrado níveis elevados de ACTH em MB ($24,2 \pm 13,1$ ng/ml; $p = 0,002$) e PB ($23,5 \pm 14,9$ ng/ml; $p = 0,007$) quando comparados aos controles ($11,9 \pm 12,3$ ng/ml). Concentrações elevadas de cortisol também foram detectados nos pacientes HT ($12,1 \pm 4,7$ μ g/dl) em relação aos controles ($8,4 \pm 2,7$ μ g/dl, $p = 0,003$), HD ($9,02 \pm 4,8$ μ g/dl; $p = 0,004$) e os HV ($8,9 \pm 2,7$ μ g/dl; $p = 0,03$). Os pacientes que apresentaram reação hansênica antes do tratamento tiveram níveis mais baixos de ACTH ($19,7 \pm 10,3$ ng/ml) e cortisol ($8,5 \pm 3,9$ ng/ml; $p = 0,04$) quando comparados com os pacientes sem reação. Também foi observado correlação positiva entre ACTH e cortisol (IC: 0,35-0,65; $r = 0,52$; $p < 0,0001$). Foram obtidos níveis mais altos de IGF-1 nos pacientes HI ($6,5 \pm 6,4$ ng/ml) que nas demais formas (HT $3,03 \pm 3,5$ ng/ml; HD $3,1 \pm 4,5$ ng/ml; HV $3,6 \pm 2,5$ ng/ml). Os pacientes com incapacidades físicas (graus 1 e 2) apresentam concentrações mais baixas de IGF-1 ($2,8 \pm 1,6$ ng/ml) quando comparados aos que não apresentam essa limitação (grau 0: $4,5 \pm 2,7$ ng/ml; $p = 0,007$). Níveis elevados de testosterona foram encontrados em homens acima de 50 anos e MB ($6,58 \pm 3,2$ ng/ml) quando comparado aos homens PB ($4,21 \pm 2,3$ ng/ml) e com os controles ($4,26 \pm 0,8$ ng/ml). Em relação à avaliação de marcadores imunológicos todas as citocinas avaliadas estiveram aumentadas nos pacientes, em relação aos controles, destacando INF- γ ($79,02 \pm 26,9$ pg/ml), IL-10 ($156,4 \pm 53$ pg/ml) e TNF- α ($463,3 \pm 160,6$ pg/ml) que estavam elevadas nas HV. Em relação à IL-17A, os pacientes com HT apresentaram níveis mais elevados ($49,2 \pm 10,5$ pg/ml) quando comparados aos valores de pacientes com HV ($40,7 \pm 4,6$ pg/ml). Já a IL1- β esteve elevada formas HI ($62,9 \pm 16,3$ pg/ml)

quando comparada às formas mais graves da doença e aos controles. Por fim o aumento em INF- γ ($97,1 \pm 44,5$ pg/ml, $p= 0,02$) e TNF- α ($407,3 \pm 82,08$ pg/ml, $p= 0,04$) esteve relacionado, nos pacientes MB, à ocorrência de episódio reacional. E esta última, também, mais elevada nos pacientes com incapacidade física ($354,3 \pm 92,2$ pg/ml, $p= 0,04$). Os marcadores hormonais e imunológicos acima descritos suportam a hipótese de que a interação entre a hanseníase e os sistemas neuroendócrinos e imunológicos desempenham um papel importante no curso natural da infecção pelo *M. Leprae*. Concentrações reduzidas de cortisol e IGF-1, altas concentrações de testosterona relacionadas ao pior desfecho clínico sugerem esses hormônios sejam importantes moduladores do episódio inflamatório e dá suporte estudos terapeuticos futuros bem como a tentativa de tratamento profilático. Além disso, as citocinas IL-17 e IL-1 β atuam no controle da multiplicação do bacilo. Já as citocinas IFN- γ e TNF- α foram associadas a presença de reação sugerindo um efeito deletério na lesão.

Palavras-chave: Hanseníase, Hormônios, Imunologia, Reação hansênica e Incapacidade Física.

ABSTRACT

Hormonal and immunological aspects associated with severe forms and complications of leprosy. Daniela Teles de Oliveira. Aracaju-SE, 2017.

Leprosy is a chronic, infectious-contagious disease caused by the *Mycobacterium leprae* bacillus. This is transmitted by airway and infects phagocytic cells of the skin and the Schwann cells of the peripheral nerves. Despite clinical treatment, patients may present with inflammatory complications such as leprosy reactions and lesions on peripheral nerves which may progress to physical disability. The disease may present different profiles of immune responses that are related to its clinical manifestations. Although it is known about the immune response in leprosy and the influence of hormones in the evolution of infections, there is still no understanding to generate markers that can define the most serious clinical forms and inflammatory complications of the disease. Therefore, this work aimed to identify immunological and hormonal aspects associated with the clinical presentation and complications of leprosy. The methodology included a cross-sectional study comparing groups based on the collection of clinical data and serum markers (immunological and hormonal) of healthy contact controls and patients with leprosy. In addition, a cohort study was carried out with monthly follow up and up to one year after clinical discharge in order to evaluate the occurrence of reactional episodes and/or physical disability. Serum levels of hormones (adrenocorticotrophic- ACTH, cortisol, Insulin-like growth factor type 1-IGF-1 and testosterone) and cytokines (INF- γ , IL-12p70, IL-17A, IL1- β , IL-10 and TNF- γ) was related to clinical forms (indeterminate-IL, tuberculoid-TT, borderline-BL and lepromatous- LL), operational classification (paucibacillary-PB and multibacillary-MB), presence of reactional episodes and physical disability. There was a higher proportion of MB men (54.3%). MB patients also had a higher frequency of reaction episodes (44.4%) and physical disability (76.5%) when compared to patients with PB. As regards the presence of circulating hormones, high levels of ACTH were found in MB (24.2 ± 13.1 ng/ml, $p = 0.002$) and PB (23.5 ± 14.9 ng/ml, $p = 0.007$) when compared with controls (11.9 ± 12.3 ng/ml). High levels of cortisol were also detected in TT patients (12.1 ± 4.7 μ g/dl) compared to controls (8.4 ± 2.7 μ g/dl, $p = 0.003$), BL (9.02 ± 4.8 μ g/dL, $p = 0.004$) and LL (8.9 ± 2.7 μ g/dL, $p = 0.03$). Patients who had leprosy before treatment had lower levels of ACTH (19.7 ± 10.3 ng/ml) and cortisol (8.5 ± 3.9 ng/ml; $p = 0.04$) when compared with the patients without reaction. A positive correlation was observed when correlating ACTH and cortisol between the hormones (CI: 0.35-0.65, $r = 0.52$, $p < 0.0001$). Higher IGF-1 levels were obtained in IL patients (6.5 ± 6.4 ng/ml) than in the other forms (TT 3.03 ± 3.5 ng/ml; BL 3.1 ± 4.5 ng/ml; LL 3.6 ± 2.5 ng/ml). Patients with physical disabilities (grades 1 and 2) have lower levels of IGF-1 (2.8 ± 1.6 ng/ml) compared to those without this limitation (grade 0: 4.5 ± 2.7 ng/ml, $p = 0.007$). High testosterone levels were found in men over 50 years of age and MB (6.58 ± 3.2 ng/ml) when compared to PB men (4.21 ± 2.3 ng/ml) and controls (4.26 ± 0.8 ng/ml). Regarding the evaluation of immunological markers, all the cytokines evaluated were increased in the patients, in comparison to the controls, highlighting INF- γ (79.02 ± 26.9 pg/ml), IL-10 (156.4 ± 53 pg/ml) and TNF- α (463.3 ± 160.6 pg/ml) that were elevated in the LL forms. Regarding IL-17A, patients with TT presented higher levels (49.2 ± 10.5 pg/ml) when compared to patients with LL (40.7 ± 4.6 pg/ml). IL1- β was elevated in IL forms (62.9 ± 16.3 pg/ml) when compared to more severe forms of the disease and controls. Finally, the increase in INF- γ (97.1 ± 44.5 pg/ml, $p = 0.02$) and TNF- α (407.3 ± 82.08 pg/ml, $p = 0.04$) was related in MB patients to the occurrence of reaction episode. The latter was

also higher in patients with physical disability (354.3 ± 92.2 pg/ml, $p = 0.04$). The hormonal and immunological markers support the hypothesis that the interaction between leprosy and the neuroendocrine and immunological systems play an important role in the natural course of *M. leprae* infection. Reduced concentrations of cortisol and IGF-1, high testosterone concentrations related to the worst clinical outcome suggest that these hormones are important modulators of the inflammatory episode and supports future therapeutical studies as well as the attempt of prophylactic treatment. In addition, IL-17 and IL-1 β cytokines act to control bacillus multiplication. The cytokines IFN- γ and TNF- α were associated with the presence of a reaction suggesting a deleterious effect on the lesion.

Keywords: Leprosy, Hormones, Immunology, Leprosy reaction and Physical Disability.

LISTA DE GRÁFICO E FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da liberação de hormônios pela adeno-hipófise e neuro-hipófise segundo regulação do eixo hipotálamo-hipofisário.....	33
Figura 2. Diagrama esquemático de recrutamento de pacientes e controles contactantes sadios na pesquisa.....	42
Figura 3. ACTH e Cortisol de controles contactantes sadios (CCS) bem como de pacientes com Hanseníase, de acordo com a classificação operacional e formas clínicas.....	49
Figura 4. ACTH e Cortisol em pacientes de acordo com a ocorrência de episódios reacionais e incapacidade física.....	51
Gráfico 1. ACTH e Cortisol em pacientes que apresentaram episódio reacional no diagnóstico da hanseníase.....	52
Figura 5. IGF-1 em controles contactantes sadios (CCS) e pacientes com hanseníase de acordo com a classificação operacional e forma clínica.....	53
Figura 6. IGF-1 em pacientes com hanseníase de acordo com a ocorrência de episódios reacionais e incapacidade física.....	54
Figura 7. Testosterona em homens controles contactantes sadios (CCS) e pacientes com hanseníase de acordo com a classificação operacional e forma clínica.....	56
Figura 8. Concentrações de citocinas em controles contactantes sadios (CCS) e pacientes com hanseníase de acordo com suas formas clínicas.....	59
Figura 9. Concentrações séricas de citocinas em pacientes com hanseníase multibacilar (MB) de acordo com a ocorrência de reações hansênicas.....	61
Figura 10. Citocinas em pacientes com hanseníase de acordo com a ocorrência de incapacidade física.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis demográficas e clínicas dos pacientes paucibacilares e multibacilares e dos controles contactantes sadios que participaram das avaliações hormonais..... 47

Tabela 2. Variáveis demográficas e clínicas dos pacientes paucibacilares e multibacilares e dos controles contactantes sadios que participaram das dosagens de citocinas..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

M. leprae: *Mycobacterium leprae*

OMS: Organização Mundial da Saúde

MS: Ministério da Saúde

BAAR: Bacilo Álcool-ácido Resistente

IB: Índice Baciloscópico

PB: Paucibacilar

MB: Multibacilar

HI: Hanseníase Indeterminada

HT: Hanseníase Tuberculóide

HD: Hanseníase Dimorfa

HV: Hanseníase Virchowiana

HDT: Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide

HDD: Hanseníase Dimorfa-Dimorfa

HDV: Hanseníase Dimorfa-Virchowiana

NP: Hanseníase Neural Pura

PQT: Poliquimioterapia

ENH: Eritema Nodoso Hansênico

RR: Reação Reversa

GIF: Grau de Incapacidade Física

T reg: T regulatória

Th1: do inglês, T *helper* 1

Th2: do inglês, T *helper* 2

Th17: do inglês, Th17

T CD4⁺: Linfócitos TCD4

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

INF- γ : Interferon Gama

PGL-1: Antígenos Glicolípido Fenólico-I

LAM: Lipoarabinomanana

PBMC: Células mononucleares de sangue periférico

IL-10: Interleucina 10

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-17: Interleucina 17

UBS: Unidade Básica de Saúde

ROM: Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina

NK: *Natural Killer*

MHC II: complexo principal de histocompatibilidade classe II

HPA: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina

AVP: Hormônio Vasopressina

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrópico

GH: Hormônio de Crescimento

GHRH: hormônio liberador de GH

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF-2: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

LH: Hormônio Luteinizante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

NF κ β : Fator Nuclear Kappa β

PRRs: Padrões Moleculares de Patógenos

LPS: Lipopolissacarídeos

TRL: Receptor do tipo Toll

AP-1: Proteína Ativadora-1

HU: Hospital Universitário

PNCH: Programa Nacional de Controle de Hanseníase

CCS: Controles Contactantes Sadios

LAMAC: Laboratório Médico de Análises Clínicas

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

RR: Risco Relativo

RP: Razão de Prevalência

LISTA DE SÍMBOLOS

α : alfa

β : beta

%: porcentagem

ml: mililitro

ng/ml: nanograma/mililitro

μ g/dl: micrograma/decilitro

pg/ml: picogramas/mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Definição e transmissão da hanseníase.....	20
2.2 Epidemiologia.....	20
2.3 Apresentação clínica da hanseníase.....	21
2.4 Imunopatogênese da hanseníase.....	23
2.5 Diagnóstico da hanseníase.....	26
2.6 Lesão de nervo periférico e avaliação neurológica simplificada.....	27
2.7 Tratamento da hanseníase.....	29
2.8 Reações hansênicas.....	30
2.9 Eixo hipotálamo-hipofisário.....	32
2.10 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	34
2.11 Eixo GH- IGF-1.....	34
2.12 Eixo hipotálamo-pituitário-gonadal.....	35
2.13 Influência hormonal na resposta imune à infecções.....	37
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos.....	40
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	41
4.1 Desenho do estudo.....	41
4.2 Caracterização da amostra.....	42
4.3 Diagnóstico dos pacientes e recrutamento dos controles contactantes sadios.....	43

4.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	43
4.5 Procedimentos do estudo.....	44
4.5.1 Avaliação inicial.....	44
4.5.2 Coleta de sangue e avaliação hormonal.....	44
4.5.3 Dosagem das citocinas.....	45
4.5.4 Acompanhamento dos pacientes.....	45
4.6 Aspectos éticos.....	45
4.7 Análises estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Avaliação de hormônios circulantes associados às formas clínicas e complicações da hanseníase.....	47
5.2 Avaliação de marcadores imunológicos associados às formas clínicas e complicações da hanseníase.....	57
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO.....	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO I: Ficha de Avaliação Neurológica Simplificada.....	83
APÊNDICE I: Questionário.....	85
APÊNDICE II: Ficha de Acompanhamento.....	89
APÊNDICE III: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	90
APÊNDICE IV: Termo de Consentimento para Menores de Idade	91
ANEXO II: ARTIGO PUBLICADO.....	92

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica, infecciosa e granulomatosa, com via de transmissão predominantemente respiratória, sendo o seu agente etiológico o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). A doença se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas com diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil onde o bacilo afeta a pele e os nervos periféricos, e se constitui a principal causa de incapacidade física (Araci, Pontes e Penna, 2005).

Apesar da evolução do conhecimento sobre esta doença, no que se refere ao diagnóstico e os avanços na terapia medicamentosa, ela ainda é um grande problema de saúde pública mundial principalmente em países em desenvolvimento. A hanseníase apresenta o declínio no número de casos novos, porém ainda encontram-se novos casos desta doença no Brasil, tornando-o um dos países com maior índice infectados na América. No ano de 2015, no Brasil, foram registrados 28,761 casos novos da doença (Freitas *et al.*, 2016).

A hanseníase manifesta-se através de sinais e sintomas dermatológicos e neurológicos que podem levar à suspeição diagnóstica da doença. As alterações neurológicas, quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente, podem evoluir para incapacidades e deformidades físicas manifestações que influenciam, diretamente, na qualidade de vida do paciente. Um dos maiores desafios no manejo da hanseníase é a prevenção de incapacidade física que está diretamente associada ao diagnóstico precoce, avaliação neurológica rotineira e correta condução de tratamento dos episódios reacionais (Oliveira, de *et al.*, 2013a; Schuring *et al.*, 2008).

Os achados fisiopatológicos na doença mostram que a resposta do tecido em presença do bacilo pode ser muito variada, desde a resposta mínima sem alterações funcionais até uma resposta intensa como a infiltração granulomatosa de todo o parênquima neural, podendo ocasionar a destruição dos nervos periféricos (Rodrigues e Lockwood, 2011).

Apesar da evolução crônica da doença fenômenos agudos, chamados de episódios reacionais, podem surgir antes, durante ou após a instituição do tratamento medicamentoso específico (Scollard *et al.*, 2015). Estes refletem fenômeno de hipersensibilidade aguda diante dos antígenos do *M. leprae* e decorrem de processo imunológico acompanhado de aumento de citocinas pró-inflamatórias. As reações hansênicas, quando não diagnosticada e/ou tratada corretamente são as maiores causas de lesão neurológica e, posterior, incapacidade física (Teixeira, Silveira, da e França, de, 2010).

Além disso, está bem estabelecido que os sistemas endócrino, nervoso e imunológico estão envolvidos em múltiplas interações durante a resposta do hospedeiro aos estímulos de patógenos, buscando combater possíveis ameaças. A modulação da inflamação pode ser feita pelo sistema imune através de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6. Contudo, pode também ser influenciada pelo sistema endócrino. O cortisol é um dos hormônios mais conhecidos na regulação do sistema imunológico, provocando imunossupressão e minimizando os efeitos de uma resposta inflamatória intensa. A sua eficácia já é conhecida no tratamento ou melhora dos sintomas de doenças inflamatórias, como a asma, e em doenças autoimunes, a exemplo do Lúpus (Baccan *et al.*, 2011a; Rhen e Cidlowski, 2005; Simon *et al.*, 2011).

A influência de hormônios em doenças infecciosas desperta grande interesse em diversos campos de pesquisa, como na tuberculose, em que foi demonstrado que a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) influencia a atividade de certos aspectos importantes do sistema imunológico, principalmente através da atividade de glicocorticóides. Estes inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como outros mediadores de inflamação e estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias proporcionando controle durante a inflamação (Bottasso *et al.*, 2013). Outra doença que mostrou ser influenciada pelos níveis hormonais foi a paracoccidiodomicose, em que os níveis de testosterona e estradiol, aparentemente influenciaram a resposta imunológica do paciente (Pinzan *et al.*, 2010). Na hanseníase, Chaitanya *et al.*, 2013; Leal e Foss, 2009; Rook e Baker, 1999a, citaram a influência do cortisol, IGF-1 e de citocinas como INF- γ e TNF- α na apresentação da hanseníase, porém, estes estudos não analisaram a associação dos níveis hormonais com o desfecho clínico.

O diagnóstico precoce é fator crucial para o controle das complicações da doença. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos, imunológicos e hormonais envolvidos na apresentação e desenvolvimento da hanseníase é o objeto de estudo dessa pesquisa que busca entender melhor a influência hormonal e imunológica na patogênese da doença. Além disso, a identificação de marcadores de diagnóstico precoce de episódios reacionais e lesão neurológica irá facilitar o tratamento precoce dessas complicações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição e transmissão da hanseníase

A hanseníase é uma doença crônica e infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium Leprae* (*M. leprae*), bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório. Este possui crescimento lento, porém resistente à digestão pelos macrófagos tissulares o que desenvolve uma infecção persistente (Araci, Pontes e Penna, 2005). O *M. leprae* foi descrito em 1873, pelo norueguês Amauer Hansen, este é capaz de infectar um grande numero de pessoas porém possui uma baixa patogenicidade, ou seja, poucos irão adoecer. O bacilo tem predileção pela pele e células de Schwann manifestando através de sinais e sintomas dermatológicos e neurológicos que podem levar à suspeição diagnóstica da doença. O quadro clínico apresenta-se com evolução crônica, lenta e progressiva. (Nobre *et al.*, 2017).

A transmissão da hanseníase ocorre por via aérea superior sendo necessário contato íntimo e prolongado entre indivíduos susceptíveis e pacientes bacilíferos não tratados. O ser humano é considerado um importante reservatório natural do bacilo. Acredita-se que as vias aéreas superiores constituem a sua principal porta de entrada bem como de eliminação. O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da doença, embora ainda existam grandes lacunas de conhecimento quanto aos prováveis fatores de risco implicados, especialmente aqueles relacionados ao ambiente social. Estudo anterior do nosso grupo encontrou um maior número de casos da doença em municípios com casas onde residem mais de 9 pessoas (Oliveira, de *et al.*, 2013b). A transmissão ambiental é cogitada por meio de solo contaminado e por contato com animais como o tatu, tido como reservatório natural do bacilo. No entanto, faltam estudos comprovando esses dados (Rodrigues e Lockwood, 2011; Turankar *et al.*, 2012).

2.2 Epidemiologia

A enfermidade é mais comum em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e atinge regiões de clima tropical, estando associada à contato íntimo e prolongado além de condições de vida precária. No quadro sanitário brasileiro, a hanseníase ainda permanece como um

desafio na saúde pública, o que justifica a necessidade dos municípios ampliarem e fortalecerem as ações de enfrentamento à doença (Oliveira, de *et al.*, 2012).

Apesar da enorme queda da prevalência da doença nos últimos 20 anos, em grande parte decorrente da introdução da poliquimioterapia (PQT), nos últimos anos ainda persiste a alta detecção de casos novos em diversos países. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) registraram que dezesseis países no mundo apresentaram mil ou mais casos da doença no ano de 2009. Nos últimos dez anos, mais de 14 milhões de casos foram detectados e tratados. No ano de 2015 o Brasil registrou 28,761 casos novos da doença o que corresponde a uma taxa de detecção de 14,7/100.00 habitantes e prevalência de 1,01/10.000 habitantes indicadores considerados como importante problema de saúde pública (Who, 2011).

Embora haja decréscimo contínuo no número de casos, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são consideradas endêmicas, com áreas de importante manutenção da transmissão (Marcos Túlio e Maria Ines Battistella, 2012; Oh *et al.*, 2016a; Who, 2011). Em Sergipe, dados do ano de 2015, notificaram 14,22/100.000 habitantes indicador de detecção considerado alto. Além disso, detecção de casos apresentando grau de incapacidade 1 e 2 foi crescente de 2005 a 2010 com acometimento em crianças menores de 15 anos, dados considerados como indicativos de mal controle da doença (Oliveira, de *et al.*, 2012).

2.3 Apresentação clínica da hanseníase

Em relação ao aspecto histopatológico, a hanseníase é classificada de acordo com os conceitos de Ridley & Jopling, (Jopling, 1966), que consideram: a forma indeterminada (HI), classificada como a mais branda da doença, as formas polares tuberculóide (HT) e virchowiana (HV) bem como as formas intermediárias que são definidas como: dimorfa (HD), dimorfa-tuberculóide (HDT), dimorfa-virchowiana (HDV) e dimorfa-dimorfa (HDD) (Fonseca *et al.*, 2017).

A HI é caracterizada pela presença da mácula hipocrômica ou eritematosa, associada a distúrbios de sensibilidade ou simplesmente por áreas de hipoestesia na pele, normalmente a primeira alteração de sensibilidade é térmica. Não há comprometimento de troncos nervosos nesta forma clínica e a pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) revela-se negativa. Após período de tempo que varia de poucos meses até anos pode ocorrer a cura ou evolução para

outra forma clínica. Histologicamente existe uma infiltração perineural inespecífica na qual os bacilos são raramente encontrados (Araújo, 2005; Simon *et al.*, 2011).

Na HT a doença é limitada pela boa resposta imune celular do hospedeiro. As lesões cutâneas, isoladas e assimétricas, são placas eritemato-hipocrômicas ou eritematosas, bem delimitadas, frequentemente com bordas externas elevadas e centro normal, apresentando alteração importante da sensibilidade, seu crescimento centrífugo lento leva à atrofia no interior da lesão, que pode, ainda, assumir aspecto tricofitóide, com descamação das bordas. Podem apresentar alopecia e anidrose, pelo comprometimento dos anexos cutâneos e espessamento de filete nervoso próximo (Oliveira, de *et al.*, 2013b). A análise histológica mostra os granulomas bem definidos e invadindo as fibras nervosas com bacilos raros. A pesquisa de BAAR é negativa. A HT, juntamente com a HI constituem as formas paucibacilares da hanseníase. Apesar da possibilidade de cura espontânea na HT, a orientação é que os casos sejam tratados para reduzir o tempo de evolução da doença e o risco de dano neural. Esses pacientes não são considerados transmissores da doença (I *et al.*, 2012).

A HD representa o grupo com instabilidade imunológica por isso existe uma grande variação nas suas manifestações clínicas em qualquer uma das regiões afetados pelo *M. leprae*. As lesões cutâneas dos pacientes com a forma HDT lembram as lesões dos pacientes com a forma HT, porém são mais numerosas e menores. O espessamento dos nervos tende a ser irregular e mais numeroso. As lesões cutâneas da forma HDD são placas com uma área central circular de pele hipocrômica bem delimitada e que se difunde na periferia perdendo os seus limites na pele (lesões “esburacadas” ou “em queijo suíço”). A baciloscopia pode ser positiva ou negativa com cargas bacilares variáveis (I *et al.*, 2012). As lesões cutâneas da HDV lembram as da HV e são numerosas, não tão simétricas e com áreas anestésicas. A infiltração assimétrica da face, dos pavilhões auriculares, e a presença de lesões no pescoço e nuca são elementos sugestivos desta forma clínica. As lesões neurais costumam ser precoces e assimétricas, podendo levar a sequelas. A carga bacilar tende a ser alta, sendo uma forma contagiosa (Mendonça *et al.*, 2008).

A HV é a forma reconhecida por corresponder ao pólo de baixa resistência dentro do espectro imunológico da doença (Lockwood e Suneetha, 2005). É caracterizada clinicamente por múltiplas lesões cutâneas polimorfas e presença de algumas manifestações sistêmicas resultantes da infiltração bacteriana, a exemplo de: rinite, lagofthalmia, conjuntivite, linfadenopatia,

hepatoesplenomegalia, atrofia testicular, anemia e osteoporose. As lesões apresentam limites imprecisos e cores variáveis, de hipocrômica a avermelhada ferruginosa e pode ou não ser acompanhada por hipoestesia ou anestesia. Pápulas, placas ou nódulos também podem ser vistos. Há rarefação dos pelos nos membros, cílios e supercílios (madarose). A infiltração da face, incluindo os pavilhões auriculares, apresenta o quadro conhecido como "fácies leonina". O comprometimento nervoso é difuso, afetando ramos que inervam a pele, vasos e troncos nervosos. A baciloscopia é fortemente positiva e representa nos casos virgens de tratamento, importante foco infeccioso ou reservatório da doença (Simon *et al.*, 2011).

Ainda pode-se classificar, de forma incomum em 5 a 10% da população de doentes, o acometimento Neural Puro (NP) da hanseníase. Essa forma caracteriza-se por envolvimento assimétrico de um ou mais troncos nervosos periféricos com ausência de manifestações cutâneas. A suspeita clínica ocorre por parestesia e/ou anestesia seguida de perda de força muscular nos nervos periféricos (Garbino, 2007).

Para fins terapêuticos a hanseníase tem sua classificação de acordo com o índice baciloscópico. Os pacientes são classificados como paucibacilar (PB) quando não são infectantes e apresentam índice baciloscópico (IB) menor que 2+ (cruzes) e multibacilar (MB) aqueles doentes com alta carga bacilar e que possuem IB maior ou igual a 2+, sendo transmissores da hanseníase. Em 1988, outros critérios clínicos foram estabelecidos que classificou como PB os casos com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido e MB casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido. Quando o exame baciloscópico é disponível pacientes com resultado positivo são considerados MB, independente do número de lesões (Brasil.Ministério da Saúde., 2002).

2.4 Imunopatogênese da hanseníase

A ampla diversidade de formas clínicas da hanseníase está relacionada à resposta imune do hospedeiro. A predominância de mecanismos de defesa (resistência à infecção) ou de disseminação da doença (susceptibilidade à infecção) irão determinar a atividade dos macrófagos, da sub população de linfócitos T envolvida e do perfil de citocinas secretadas no sítio do patógeno. Apesar da resposta imune adaptativa ter sido bem abordada na hanseníase e em outras doenças infecciosas, a resposta imune inata vem sendo avaliada apenas mais

recentemente. Entre os componentes da resposta imune inata, as quimiocinas representam um importante mediador de interações entre as células e os tecidos durante uma agressão por patógeno (Fonseca *et al.*, 2017).

Estima-se que um pequeno percentual (<1%) dos indivíduos que entram em contato com o *M. leprae* desenvolve a doença, o que indica, portanto, que a maioria da população consegue eliminar ou conviver bem com o bacilo quando há infecção. Essa informação sugere que fatores genéticos e o padrão imunológico do indivíduo em resposta a infecção pelo bacilo estão relacionados com a resistência ou a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (Simon *et al.*, 2011).

Em aspectos imunológicos, a hanseníase pode apresentar diferentes perfis de respostas que estão relacionados com as manifestações clínicas da doença. Depois de penetrar as barreiras naturais do corpo o patógeno pode desencadear uma reação inflamatória nos tecidos ativando a resposta imune inata e recrutando células fagocíticas. Após o reconhecimento dos antígenos do bacilo por células apresentadoras de antígeno, há a ativação das células envolvidas na resposta imune adaptativa, sobretudo os linfócitos T CD4⁺. As células T auxiliares (Linfócitos T CD4⁺) são subdivididas em quatro subtipos, Th1, Th2, Th17 e T reg (T regulatórias), com ações específicas na imunomodulação das defesas contra os patógenos os quais geram perfis opostos de resposta imune (Fonseca *et al.*, 2017).

As células Th1 produzem as citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- β , responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. A IL-2 ativa receptores dos linfócitos CD4⁺, estimulando a formação de clones celulares responsáveis pela manutenção da produção de citocinas e, associado a isso, estimulam células *Natural Killer* (NK) com ação de potencializar uma maior produção de IFN- γ . O IFN- γ age sobre macrófagos, estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular, levando a maior produção de TNF- α , que potencializa a ação microbicida dos macrófagos e atua na formação do granuloma (Foss, 1997). Nessa situação ocorre um aumento na produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio por macrófagos potencializando a morte ou restringindo o crescimento de micobactérias além de aumentar a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) o que favorece a apresentação de antígenos (Alter *et al.*, 2008; Mempel *et al.*, 2000).

A resposta do tipo Th2 é mediada pelas citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. A IL-4 é supressora da atividade dos macrófagos, com isso ocorre uma diminuição e até supressão da

resposta Th1 do hospedeiro, provocando um desvio da resposta imune. A IL-4 estimula os linfócitos B, que se tornam produtores de imunoglobinas, e ativa mastócitos, que passam a produzir mais IL-4, incrementando a resposta supressora macrofágica. O próprio *M. leprae* pode apresentar mecanismos de escape à oxidação intramacrofágica, pela produção dos antígenos glicolipídeo fenólico-I (PGL-1) e LAM (lipoarabinomanana), com função supressora da ativação de macrófagos, proporcionando condições para que o bacilo fique incubado no citoplasma desta célula, multiplicando-se e formando globias (Simon *et al.*, 2011).

A partir da apresentação clínica da doença é possível observar que existem duas formas clássicas de acometimento: 1- Um pólo da forma HT, que é considerado de alta resistência à infecção pelo *M. leprae*, no qual as manifestações estão relacionadas à exacerbação da resposta imune celular com a formação de granuloma bem definido, limitação das lesões e destruição completa dos bacilos. 2- A forma HV de alta suscetibilidade que se caracteriza por deficiência de resposta Th1 e predominância das respostas Th2 e T reg, excessiva multiplicação bacilar e disseminação da infecção para vísceras e tecido nervoso. É a forma de importância epidemiológica, pois os bacilos estão maciçamente presentes nas lesões cutâneas. O curso da infecção é dependente da resposta imunológica do hospedeiro, a qual é influenciada por fatores genéticos (Gulia, Fried e Massone, 2010).

Nos pacientes com a forma HT existe uma forte resposta Th1. O desenvolvimento de uma resposta imune inata eficaz, juntamente com a baixa virulência do *M. leprae*, podem mediar a destruição do bacilo e ativar a imunidade celular. Essa indução pode levar a resistência à doença. Mesmo a resposta sendo eficiente, essa forma clínica apresenta destruição de fibras nervosas bem delimitadas, em áreas específicas, levando perda da sensibilidade térmica e dolorosa, com lesões pouco numerosas e bem delimitadas (Goulart, Penna e Cunha, 2002; Simon *et al.*, 2011).

Quando a resposta Th1 falha, os macrófagos ficam repletos de parasita e há escassez de linfócitos na lesão. A disseminação do bacilo leva ao quadro de HV com mediação de resposta do tipo Th2 com presença de alta carga bacilar haja vista que essa resposta não é eficaz para eliminar o *M. leprae* (Scollard *et al.*, 2006). Esta forma clínica é a mais contagiante da doença. Já as formas dimorfas representam um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária. Os mecanismos imunológicos que determinam as mesmas ainda não foram bem estabelecidos (Fonseca *et al.*, 2017).

Além de Th1 e Th2, foi identificado outro subtipo de células CD4 que produz IL-17 (Th17) (Saini *et al.*, 2016). A IL-1 β , outra citocina pró-inflamatória associada ao desenvolvimento do inflamassoma, está envolvida na diferenciação das células Th17 (Burgler *et al.*, 2009). Embora vários estudos tenham demonstrado um papel protetor tanto da IL-1 β como da IL-17 contra patógenos intracelulares particulares e suas doenças associadas (como na encefalite experimental, esclerose, artrite reumatóide, leishmaniose, filariose e tuberculose) (Akdis *et al.*, 2011) poucos têm investigado essas citocinas na patogênese da hanseníase (Sadhu *et al.*, 2016; Sampaio *et al.*, 2012). Sampaio *et al.*, 2012, observaram liberação significativamente maiores de isoformas de IL-17 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após a estimulação com antígeno em pacientes tuberculóides e contatos saudáveis, em comparação com os pacientes com a forma lepromatosa.

2.5 Diagnóstico da hanseníase

O *M. leprae*, após infectar indivíduos susceptíveis, apresenta um longo período de incubação que pode variar 2 ou até 5 anos até a apresentação dos primeiros sinais e sintomas. Uma vez que o bacilo não seja eliminado pelo sistema imune irá colonizar, preferencialmente, células da pele e células de Schwann (Brasil. Ministério da Saúde, 2002). Nas formas mais graves a sua disseminação aumenta e pode afetar outros locais em que o bacilo não encontra resistência para a sua multiplicação tais como: linfonodos, olhos, testículos, fígado e baço. Estes achados predominam nas forma MB da doença pois essas apresentam alta carga bacilar (Colegiada *et al.*, 2010).

O diagnóstico é essencialmente clínico, dermatoneurológico, sendo necessário a realização de exames complementares do tipo baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos para os casos mais complexos. Para os casos de suspeita de NP é realizada a eletroneuromiografia. Os critérios diagnósticos da hanseníase são a presença de um ou mais dos seguintes sinais: lesões cutâneas com alteração da sensibilidade, espessamento de nervos periféricos e/ou baciloscopia positiva. Entre os achados dermatológicos é importante destacar: manchas pigmentares ou discrômicas, placas, infiltração, tubérculos e nódulos. Na hanseníase, em virtude da destruição das terminações nervosas livres, as lesões de pele sempre apresentam alteração de sensibilidade inicialmente a térmica podendo progredir para tátil e dolorosa,

respectivamente. Esta é a característica que as diferencia das lesões de pele provocadas por outras doenças dermatológicas (Brasil.Ministério da Saúde., 2002; Jopling, 1966). O Ministério da Saúde (MS) orienta que o diagnóstico e tratamento devem ser realizados nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) restando o encaminhamento, dos casos de diagnóstico complexo, aos centros de referência (Colegiada *et al.*, 2010).

2.6 Lesão de nervo periférico e avaliação neurológica simplificada

A hanseníase é temida pela alta frequência de lesão incapacitante. A injúria nervosa é desencadeada por um processo inflamatório composto de células epitelióides ou macrófagos repletos de bacilos. A intensidade, extensão e distribuição do acometimento nervoso dependem da forma clínica e da fase evolutiva da lesão. O dano neural inicia-se de forma leve e transitória e pode evoluir para uma lesão completa e irreversível do nervo. Pacientes MB, com idade avançada e/ou que já possuem um nervo acometido têm uma forte predisposição à lesão nervosa (Smith *et al.*, 2009; Veen, van *et al.*, 2009).

Estudos publicados a cerca da lesão neurológica descrevem que a injúria causa primeiramente uma anestesia, seguida de paralisia. Os nervos periféricos mais acometidos localizam-se na face (facial, trigêmeo e auricular), nos membros superiores (ulnar, mediano e radial) e nos membros inferiores (fibular e tibial) (Scollard, 2008; Scollard *et al.*, 2006). A neurite, geralmente, manifesta-se através de um processo agudo acompanhado de dor intensa e edema. No início, não há evidência de comprometimento funcional do nervo, porém, frequentemente, a neurite torna-se crônica evidencia-se através da perda da capacidade de transpiração e ressecamento da pele (Araújo, 2005). Em virtude disto, a fim de preservar a estrutura e função do nervo periférico é necessária intervenção precoce através do monitoramento da função neural e condução ideal do tratamento medicamentoso (Gonçalves, Sampaio e Antunes, 2008; Oliveira, de *et al.*, 2013b).

Em 1961 a OMS implantou uma ficha de avaliação neurológica simplificada que considera como incapacidade física qualquer comprometimento em olhos, mãos e pés. A avaliação é seguida de inspeção, palpação de nervos, testes de força muscular e sensibilidade. O serviço de saúde primário e/ou atenção especializada, através de profissionais treinados, devem realizar a avaliação neurológica no diagnóstico, no meio do tratamento e na alta por cura ou caso

o paciente apresente alguma queixa. Para os pacientes PB a avaliação deve ser realizada no início, aos três e aos seis meses de tratamento. Já para os MB avalia-se no início, sexto e décimo segundo mês de tratamento. A referido exame é imprescindível para avaliar a integridade da função neural e atribuir um grau de incapacidade física (GIF) ao paciente (Colegiada *et al.*, 2010).

O GIF é atribuído, principalmente, pela avaliação de sensibilidade dos olhos, mãos e pés. O mapeamento sensitivo é feito através de testes com monofilamentos de Semmes-Weinstein (6 monofilamentos: 0.05g, 0.2g, 2g, 4g, 10g e 300g) sobre pontos das mãos (07 pontos) e dos pés (10 pontos) de acordo com a inervação, em palma das mãos e planta dos pés. Os filamentos apresentam espessuras diferentes para medir o grau de comprometimento da sensibilidade iniciando o teste com a aplicação do mais fino (verde, com 0,05g) e, na ausência de resposta, segue-se com a aplicação dos demais monofilamentos. A ausência de sensibilidade ao percutir o monofilamento lilás (2g) caracteriza por perda da sensibilidade protetora, o que ocasiona riscos de queimar e/ou lesionar a região. Quanto a sensibilidade do globo ocular esta é realizada com a percussão, no quadrante inferior direito, de fio dental (insípido) e avaliada a presença, redução e/ou ausência de piscar o olho (Brasil.Ministério da Saúde, 2002; Colegiada *et al.*, 2010).

A avaliação da motricidade é realizada através da força de grupos musculares específicos e deve ser feita, principalmente, com a finalidade de detecção precoce de incapacidades. Para avaliação da força motora, preconiza-se o teste manual da exploração da força muscular levando em consideração a capacidade de oposição à força da gravidade e à resistência manual em cada grupo muscular referente a um nervo específico. As sequelas bem definidas podem ser encontradas já no período do diagnóstico, tais como: paralisia facial do tipo periférico unilateral ou bilateral, lagofalmo, mão em garra (garra do quarto e quinto quirodáctilos ou garra completa), pé caído e/ou garra de artelhos que pode ser acompanhada do mau perfurante plantar (Monteiro *et al.*, 2015).

Com base nos resultados da avaliação sensitiva e motora dos olhos, mãos e pés é determinado o GIF. Segundo critérios propostos pelo MS, em 2006, é atribuído, para cada região avaliada, conforme comprometimento neural, os graus 0, 1 ou 2. O grau 0 é classificado para aqueles pacientes que não possuem alteração visível em olhos, mãos e pés; grau 1 perda da sensibilidade protetora, ou seja, não sente o monofilamento lilás nas áreas testadas da pele ou o fio dental nos olhos; grau 2, pacientes que apresentam lesões em mãos e pés como úlceras,

reabsorção óssea, contraturas e deformidades (como garras) e nos olhos úlceras em córnea, triquíase, ectrópio, madarose e/ou perda da acuidade visual. O resultado final é classificado pelo maior grau que o paciente apresentou em qualquer das áreas testadas. As incapacidades, secundárias à lesão nervosa, podem acarretar alguns problemas, tais como: diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social e comprometimentos psicológicos (Lana *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2015).

A prevenção da incapacidade física é realizada por meio do diagnóstico e tratamento precoce, monitoramento e manejo adequado da neuropatia e de reações hansênicas e, caso necessário, cirurgia para reconstrução do nervo (Brakel, van *et al.*, 2008; Veen, van *et al.*, 2009). A importância do controle da incapacidade física tem sido objeto de alerta nos últimos anos uma vez que, além dos aspectos sociais e psicológicos enfrentados pelo paciente, estas podem causar limitações no trabalho incidindo na fase produtiva do indivíduo. Sendo assim, o aprofundamento nos conhecimentos dos fatores de riscos, responsáveis pelos prejuízos neurológicos, é peça fundamental para que seja possível traçar estratégias e ações de combate ao agravamento da incapacidade física nos pacientes (Agrawal *et al.*, 2005; Oliveira, 2008). Oliveira, de *et al.*, 2012 observaram uma associação entre o sexo masculino com formas MB, a ocorrência de reações hansênicas e GIF 2. Além disso, descreveram a associação entre a persistência de GIF ao final do tratamento em virtude de doses de corticosteróides abaixo da preconizada pelo MS. Esses dados sugerem a importância do tratamento adequado dos quadros inflamatórios das reações hansênicas com neurite.

2.7 Tratamento da hanseníase

A partir do fortalecimento de programas do governo houve melhora na detecção e busca ativa de casos e a hanseníase passou a ser tratada como uma doença curável e com bom prognóstico na população. O tratamento da doença está relacionado à implementação da PQT, diagnósticos precoce e acompanhamento do doente, tratamento adequado dos surtos reacionais, prevenção e reabilitação de incapacidades física e psicossocial (Oh *et al.*, 2016b; Oliveira, de *et al.*, 2013b; Who, 2011).

O tratamento medicamentoso da hanseníase, através da PQT, com seu esquema de múltiplas drogas tem ação bactericida e atividade bacteriostática impedindo que a doença se

desenvolva e interrompendo a cadeia de transmissão, além de evitar que o bacilo crie resistência à medicação. A duração do tratamento e a combinação dos medicamentos é determinada pela classificação operacional do paciente em PB ou MB (Nobre *et al.*, 2017).

Os pacientes PB recebem tratamento que dura seis meses com limite máximo de nove meses. As drogas utilizadas para o tratamento são: 600 mg de Rifampicina em dose supervisionada mensal, associada a 100 mg de Dapsona diariamente. Os pacientes MB utilizam o tratamento que dura doze meses com limite máximo de dezoito meses. As drogas utilizadas são: 600 mg de Rifampicina e 300 mg de Clofazimina em dose supervisionada mensal, associada a 100 mg de Dapsona e 50 mg de Clofazimina diariamente. Caso necessário, o profissional pode optar por tratamento alternativo, com o esquema ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina), para pacientes com impossibilidade de usar os esquemas padronizados e com doses de auto-administração (Colegiada *et al.*, 2010).

Os efeitos adversos aos medicamentos são infrequentes sendo, principalmente: anemia hemolítica, hepatite, meta-hemoglobinemia, agranulocitose, síndrome pseudogripal, síndrome da dapsona, eritrodermia, dermatite esfoliativa e plaquetopenia. Os mais graves relacionam-se à dapsona e geralmente ocorrem nas primeiras seis semanas. O tratamento é considerado efetivo após a sua conclusão e melhora dos sintomas independente da negatificação baciloscópica. Para crianças, a dose é ajustada de acordo com o peso. As recidivas são raras ocorrendo após cinco anos de alta do tratamento (Barbieri *et al.*, 2016).

2.8 Reações hansênicas

A característica crônica e evolutiva da doença dá-se pelo fato do bacilo da hanseníase apresentar um período de incubação de três a cinco anos. Durante a evolução da doença, fenômenos agudos, denominados episódios reacionais, podem surgir antes, durante ou após a instituição do tratamento específico. A duração e o número desses episódios dependem da forma clínica e/ou do índice baciloscópico inicial (Walker e Lockwood, 2008).

As reações hansênicas refletem fenômenos de hipersensibilidade aguda diante dos antígenos do *M. leprae* e decorrem de processo imunológico acompanhado do aumento de citocinas pró-inflamatórias (Teixeira, Silveira, da e França, de, 2010). Aproximadamente 25% a 30% dos pacientes com hanseníase irão desenvolver reações, que podem causar lesões na pele e

agravar o dano nervoso. Os profissionais de saúde devem estar treinados para reconhecer e tratar essa manifestação o mais precoce possível (Curto, Barboza e Paschoal, 2007; Lockwood e Suneetha, 2005).

A reação do tipo I ou Reação Reversa (RR) é mais frequente nas formas HD durante o primeiro ano de tratamento com a PQT (Hungria *et al.*, 2017). Ao exame clínico são observados sinais de inflamação aguda tais como: dor, eritema, infiltração, edema e exacerbação das lesões pré-existentes com possível surgimento de novas lesões (SCOLLARD *et al.*, 2006). Geralmente há a presença de quadros agudos de neurites isoladas e dor à palpação em todo o trajeto do nervo (Smith *et al.*, 2009; Teixeira, Silveira, da e França, 2010).

Os casos mais graves de RR apresentam ulceração profunda por necrose acentuada bem como a formação de abscesso neural. As sequelas mais comuns da reação aguda são: mão em garra, pé caído e paralisia facial acompanhados de espessamento neural e perda de sensibilidade das áreas afetadas. Assim, as neuropatias constituem-se quadros graves que exigem intervenção e conduta médica imediata a fim de prevenir o estabelecimento de incapacidades (Hungria *et al.*, 2017).

Embora seja considerada reação mediada pela imunidade celular, ainda não está claro o mecanismo da resposta imune na RR. Estudos mostram ser majoritariamente uma resposta Th1 com infiltração de células T CD4+ na pele e nos nervos com níveis elevados de TNF- α e IFN- γ no local da lesão. O tratamento preconizado para a RR é com uso de corticoesteróides orais, a exemplo da prednisona 1-2mg/kg/dia (Chaitanya *et al.*, 2013). Além disso, em casos de neurite aguda, também é orientada a imobilização do membro afetado bem como a fisioterapia a fim de evitar o surgimento de sequelas (I *et al.*, 2012).

A reação tipo II, também denominado de Eritema Nodoso Hansênico (ENH) ocorre com maior frequência nas formas MB, durante a PQT, quando as lesões cutâneas estão em involução. Entretanto, também existem casos em que o ENH se manifesta prévia ou posteriormente ao tratamento específico. O quadro clínico relaciona-se à imunidade humoral e a antígenos bacilares com deposição de imunocomplexos nos tecidos. Há aumento significativo de citocinas séricas tais como o TNF- α e o IFN- γ sem, contudo, ocorrer mudança definitiva da condição imunológica do paciente. Afeta pacientes com respostas imunes celulares pobres mas com a resposta humoral preservada contra o *M. leprae* (Chiaratti *et al.*, 2016).

As lesões preexistentes à reação tipo II tendem a permanecer inalteradas com a adição de nódulos e/ou placas infiltradas, dolorosas e de coloração rósea. Estas podem evoluir para pústulas e bolhas com ulceração e formação de necrose (“eritema nodoso necrotizante”). Há comprometimento do estado geral e o paciente pode apresentar: febre, toxemia com enfartamento ganglionar generalizado, dores musculares, artrite, irite, iridociclite, edema em mãos, pés e face. A inflamação neural tem características menos agressivas devido à evolução mais lenta que a observada na reação tipo I. Os fatores de risco da ENH são: formas HV, infiltração cutânea, IB > 4, gravidez, puberdade, vacinação e estresse (Brasil. Ministério da Saúde, 2002).

Em função dos níveis elevados de TNF- α a droga de escolha para o tratamento do ENH é a Talidomida na dosagem de 100 a 400mg/dia, conforme a intensidade do quadro, exceto no caso de gestantes ou pacientes que apresentam reação ao seu uso. Nas situações em que há a presença de neurite é indicada a associação entre a Talidomida e Prednisona essa última na dose 1 a 2mg/kg/dia. Em mulheres em idade fértil, a pentoxifilina na dose de 1.200 mg/dia, dividida em doses de 400mg de 8/8 horas, associada ou não ao corticóide, é uma opção terapêutica a fim de evitar mal formações ao feto em casos de gestação (Brasil. Ministério da Saúde, 2002; Silva e Griep, 2007).

2.9 Eixo hipotálamo-hipofisário

O eixo hipotálamo-hipofisário é um dos componentes mais complexos do sistema endócrino. Este é fundamental na coordenação de toda a resposta endócrina por estabelecer relações de controle mútuo sobre a maioria das glândulas e controlar muitos aspectos da homeostasia corporal. O hipotálamo, que corresponde a uma pequena parte do diencefalo, secreta hormônios a partir de variações cíclicas no metabolismo reguladas pelo ritmo circadiano, como os ciclos de sono-vigília, levando a modificações preditivas do meio interno a partir de referências externas associadas com disfunções fisiológicas e reprodutivas. Os principais hormônios liberados pelo hipotálamo que interferem na secreção hipofisária são:

- Hormônio liberador de tireotrofina (TRH);
- Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH);
- Somatostatina ou hormônio inibidor do hormônio do crescimento (GHIRH);

- Hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH);
- Hormônio liberador de corticotrofina (CRH);
- Hormônio liberador de prolactina (PrLRH);
- Ocitocina (OC);
- Arginina-vasopressina (AVP).

A hipófise, também denominada de pituitária, é uma pequena glândula com cerca de 1cm de diâmetro e peso de 0,5 à 1g. Localiza-se na sela túrcica na base do cérebro e está ligada ao hipotálamo pelo pedúnculo hipofisário. Em humanos a hipófise divide-se basicamente em duas porções: 1- hipófise anterior ou adeno-hipófise e 2- hipófise posterior ou neuro-hipófise. Os hormônios hipofisários controlam a diferenciação, proliferação celular e a secreção de demais hormônios representados na figura abaixo (MedlinePlus, 2013):

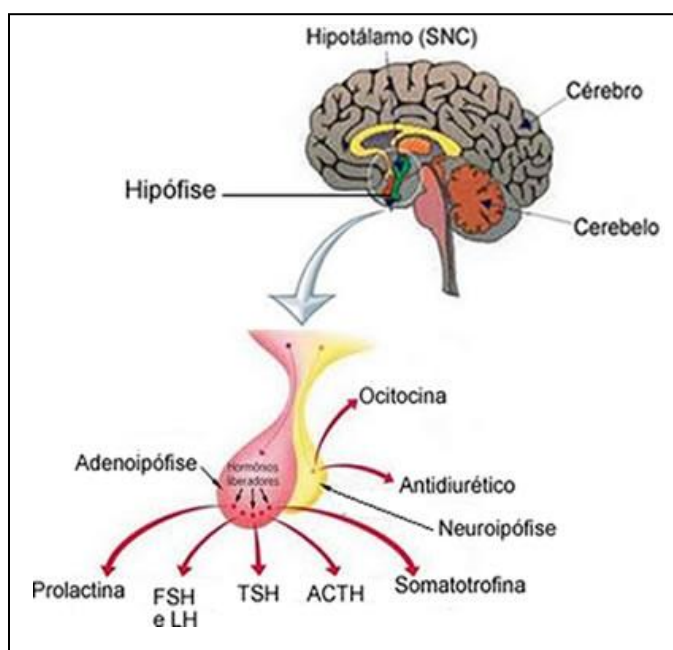


Figura 1: Esquema representativo da liberação de hormônios pela adeno-hipófise e neuro-hipófise, segundo regulação do eixo hipotálamo-hipofisário. Fonte: (MedlinePlus, 2013).

A regulação da secreção de diversos hormônios é feita por mecanismos conhecidos como feedback positivo e negativo. Nestes mecanismos de feedback, um hormônio influencia sua própria secreção ou a secreção de outro hormônio que irá atuar em ambos os níveis, hipofisário e hipotalâmico (MedlinePlus, 2013).

2.10 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).

De todos os eixos endócrinos o hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) tem sido o mais amplamente estudado. Atividade do eixo HPA é governada pela secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo os quais, por sua vez, ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvos, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa por feedback da secreção do ACTH pela pituitária e do CRH a partir do hipotálamo. O cortisol é um hormônio corticosteróide da família dos esteróides, produzido pela zona fasciculada do córtex da glândula supra-renal, diretamente envolvido na resposta ao estresse. Embora os glicocorticóides regulem a função de quase todos os tecidos do corpo, o efeito fisiológico mais conhecido desses hormônios é a regulação do metabolismo energético. Os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores dos glicocorticóides são evidentes em doses farmacológicas, ao passo que, fisiologicamente, esses hormônios possuem um importante papel regulatório no sistema imunológico (Leal *et al.*, 2006).

2.11 Eixo GH- IGF-1

O hormônio de crescimento (GH) é produzido pelos somatotrófos da hipófise anterior e em sua forma predominante, que corresponde a aproximadamente 75% do GH circulante, é constituída por uma cadeia única de 198 aminoácidos. A secreção do GH ocorre em pulsos, principalmente no início das fases III e IV do sono, com meia-vida de aproximadamente 20 minutos. Normalmente, ocorrem 6 a 10 pulsos secretórios nas 24 horas, principalmente à noite, com concentrações entre os pulsos tão baixas quanto 0,04 µg/L (Martinelli Jr., Custódio e Aguiar-Oliveira, 2008a).

A secreção hipofisária de GH tem controle hipotalâmico, exercido pelo GHRH (hormônio liberador do GH), somatostatina e em menor intensidade pela ghrelina. O GHRH e a ghrelina estimulam a secreção de GH atuando mediante receptores específicos distintos acoplados à proteína G, enquanto a somatostatina exerce ação inibitória. Quedas abruptas nos níveis plasmáticos de qualquer dos substratos metabólicos energéticos resultam em elevações

nos níveis de GH. Uma vez secretado, o GH estimula a produção de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-2) (Williams, 2012).

Os IGFs (IGF-1 e IGF-2) são fatores de crescimento peptídicos que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular. IGF-1 e o IGF-2 são moléculas de cadeia única com pesos moleculares de 7.649 e 7.471 daltons, respectivamente. Esses hormônios são produzidos em praticamente todos os tecidos, nomeadamente nas cartilagens de conjugação, músculos, vísceras e encéfalo. A sua secreção ocorre à medida que são produzidos não existindo um órgão de armazenamento. Sabe-se, atualmente, que para que o crescimento seja adequado tanto o IGF circulante, de origem principalmente hepática, quanto os IGF produzidos nos tecidos são fundamentais. Este conceito reforça a importância das ações endócrinas, parácrinas e autócrinas dos IGFs (Martinelli Jr., Custódio e Aguiar-Oliveira, 2008a).

Diversos fatores estão envolvidos na regulação da síntese dos IGFs. O GH é um dos principais promotores da produção de IGF-1 na vida pós-natal. Entretanto, o estado nutricional e o aporte protéico-calórico também desempenham papel relevante, principalmente nos primeiros anos de vida. Durante o crescimento intra-uterino, os IGFs apresentam menor dependência em relação ao GH, o qual, após o nascimento, assume gradualmente a posição de principal regulador. Distintamente do observado em relação ao IGF-1, a ação estimuladora do GH sobre a secreção do IGF-2 é discreta (Williams, 2012).

2.12 Eixo hipotálamo-pituitário-gonadal.

O eixo hipotálamo-pituitário-gonadal está amplamente relacionado com a função reprodutora masculina e feminina. A secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) é estimulada, a nível do hipotálamo, pelo GnRH. O GnRH é um decapeptídeo produzido predominantemente ao nível do núcleo arqueado e na área pré-óptica do hipotálamo, sendo posteriormente transportada até à eminência mediana e armazenada em grânulos de secreção. Antes da puberdade, a secreção de GnRH é contínua e não consegue despertar a secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Na puberdade, por maturação do sistema límbico, a secreção de GnRH torna-se pulsátil inicialmente na fase do sono REM seguida do sono não-REM e, finalmente, seguindo às 24 horas (Williams, 2012).

As glicoproteínas LH e FSH regulam o desenvolvimento, crescimento, maturação pubertária, processos reprodutivos e secreção de esteróides sexuais nas gônadas. São segregadas pelos gonadotrofos, que correspondem a 10-15% das células glandulares da adenohipófise. A pulsatilidade da secreção de LH e FSH mantém-se à custa da pulsatilidade da GnRH e não depende dos esteróides gonadais sendo diferente quando se trata do homem e mulher. Nos homens, o FSH e o LH estimulam a produção de testosterona pelas células de Leydig nos testículos e promovem a maturação dos espermatozóides. Nas mulheres os dois hormônios atuam em diversas etapas do ciclo menstrual, atuando nos ovários e estimulando a produção de estrogênio (Martinelli Jr., Custódio e Aguiar-Oliveira, 2008a).

Os principais hormônios sexuais femininos são o estrogênio e a progesterona. O estrogênio é produzido pelos folículos dos ovários. Os três estrogênios naturais são o estradiol, o estriol e a estrona. O estradiol é liberado na primeira fase do ciclo menstrual com sua produção aumentada na adolescência, quando é responsável pelo aparecimento das características sexuais da mulher, e finalizando na menopausa. O estrogênio induz a musculatura lisa do útero aumentar, provoca o aumento da vagina, o desenvolvimento dos lábios que a circundam, faz o púbis se cobrir de pelos, os quadris se alargarem e o estreito pélvico assumir a forma ovoide. Também contribui para a consolidação do tecido adiposo dificultando a sua metabolização e estimula o crescimento de todos os ossos logo após a puberdade (Snider *et al.*, 2009; Straub, 2007).

A testosterona é responsável pelas características diferenciais masculinas. A secreção desse hormônio inicia-se no feto com o desenvolvimento da genitália externa masculina. Já na puberdade e fase adulta a testosterona é responsável pela virilização, ou seja, pelo desenvolvimento das características físicas que diferenciam o corpo do homem do corpo feminino adulto bem como pelo desejo (libido), a ereção e a fertilidade. Após os 50 anos inicia-se a deficiência androgênica do envelhecimento masculino, também conhecida como hipogonadismo ou andropausa. A partir dessa fase há uma queda expressiva nas concentrações séricas do hormônio (Snider *et al.*, 2009).

2.13 Influência hormonal na resposta imune à infecções

Os hormônios podem influenciar a evolução de infecções. O estudo descrevem que ratos hipofisectomizados são mais susceptíveis aos efeitos letais da bactéria *Salmonella typhimurium*, devido à inabilidade dos macrófagos em se tornarem ativados normalmente. O GH é um dos hormônios produzidos pela hipófise que pode ter ação na resposta imune. O GH induz a produção de IGF-1 e ambos agem como hormônios anabólicos e moduladores do estresse em muitas células, incluindo as do sistema imune (Medline Plus, 2013).

Os IGFs são hormônios peptídicos filogeneticamente bem preservados implicados no metabolismo, indução de proliferação, inibição de apoptose e diferenciação de diferentes tipos celulares. Evidências da literatura apontam também propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Rodrigues *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* demonstraram que IGF-1 induz um aumento na proliferação de promastigotas e amastigotas axênicas de diferentes espécies de *Leishmania* (Gomes *et al.*, 2007; Sciences, 1998). Estudos em modelo experimental infectado por *Leishmania major* demonstraram que o IGF-1 promove um aumento significativo do tamanho da lesão e no número de parasitos viáveis no sítio da lesão, favorecendo o crescimento do parasito no interior dos macrófagos. Além disso, esse hormônio atua no metabolismo de L-arginina, promovendo principalmente o aumento da expressão e ativação da arginase do parasito e dos macrófagos infectados levando a uma produção de poliaminas que favorecem o seu crescimento e, reciprocamente, diminuindo a produção de óxido nítrico (NO) e reduzindo o atividade microbicida dos macrófagos (Vendrame *et al.*, 2007).

Batista-Silva et al, 2016 demonstraram que o *M. leprae* induz a liberação IGF-1 o qual atenua os mecanismos microbicidas dos macrófagos e favorece o crescimento dele nessas células. No entanto, Rodrigues *et al.* (2011) mostraram uma relação entre níveis mais baixos de IGF-1 com formas clínicas MB e com o desenvolvimento de episódio reacional do tipo ENH. O dano ao nervo na hanseníase é exacerbado com o desenvolvimento de episódios reacionais e está correlacionado à resposta imunológica desenvolvida pelo indivíduo contra o bacilo.

Em relação à testosterona, algumas observações sugerem um papel significativo deste hormônio na modulação imunológica em doenças infecciosas, como leishmaniose (Snider *et al.*, 2009) e tuberculose (García-Gómez *et al.*, 2013). Guerra-Silveira e Abad-Franch (2013) mostraram uma clara predominância do sexo masculino na incidência de tuberculose,

leptospirose, meningite meningocócica, hepatite A e na hanseníase. Em algumas doenças o ambiente e a condição social interferem significativamente para o dimorfismo sexual, por exemplo, quando o homem, devido a situações laborais e sociais, se expõe mais do que a mulher a determinado fator de risco. No entanto a hipótese de um efeito fisiológico ganha suporte em observações do nosso grupo na hanseníase em um levantamento dos casos de hanseníase no período de 2005 a 2011. Nesse estudo, apesar do número de casos de hanseníase ser igual entre homens e mulheres, houve uma associação de formas MB com o sexo masculino (OR 2.9, 95% CI [2.46 to 3.30]; $p < 0.0001$), o que sugere maior acometimento das formas graves em homens (Oliveira, de *et al.*, 2012).

Os efeitos supressores da testosterona no sistema imune são bem estudados. A testosterona induz regulação negativa de fatores de transcrição próinflamatórios como a proteína p38 MAP (Benten *et al.*, 2004), reduz a síntese de citocinas inflamatórias, incluindo TNF, através da inibição do fator nuclear kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) (McKay e Cidlowski, 1999), altera a liberação de citocinas inflamatórias por macrófagos perante exposição à endotoxina (Angele *et al.*, 1998), reduz atividade de células NK, diminui a capacidade microbicida de neutrófilos humanos, aumenta a produção de IL-10 (Liva e Voskuhl, 2001; Nieves-bonilla, [s.d.]) e diminui a expressão de receptores do tipo Toll (TLR4) em macrófagos, um dos receptores presente em células inflamatórias que reconhece padrões moleculares de patógenos (PRRs), nesse caso o lipopolissacarídeos de bactérias (Rettew, Huet-Hudson e Marriott, 2008).

Entretanto, podemos evidenciar o efeito imunológico do estrógeno como oposto ao da testosterona. Observações relativamente antigas já mostram que o estrógeno pode aumentar a fagocitose, por macrófagos, de eritrócitos opsonizados por IgG (Friedman, Netti e Schreiber, 1985) fato esse explicado por observações mais recentes de que macrófagos tem receptores de andrógeno e de estrógeno (Klein, 2004). O estrógeno aumenta a resposta imune protetora e aumenta a atividade do promotor genético para $\text{INF-}\gamma$, aumenta a citotoxicidade e a produção de IL-1, IL-6 e TNF por células NK além de diminuir a produção de IL-4, IL-10 e $\text{TGF-}\beta$ (García-Gómez *et al.*, 2013; Straub, 2007).

Já o cortisol está diretamente envolvido na resposta ao estresse. Dos hormônios com efeito sobre a resposta imune, este é o mais reconhecido. O cortisol tem função catabólica, no equilíbrio eletrolítico e no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, além de possuir um potente efeito anti-inflamatório nos fagócitos e imunossupressor nas células T. Este hormônio é

utilizado largamente no tratamento de diversas doenças inflamatórias e autoimunes. O cortisol tem efeitos supressores tanto na resposta imune inata quanto adaptativa. Apesar de induzir neutrofilia, pela liberação dessas células da medula óssea e redução da mobilização de leucócitos circulantes por inibição da produção e ligação de moléculas de adesão aos receptores, reduzindo a marginação dos neutrófilos, diminui a atividade fagocitária e bactericida dos neutrófilos. Além disso, o cortisol em doses mais elevadas, diminui o número de linfócitos circulantes por bloqueio da progressão no ciclo celular, particularmente os T auxiliares. Toda a imunidade mediada por células é deprimida, sendo os mecanismos de depressão desta resposta um efeito em linfócitos e macrófagos, inibindo a produção de dois fatores que estimulam a transcrição de citocinas: NF κ -B e a proteína ativadora-1 (AP-1). Em consequência, reduz-se a produção e liberação das citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-2 (Rook e Baker, 1999b).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar aspectos imunológicos e hormonais associados à apresentação clínica e complicações da hanseníase.

Hipótese: Concentrações hormonais e marcadores imunológicos podem ser utilizados como preditores de formas clínicas mais graves e complicações da hanseníase.

3.2 Específicos

Avaliar a associação entre as concentrações de hormônios que interferem na resposta imune com as formas clínicas e complicações da hanseníase.

Hipótese: Concentrações de alguns hormônios que afetam a resposta imune se associam às formas clínicas mais graves da Hanseníase e podem ser preditores do surgimento de reações hansênicas e lesões neurológicas.

Analisar a associação entre concentrações séricas de marcadores imunológicos com as formas clínicas e complicações da hanseníase.

Hipótese: Variações em biomarcadores inflamatórios interferem no surgimento de formas clínicas mais graves da hanseníase e podem ser preditores do surgimento de reações hansênicas e lesão neurológica.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O estudo apresentou os seguintes desenhos:

- Para avaliação no diagnóstico: foi realizado um estudo transversal, de comparação de grupos, baseado na coleta de dados clínicos e parâmetros imunológicos e hormonais que o paciente apresentou no diagnóstico da hanseníase.
- Para acompanhamento da evolução clínica: foi realizado um estudo de coorte com os pacientes, recrutados no estudo transversal, que fizeram o tratamento regular para hanseníase e foram acompanhados mensalmente e até um ano após a alta clínica a fim de avaliar o surgimento das complicações da doença (episódios reacionais e/ou incapacidade física).

O esquema representativo, de recrutamento e acompanhamento dos controles e pacientes, segue abaixo:

Recrutamento de pacientes e controles na pesquisa

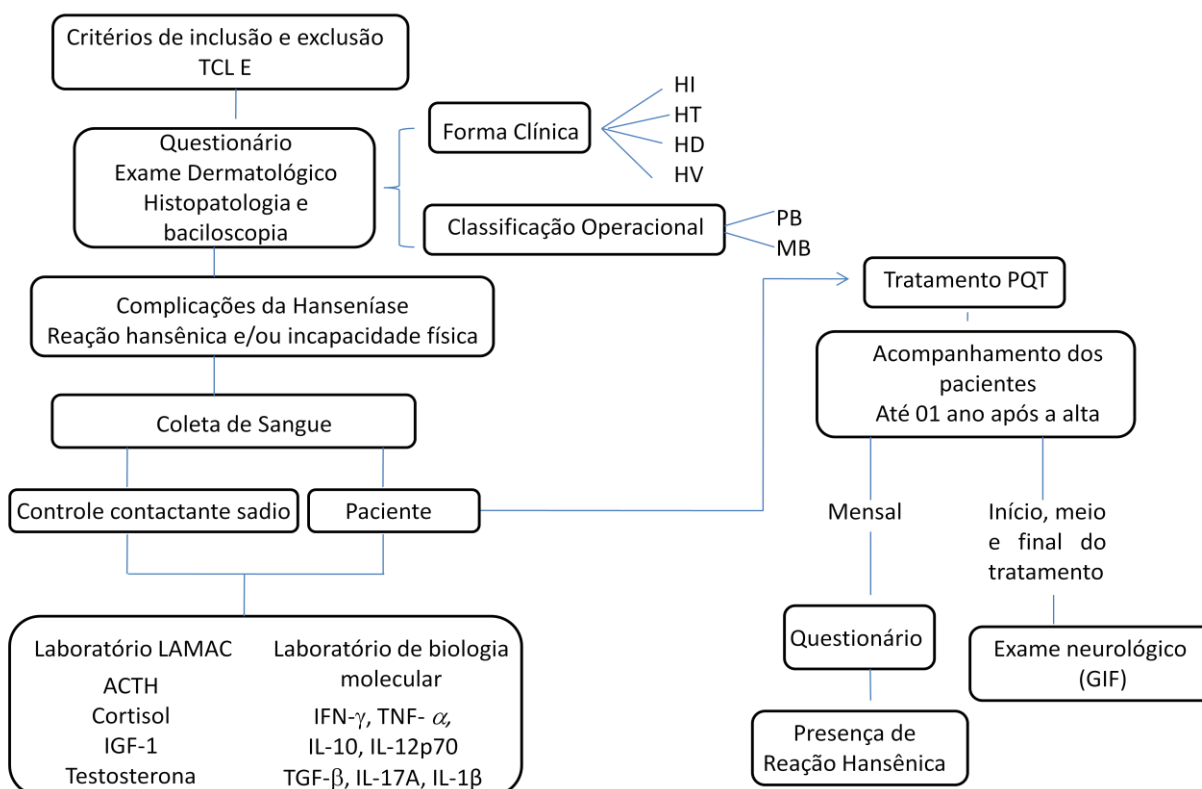


Figura 2. Diagrama esquemático de recrutamento de pacientes e controles contactantes sadios na pesquisa. TCLE: termo de consentimento Livre e esclarecido; HI: hanseníase indeterminada; HT: hanseníase tuberculóide; HD: hanseníase dimorfa; HV: hanseníase virchowiana; PB: paucibacilar; MB: multibacilar; GIF: grau de incapacidade física; PQT: poliquimioterapia. Etapa de realização do estudo transversal e etapa de estudo de coorte.

4.2 Caracterização da amostra

A amostra por conveniência, não aleatória, com recrutamento de pacientes com diagnóstico de hanseníase, detectados por busca ativa ou encaminhamento de outras unidades, sem tratamento prévio, atendidos pelo projeto (DES)MANCHA, no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário (HU) em Aracaju, Sergipe. O projeto (DES)MANCHA foi criado no ano de 2000 e tem como objetivo principal detectar os casos de hanseníase admitidos no ambulatório de dermatologia por demanda espontânea ou por encaminhamento. O período de inclusão dos pacientes no estudo foi de janeiro de 2013 à dezembro de 2016.

4.3 Diagnóstico dos pacientes e recrutamento dos controles contactantes sadios

O diagnóstico da hanseníase foi realizado por médicos especialistas do ambulatório de dermatologia do HU e que fazem parte do projeto (DES)MANCHA. Foi realizada uma investigação epidemiológica seguida de avaliação dermatoneurológica, solicitação de exames como baciloscopia e histologia da lesão, conforme rotinas que já são estabelecidas e regulamentadas pelo o Programa Nacional de Controle da Hanseníase (PNCH) através da Portaria 3.125, SVS/MS de 7 de Outubro de 2010. Exames laboratoriais de rotina foram solicitados em caso de necessidade de acompanhamento terapêutico. A condução do tratamento foi realizada de maneira independente, seguindo critérios do PNCH não sofrendo, portanto, influências que possam causar prejuízos aos pacientes.

Os controles contactantes sadios (CCS) foram selecionados a partir de familiares e/ou acompanhantes dos pacientes de realizaram a avaliação dermatoneurológica para exclusão da hanseníase. Os mesmos foram avaliados uma única vez para coleta e análise de marcadores hormonais e imunológicos.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os **critérios de inclusão** para pacientes da pesquisa foi ter o diagnóstico de hanseníase confirmado por aspectos clínicos (presença de lesões cutâneas sugestivas de hanseníase e com alteração de sensibilidade), baciloscopia e histopatologia, além de ter consentido participar do estudo. Para as suspeitas de casos da forma clínica neural pura a confirmação foi por meio de quadro clínico (presença de neurite ou de comprometimento da função de nervos periféricos característicos de hanseníase) e eletroneuromiografia.

Os **critérios de exclusão** foram ter iniciado o tratamento com PQT para hanseníase, presença de infecção ou condição clínica que interfira no padrão de resposta imune, nas formas clínicas da doença, na sua gravidade ou no exame neurológico (HIV, HTLV-I, Diabetes Mellitus, hérnia de disco e/ou gestação), estar em uso de medicamentos que possam alterar o padrão de resposta imune, a exemplo de corticosteróides. Os controles que apresentaram sinais dermatoneurológicos de hanseníase também foram excluídos da pesquisa.

4.5 Procedimentos do estudo

4.5.1 Avaliação inicial

Os pacientes foram admitidos e/ou encaminhados para a avaliação e diagnóstico da hanseníase no ambulatório do (DES)MANCHA. Essa avaliação consiste no exame dermatoneurológico, realizado por dermatologista, seguido da realização de exames complementares como histopatologia, através de biópsia da lesão para o diagnóstico da forma clínica da hanseníase (HI, HT, HD, HDT, HDV, HV ou NP). Também foi solicitada a baciloscopia da linfa para avaliação do IB e definição da classificação operacional (PB ou MB) que orienta o tempo de administração da PQT em 06 (seis) ou 12 (doze) meses, respectivamente.

Ainda na consulta inicial, os pacientes foram submetidos à avaliação neurológica simplificada das regiões dos olhos, mãos e pés (ANEXO I) a fim de classificar o GIF em 0, 1 ou 2. A avaliação do GIF foi realizada no diagnóstico, no meio e ao final do tratamento ou no caso de surgimento de episódio reacional e/ou queixas neurológicas durante o acompanhamento mensal do paciente. Em seguida foi preenchido um questionário com dados sócio-econômicos, informações sobre doenças pregressas e atuais (APÊNDICE I).

4.5.2 Coleta de sangue e avaliação hormonal

Após a confirmação diagnóstica da hanseníase e antes da utilização de esquema medicamentoso os pacientes foram encaminhados para realizar coleta de sangue para avaliação de marcadores hormonais. Os CCS seguiram o mesmo protocolo de orientação e coleta de sangue. A coleta de sangue para avaliação hormonal foi realizada no Laboratório Médico de Análises Clínicas (LAMAC) localizado na Rua Lagarto, número 1290, bairro: centro, em Aracaju, Sergipe. O referido laboratório é colaborador da pesquisa e, na ocasião, foi orientado ao paciente e CCS jejum de 12 horas e coleta no turno da manhã, até as 8:00 horas. Foram colhidos 8ml de sangue para avaliação do ACTH, Cortisol, IGF-1 e Testosterona. Foi utilizado o método de quimioluminescência e os valores foram considerado de acordo com o intervalo de referência por idade fornecido pelo fabricante do *kit*.

4.5.3 Dosagem das citocinas

Para avaliação das citocinas foram colhidos 8 ml de sangue periférico dos CCS e pacientes antes do tratamento com a PQT, no laboratório de biologia molecular do HU. Em seguida, o sangue foi centrifugado, para separação do soro, e armazenado em freezer à -80⁰ para, posteriormente, ser analisado o perfil das citocinas. As concentrações séricas das citocinas (IL-12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-1 β , IL-10 e TNF- α) foram dosadas por análises de multiplex (Luminex- *Kit* Milliplex - Painel Magnético Th17, Panomics, Affymetrix, Fremont, CA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.4 Acompanhamento dos pacientes

Após o diagnóstico e avaliação inicial o paciente foi orientado quanto ao tratamento com a PQT preconizada e fornecida pelo MS. O MS orienta o acompanhamento mensal dos casos e, por isso, o paciente é orientado a comparecer ao ambulatório a cada 28 dias a fim de tomar a dose supervisionada e levar a cartela de medicação para tomar no domicílio. A cada comparecimento mensal desse paciente ao ambulatório e até um ano após o término do seu tratamento foi realizado o preenchimento de uma ficha de acompanhamento na qual foram registradas informações que tinham como objetivo detectar possível surgimento de episódio reacional e/ou lesão neurológica. A ficha contém informações sobre o estado geral do paciente como: astenia, febre, fraqueza muscular, parestesia, perda de peso e náuseas, bem como exame físico com inspeção para o surgimento e/ou exacerbação de manchas, edema e nódulos na pele (APÊNDICE II).

4.6 Aspectos éticos

O presente trabalho foi encaminhado para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Sergipe CEP-UFS, como parte de um projeto maior intitulado “Aperfeiçoamento dos métodos de detecção de *M. leprae* e definição de biomarcadores para o diagnóstico das formas clínicas e complicações da hanseníase”. O projeto

atendeu a Resolução nº 466, de 12 de Dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e foi aprovado com número do CAEE: 31167014.4.0000.5546.

Após o diagnóstico da hanseníase, os pacientes e CCS recrutados e/ou responsáveis legais receberam uma explicação verbal sobre os objetivos da pesquisa. Em seguida foram convidados a participar do estudo e foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE III). Em casos de doentes menores de 18 anos, foi solicitada a autorização do responsável legal por meio de TCLE específico) (APÊNDICE IV). A condução do tratamento foi realizada de maneira independente, seguindo critérios do PNCH, não sofrendo influências que possam causar prejuízos aos pacientes.

4.7 Análises estatística

As concentrações hormonais e de citocinas foram comparadas entre os diferentes subgrupos e de acordo com as formas clínicas da hanseníase. Os testes de D'Agostino e Pearson foram aplicados para analisar se os grupos a serem comparados tinham dados que obedeciam uma distribuição normal. A porcentagem, média, variação e desvio padrão dos grupos foram calculados. Foram calculadas médias e desvio padrão para as variáveis contínuas e frequências para as variáveis categóricas. Nas análises das variáveis demográficas e clínicas, teste de exato Fisher foi utilizado para análises de associação entre as variáveis categóricas com seus determinantes e cálculo da razão de prevalência (RP) no estudo transversal, ou do risco relativo (RR) no estudo prospectivo. Kruskal-Wallis foi utilizado nas análises das variáveis contínuas para detectar diferenças entre dados não paramétricos de 3 grupos. As diferenças estatísticas das variáveis contínuas entre dois grupos não paramétricos foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, ou pelo teste t de *Student* (considerando a variância desigual dos grupos) em dados paramétricos. Análise de correlação de Sperman foi utilizada para comparar as dosagens de ACTH e cortisol. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando foi obtido $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando Graph Pad Prism versão 7.0.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação de hormônios circulantes associados às formas clínicas e complicações da hanseníase

Na tabela 1 pode ser observado que os pacientes MB tinham média de idade mais alta ($48,1 \pm 17,7$ anos; $p = 0,007$) quando comparados aos pacientes PB ($43,8 \pm 17,1$ anos) e os controles ($36,2 \pm 10,8$ anos). Os homens apresentaram maior frequência das formas MB (54,3%) que as formas PB (35,5%; $p = 0,04$). Os pacientes MB apresentaram frequência muito baixa de baciloscopia positiva (30,9%), considerando a alta carga bacilar observada nas biópsias cutâneas. A ocorrência de episódios reacionais foi mais frequente nas formas MB (44,4%), quando comparada às formas PB (20%; $p = 0,006$), bem assim a ocorrência de incapacidade física, sendo em pacientes MB (76,5%) e nos PB (22,2%; $p < 0,0001$).

Tabela 1. Variáveis demográficas e clínicas dos pacientes paucibacilares e multibacilares e dos controles contactantes sadios que participaram das avaliações hormonais.

Variáveis		PB (n = 45)	MB (n = 81)	CCS (n = 19)	p RR [IC 95%]
Idade	Variação	05 – 79	09 – 82	19 - 67	
	Média $\pm$ DP	$43,8 \pm 17,1$	$48,1 \pm 17,7$	$36,2 \pm 10,8$	*0,007
Homem	n (%)	16 (35,5%) ^a	44 (54,3%) ^b	06 (31,6%)	**0,04 ^{ab} 1,31 [1,01 – 1,72]
Baciloscopia positiva	n (%)	0 (0%)	25 (30,9%)	NA	-
Reação hansênica	n (%)	09 (20%)	36 (44,4%)	NA	**0,006 1,44 [1,12 – 1,84]
Grau de incapacidade física	n (%)	10 (22,2%)	62 (76,5%)	NA	**<0,0001 2,45 [1,74 – 3,65]

MB (multibacilares); PB (paucibacilares); CCS (controle contactante sadio); DP (desvio padrão); RR (risco relativo); IC (intervalo de confiança); NA (não se aplica)

* Teste: Kruskal-Wallis; ** Teste: Exato de Fisher; $p < 0,005$; ab: valor de p referente a correlação entre os pacientes multibacilares e paucibacilares.

As concentrações de hormônios séricos foram avaliadas em pacientes com hanseníase de acordo com a sua classificação operacional (PB e MB), formas clínicas (HI, HT HD e HV) bem como nos CCS. Foram observadas concentrações elevadas de ACTH nos pacientes MB (média $\pm$ desvio padrão) ($24,2 \pm 13,1$ ng/ml; $p = 0,002$) e PB ($23,5 \pm 14,9$ ng/ml; $p = 0,007$) quando comparadas aos controles ($11,9 \pm 12,3$ ng/ml; **Figura 3A**), embora não tenha havido diferença significativa de ACTH entre as formas PB e MB. As concentrações séricas de cortisol também foram mais elevadas em pacientes PB ($10,97 \pm 4,5$ μ g/dl; $p = 0,03$) quando comparadas com as dos CCS ($8,4 \pm 2,7$ μ g/dl; **Figura 3B**). Porém, não foram encontradas diferenças quando comparadas as formas PB e MB.

Ao considerar as formas clínicas da doença, de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966), foram observadas concentrações mais elevadas de ACTH nos pacientes HI ($29,2 \pm 22,5$ ng/ml) quando comparadas às das demais formas clínicas e dos controles. Os CCS apresentaram concentrações mais baixas de cortisol ($8,4 \pm 2,7$ μ g/dl) do que todas as formas clínicas da hanseníase (HT $24,6 \pm 11,9$ ng/ml, $p = 0,004$; HD $22,9 \pm 12,4$ ng/ml, $p = 0,02$; HV $22,4 \pm 9,5$ ng/ml, $p = 0,05$; **Figura 3C**). Concentrações mais elevadas de cortisol também foram detectadas nos pacientes HT ($12,1 \pm 4,7$ μ g/dl) em relação aos CCS ($8,4 \pm 2,7$ μ g/dl, $p = 0,003$), HD ($9,02 \pm 4,8$ μ g/dl; $p = 0,004$) e os HV ($8,9 \pm 2,7$ μ g/dl; $p = 0,03$; **Figura 3D**).

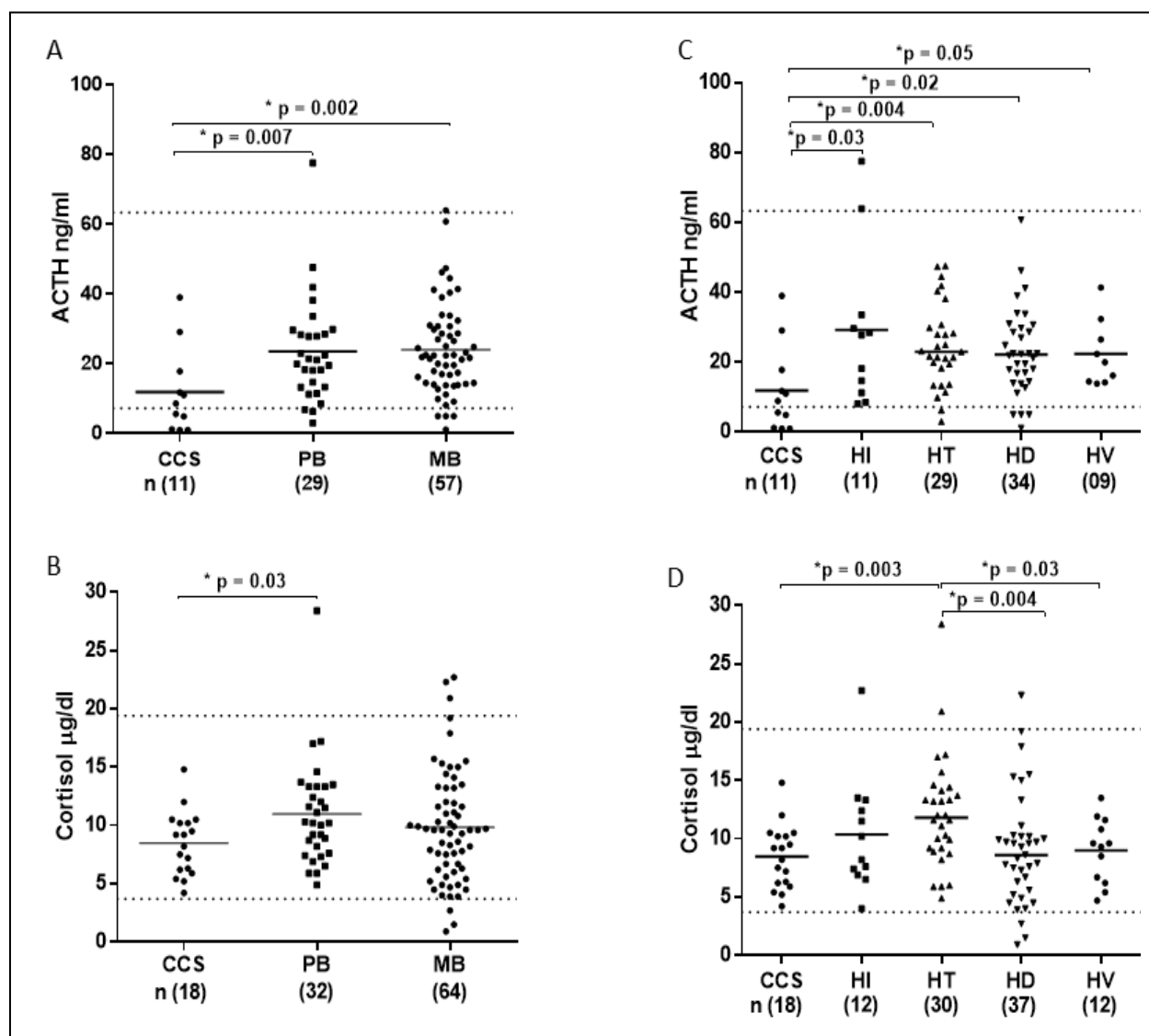


Figura 3. ACTH e Cortisol de controles contactantes sadios (CCS) bem como de pacientes com Hanseníase, de acordo com a classificação operacional e formas clínicas. Concentrações séricas de ACTH (A) e Cortisol (B) em controles contactantes sadios (CCS) e em pacientes Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB). ACTH (C) e Cortisol (D) em CCS e pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas (HI, HT, HD e HV). Os soros dos pacientes foram coletados em laboratório certificado e colaborador da pesquisa até as 8:00 da manhã. As concentrações dos hormonais foram analisadas pelo método de quimioluminescência. As linhas pontilhadas no gráfico indicam limites de normalidade. Para análise estatística foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

Ao considerar que o ACTH e Cortisol estão envolvidos na supressão da resposta inflamatória sistêmica, as concentrações séricas desses hormônios foram analisadas em pacientes com ou sem episódios de reação hansênica. Os pacientes que apresentaram reação hansênica antes do tratamento com a PQT tiveram concentrações mais baixas de ACTH ($19,7 \pm 10,3$ ng/ml) quando comparadas com as dos pacientes sem reação ($26,1 \pm 13,4$ ng/ml; $p=0.04$; **Figura 4A**). Similarmente, as concentrações de cortisol foram mais baixas nos pacientes com reação hansênica ($8,5 \pm 3,9$ ng/ml) quando comparadas com as dos pacientes que apresentaram reação ($11,3 \pm 4,7$ ng/ml; $p=0,007$; **Figura 4B**).

Posteriormente foi avaliado os níveis hormonais dos pacientes que evoluíram com episódios reacionais durante qualquer tempo do acompanhamento uma vez que é possível o surgimento de reação antes, durante ou após o uso da PQT. Não foi observado diferenças entre os grupos quando analisados os níveis de ACTH (**Figura 4C**). Entretanto, níveis baixos de cortisol foram detectados em pacientes com reações hansênicas ($8,7 \pm 3,7$ ng/ml) que em pacientes que não evoluíram com reação ($11,8 \pm 5,5$ ng/ml; $p=0,01$; **Figura 4D**). A presença de incapacidade física (grau 1 ou 2) também é um fator considerado como complicação da doença, porém, não foram encontradas relações entre os níveis de ACTH e cortisol entre os pacientes que apresentaram ou não qualquer incapacidade física no diagnóstico; **Figura 4E E 4F**.

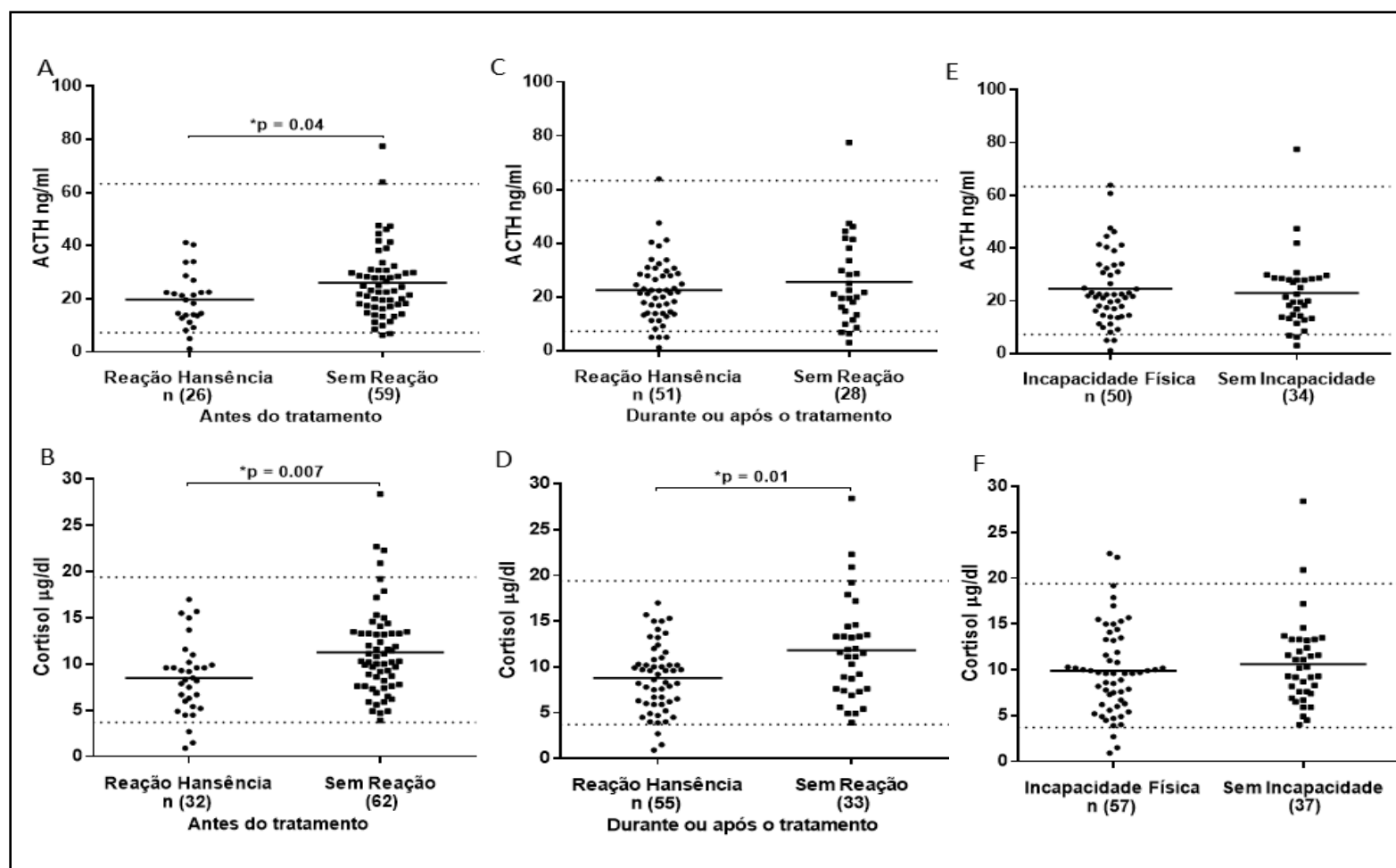


Figura 4. ACTH e Cortisol em pacientes de acordo com a ocorrência de episódios reacionais e incapacidade física. Concentrações séricas de ACTH (A) e Cortisol (B) antes do tratamento com a PQT em pacientes que desenvolveram ou não episódios reacionais antes do tratamento; ACTH (C) e Cortisol (D) em pacientes que apresentaram episódios reacionais durante ou após o tratamento; ACTH (E) e Cortisol (F) em pacientes com (GIF 1 ou 2) e sem incapacidade física (GIF 0) (E). Os soros dos pacientes foram coletados em laboratório certificado e colaborador da pesquisa, até as 8:00 da manhã. As concentrações dos hormônios foram analisadas pelo método de quimioluminescência. As linhas pontilhadas no gráfico indicam limites de normalidade. Para análise estatística foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

No gráfico 1 foi realizada análise de correlação entre os valores de ACTH e cortisol dos pacientes que apresentaram episódio reacional no diagnóstico clínico. Foi possível observar uma correlação positiva entre os hormônios (IC: 0,35-0,65; $r = 0,52$; $p < 0,0001$) o que confirma os dados apresentados anteriormente que sugerem uma regulação endócrina central nos pacientes que possuem complicações da doença.

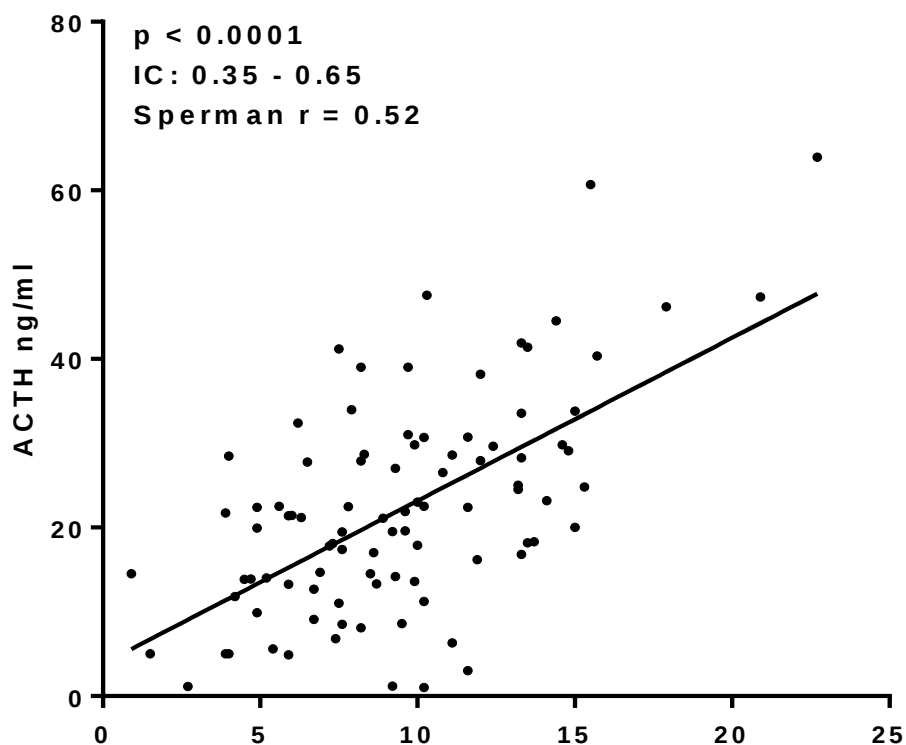


Gráfico 1. ACTH e Cortisol em pacientes que apresentaram episódio reacional no diagnóstico da hanseníase. Correlação de Sperman entre as concentrações séricas de ACTH e Cortisol dos pacientes com episódio reacional antes do tratamento com da PQT. Os soros dos pacientes foram coletados em laboratório certificado e colaborador da pesquisa, até as 8:00 da manhã. As concentrações dos hormônios foram analisadas pelo método de quimioluminescência. Para análise estatística foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

As concentrações do hormônios IGF-1 foi analisada nos soros dos pacientes com hanseníase bem como dos controles. As concentrações de IGF-1 estavam mais elevadas nos CCS ($8,4 \pm 5,1$ ng/ml) do que nos pacientes PB ($4,1 \pm 4,3$ ng/ml; $p = 0,02$) e MB ($4,09 \pm 6,5$ ng/ml; $p = 0,003$; **Figura 5A**).

Ao estratificar por forma clínica observou-se concentrações mais elevadas de IGF-1 nos pacientes HI ($6,5 \pm 6,4$ ng/ml) em relação às dos pacientes com as demais formas (HT $3,03 \pm 3,5$ ng/ml; HD $3,1 \pm 4,5$ ng/ml; HV $3,6 \pm 2,5$ ng/ml) sendo as diferenças significantes entre as formas HI e HT ($p = 0,02$) e HI e HD ($p = 0,02$). Já os CCS, por sua vez, apresentaram valores de IGF-1 mais elevados que qualquer forma da hanseníase (8,4 $\pm$ 5,1 ng/ml), sendo as diferenças significantes entre CCS e as formas HT ($p = 0,002$), HD ($p = 0,008$) e HV ($p = 0,001$) **Figura 5B**.

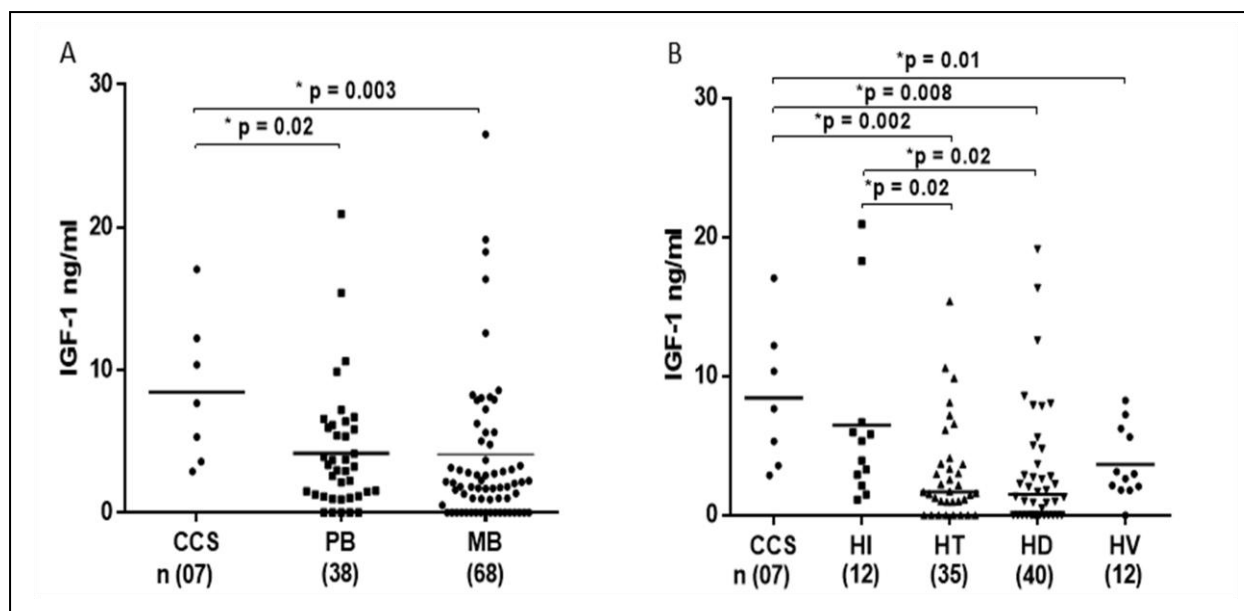


Figura 5. IGF-1 em controles contactantes sadios (CCS) e pacientes com hanseníase de acordo com a classificação operacional e forma clínica. Concentrações séricas de IGF-1 (A) em CCS e pacientes paucibacilares (PB) e multibacilares (MB); IGF-1 (B) em pacientes classificados de acordo com as formas clínicas da hanseníase (HI, HT, HD e HV) e CCS. Os soros dos pacientes foram coletados em laboratório certificado e colaborador da pesquisa até as 8:00 da manhã. As concentrações hormonais foram analisadas pelo método de quimioluminescência e apresentados em ng/ml. Os valores de IGF-1 foram corrigidos pela mediana de idade. Para análise estatística foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

Mais uma vez foram avaliadas as concentrações hormonais em relação às complicações da hanseníase (epísódio reacional e incapacidade física). Não foram encontradas diferenças entre as concentrações de IGF-1 antes do tratamento, entre os pacientes com e sem episódios reacionais antes do tratamento (**Figura 6A**). Ademais quando avaliado o hormônio em pacientes que evoluíram com episódios reacionais, durante ou após a conclusão do tratamento, foram observadas concentrações mais baixas de IGF-1 nos pacientes que apresentaram reação

hansênica ($2,8 \pm 1,6$ ng/ml) em comparação aos que não apresentaram reação ($4,2 \pm 2,8$ ng/ml; $p = 0,04$), **Figura 6B**. Em relação à presença de incapacidade física (GIF 1 e 2) o IGF-1 também encontrou-se mais baixo em pacientes com incapacidade ($2,8 \pm 1,6$ ng/ml), em relação àqueles sem GIF ($4,5 \pm 2,7$ ng/ml; $p = 0,007$ **Figura 6C**).

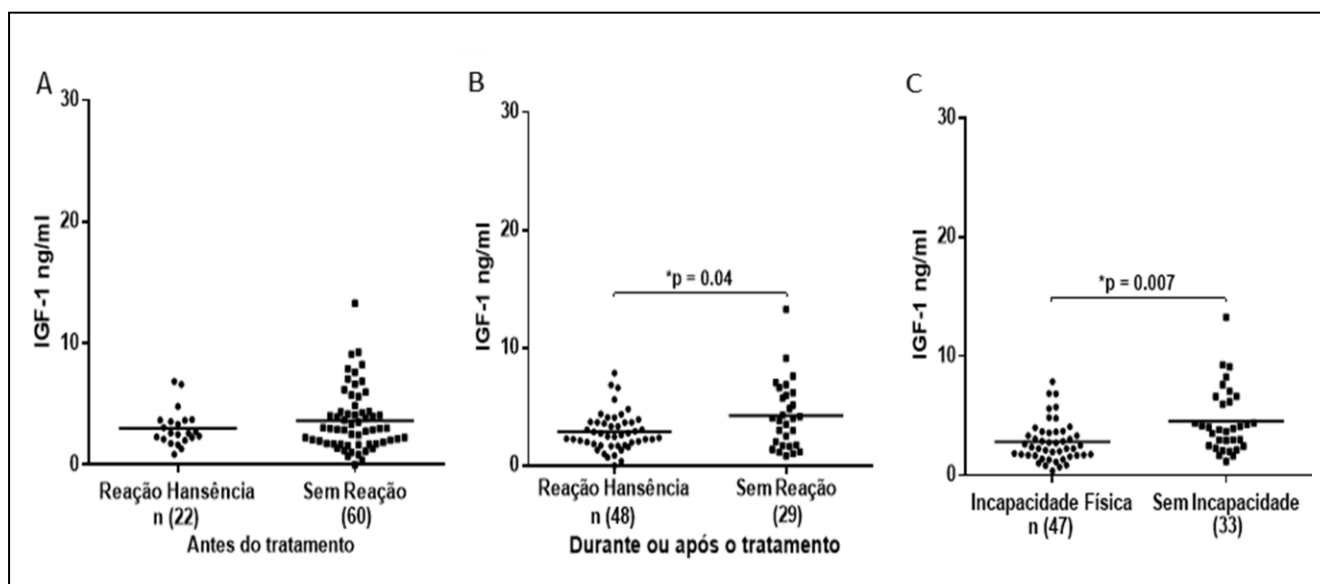


Figura 6. IGF-1 em pacientes com hanseníase de acordo com a ocorrência de episódios reacionais e incapacidade física. Concentrações séricas de IGF-1(A) em pacientes com e sem reação antes do tratamento; IGF-1(B) em pacientes com e sem reação durante ou após o tratamento e IGF-1(C) em pacientes com e sem incapacidade física (GIF 1 ou 2). Os soros dos pacientes foram coletados em laboratório certificado e colaborador da pesquisa até as 8:00 da manhã. As concentrações hormonais foram analisadas pelo método de quimioluminescência e apresentados em ng/ml. Os valores de IGF-1 foram corrigidos pela mediana da idade. Para análise estatística foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

As concentrações séricas de testosterona também foram avaliadas nos controles e pacientes. Concentrações mais elevadas desse hormônio foram encontradas nos homens com as formas MB ($6,13 \pm 2,7$ ng/ml) quando comparados aos PB ($4,12 \pm 1,9$ ng/ml; $p = 0,009$) e aos CCS ($4,36 \pm 1,01$; $p = 0,04$; **Figura 7A**). De maneira semelhante, quando os pacientes foram separados de acordo com suas formas clínicas, concentrações mais elevadas de testosterona foram encontradas numa das formas mais graves da doença (HD $6,17 \pm 2,6$ ng/ml) quando comparadas com às dos homens com a forma HT ($p = 0,04$) e com às dos CCS ($p = 0,04$; **Figura 7B**). Em virtude da redução nos níveis de testosterona após os 50 anos, optou-se por realizar análises separando esses grupos de homens com idade ≤ 50 anos e > 50 anos, de acordo

com a classificação operacional. Foram detectadas concentrações mais elevadas de testosterona em homens abaixo de 50 anos com as formas MB ($6,58 \pm 3,2$ ng/ml) quando comparado aos homens com formas PB ($4,21 \pm 2,3$ ng/ml; $p = 0,04$) ou os CCS ($4,26 \pm 0,8$ ng/ml; $p = 0,04$, **Figura 7C**). Quando avaliado os homens maiores de 50 anos, não foram observadas diferenças entre os grupos PB e MB (**Figura 7D**).

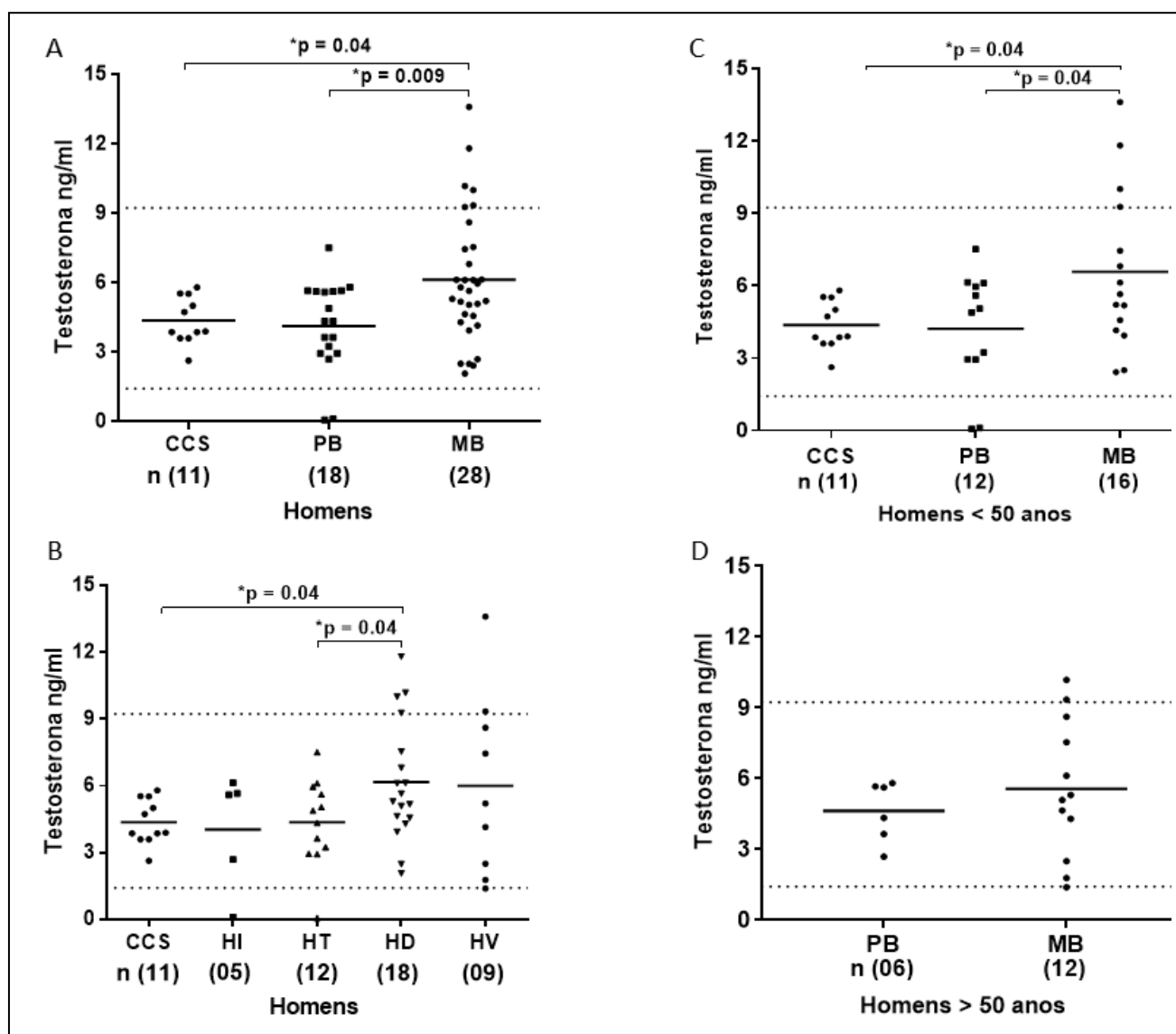


Figura 7. Testosterona em homens controles contactantes sadios (CCS) e pacientes com hanseníase de acordo com a classificação operacional e forma clínica. Concentrações de séricas de testosterona foram comparadas em homens CCS e com as formas paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) (A); e homens CCS e pacientes classificados de acordo com as formas clínicas (HI, HT, HD e HV), determinada pela histopatologia (B); e em homens PB e MB separados em grupos de menores que 50 anos (C) e maiores que 50 anos (D). Os soros dos pacientes foram coletados em laboratório certificado e colaborador da pesquisa, até as 8:00 da manhã. As concentrações dos hormonais foram analisadas pelo método de quimioluminescência. As linhas pontilhadas no gráfico indicam limites de normalidade. Para análise estatística foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

5.2 Avaliação de marcadores imunológicos associados às formas clínicas e complicações da hanseníase.

A tabela 2 descreve as variáveis clínicas e demográficas dos pacientes e CCS que possuíram dosagem citocinas. Foi possível observar que os paciente PB apresentaram média de idade mais alta ($49,61 \pm 18,95$) quando comparado com os pacientes MB ($43,57 \pm 15,94$) e os CCS ($46,87 \pm 14,51$; $p=0,43$), porém, sem diferença estatística ($p= 0,43$). Os homens apresentaram maior frequência das formas MB (57,2%) quando comparado com as formas PB (26,1%; $p<0,04$) com presença de altas cargas bacilares (35,7%). A presença de reação hansênica foi mais frequente nas formas MB (71,4%) quando comparada às formas PB (17,4%; $p<0,0002$). Similarmente a presença de incapacidade física foi maior nos pacientes MB (60,7%) que nos pacientes PB (30,4%; $p=0,04$).

Tabela 2. Variáveis demográficas e clínicas dos pacientes paucibacilares e multibacilares e dos controles contactantes sadios que participaram das dosagens de citocinas.

Variáveis		PB (n = 23)	MB (n = 28)	CCS (n = 23)	p
Idade	Variação	11-81	10-68	20-72	
	Média $\pm$ DP	49,61 $\pm$ 18.95	43,57 $\pm$ 15,94	46,87 $\pm$ 14,51	*0,43
Homem	n (%)	6 (26,1%) ^a	16 (57,2%) ^b	10 (43,5%)	**0,04 ^{ab}
Baciloscopia positiva	n (%)	0	10 (35,7%)	NA	-
Reação hansênica	n (%)	4 (17,4%)	20 (71,4%)	NA	**0,0002
Grau de incapacidade física	n (%)	7 (30,4%)	17 (60,7%)	NA	**0,04

MB (multibacilares); PB (paucibacilares); CCS (controle contactante sadio); DP (desvio padrão); NA (não se aplica) * Teste: Kruskal-Wallis; ** Teste: Exato de Fisher; $p< 0,005$; ab: valor de p referente a correlação entre os pacientes multibacilares e paucibacilares.

Com o objetivo de avaliar marcadores imunológicos relacionados à apresentação e às complicações clínicas da hanseníase foram dosadas as concentrações séricas das citocinas (INF- γ , IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-10 e TNF- α) e comparadas entre as diversas formas de apresentação clínica e entre os pacientes com e sem complicações da doença. Referente aos dados das citocinas envolvidas na resposta imune Th1 (INF- γ e IL-12p70), foram observadas concentrações mais elevadas de INF- γ na forma clínica HT ($83,16 \pm 45,03$ pg/ml), quando comparadas com as detectadas em CCS ($79,02 \pm 26,9$ pg/ml, $p = 0,002$). No entanto, nós observamos também concentrações mais elevadas de INF- γ na forma clínica HV ($79,02 \pm 26,9$ pg/ml, $p < 0,05$) quando comparadas às dos pacientes com as demais formas clínicas e com os CCS (Figura 8A). Em relação às concentrações de IL-12p70, foram mais elevadas em pacientes com HI ($71,2 \pm 18,8$ pg/ml, $p = 0,02$) e HT ($63,7 \pm 9,5$ pg/ml, $p = 0,04$) quando comparadas às dos pacientes com a forma HV ($57,4 \pm 7,07$ pg/ml; **Figura 8B**).

Uma vez que alguns estudos reportaram o papel protetor da resposta Th17 nas infecções intracelulares, assim como na hanseníase, nós dosamos também as concentrações séricas das citocinas IL-17A e IL-1 β (citocinas da resposta Th17) nos pacientes e controles contactantes. Em relação à IL-17A, os pacientes com HT apresentaram concentrações mais elevadas ($49,2 \pm 10,5$ pg/ml) quando comparadas às de pacientes com HV ($40,7 \pm 4,6$ pg/ml, $p = 0,01$), com HD ($38,2 \pm 10,1$ pg/ml, $p = 0,008$) e com os CCS ($37,2 \pm 6,8$ pg/ml, $p = 0,0003$; **Figura 8C**). Em relação às concentrações de IL-1 β , citocina envolvida na formação do inflamassoma, foram observados valores mais elevados nas formas HI ($62,9 \pm 16,3$ pg/ml) e HT ($61,7 \pm 12,2$ pg/ml) quando comparados à forma HD ($49,9 \pm 9,3$ pg/ml; $p = 0,01$ e $p = 0,004$, respectivamente) e aos valores dos CCS ($54,6 \pm 21,7$ pg/ml; $p = 0,04$ e $p = 0,002$, respectivamente; **Figura 8D**).

Também foram avaliadas as concentrações séricas de IL-10, citocina envolvida com respostas anti-inflamatórias orquestradas pelas células Treg. Os valores mais elevados da IL-10 foram observados nos pacientes com HV ($156,4 \pm 53$ pg/ml; **Figura 8E**) quando comparados com os das demais formas clínicas: HI ($105,9 \pm 23,5$ pg/ml, $p = 0,008$), HT ($121,6 \pm 34,3$ pg/ml, $p = 0,03$), HD ($115,6 \pm 38,7$ pg/ml, $p = 0,02$) e CCS ($112 \pm 44,8$ pg/ml, $p = 0,001$). Similarmente, valores mais elevados de TNF- α foram detectados nos pacientes com a forma HV ($463,3 \pm 160,6$ pg/ml; **Figura 8F**), quando comparados com às demais formas clínicas: HI ($304 \pm 85,5$ pg/ml, $p = 0,008$), HT ($298,6 \pm 78,02$ pg/ml, $p = 0,001$), HD ($341,9 \pm 81,8$ pg/ml, $p = 0,01$) e seus CCS ($296,1 \pm 60,1$ pg/ml, $p = 0,0008$).

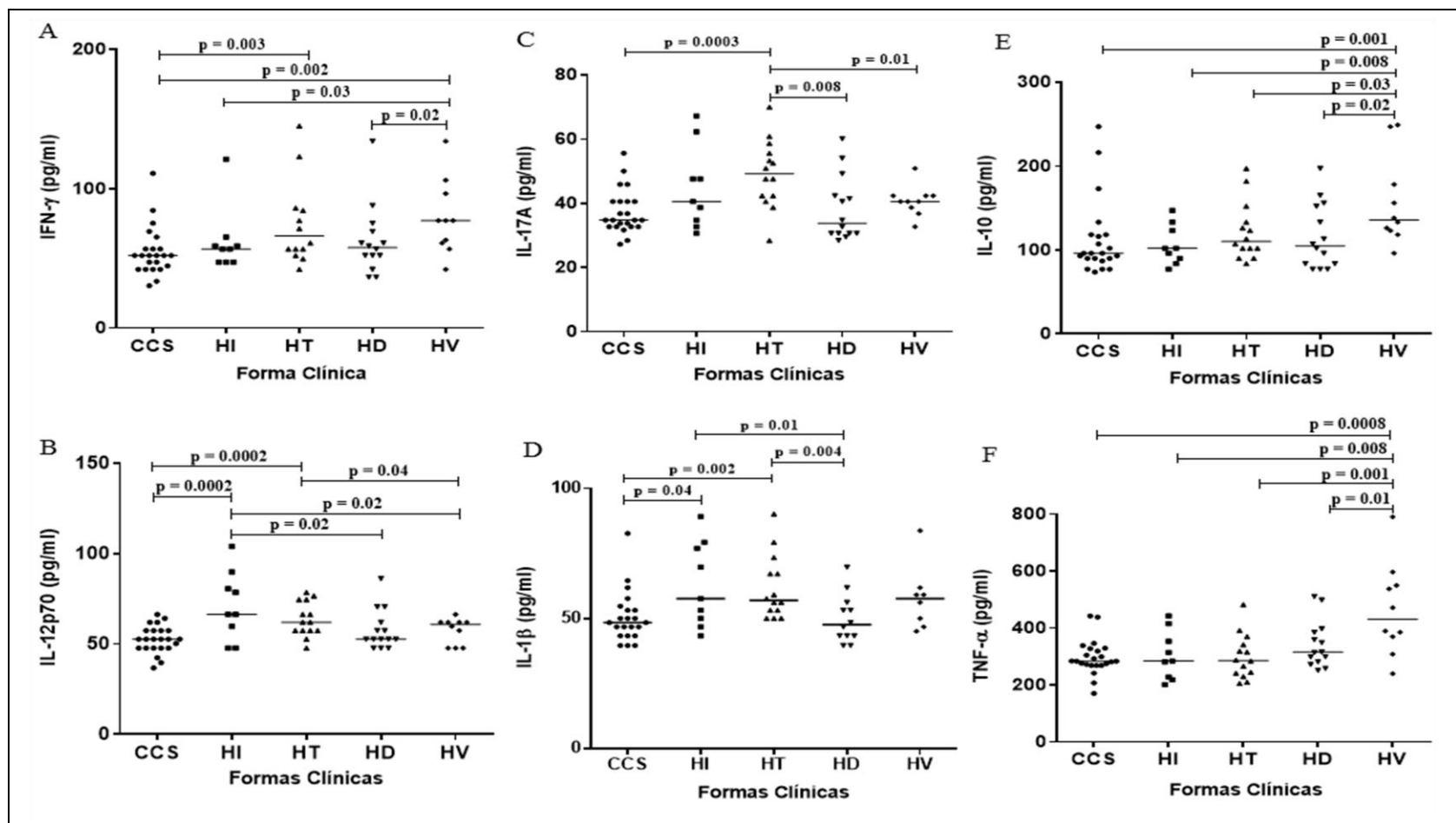


Figura 8. Concentrações de citocinas em controles contactantes sadios (CCS) e pacientes com hanseníase de acordo com suas formas clínicas. Concentrações séricas de INF- γ (A), IL-12p70 (B), IL-17A (C), IL-1 β (D), IL-10 (E) e TNF- α (F) foram comparadas em CCS e pacientes classificados de acordo com as formas clínicas (HI, HT, HD e HV), determinadas por histopatologia. As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ensaio Luminex. Os dados foram considerados com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando o valor de $p < 0,05$.

Posteriormente, foi associado os valores das dosagens de citocinas com a ocorrência ou não de episódios reacionais, nos pacientes que apresentaram a forma MB (identificados no momento do diagnóstico da doença e antes do início do tratamento). Foram encontradas concentrações mais elevadas de INF- γ ($97,1 \pm 44,5$ pg/ml, $p= 0,02$; **Figura 9A**) e TNF- α ($407,3 \pm 82,08$ pg/ml, $p= 0.04$; **Figura 9F**) nos pacientes MB com reação hansênica, quando comparados com os valores de INF- γ ($58,3 \pm 17,05$ pg/ml) e TNF- α ($333,3 \pm 102$ pg/ml) nos pacientes sem reação. Não foram observadas diferenças significativas nos valores das demais citocinas avaliadas (**Figura 9B-E**).

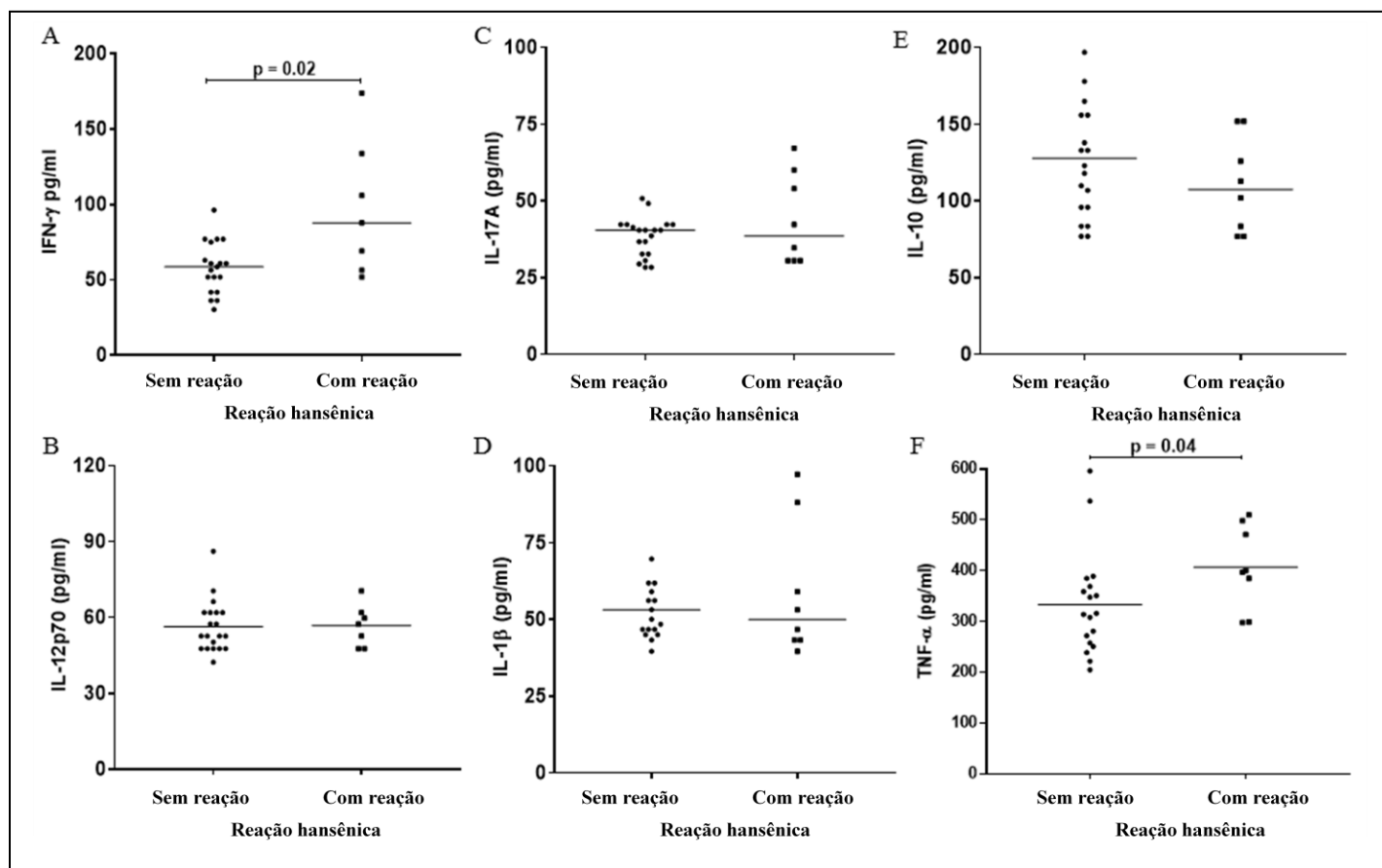


Figura 9. Concentrações séricas de citocinas em pacientes com hanseníase multibacilar (MB) de acordo com a ocorrência de reações hansênicas. Concentrações de INF- γ (A), IL-12p70 (B), IL-17A (C), IL-1 β (D), IL-10 (E) e TNF- α (F) em pacientes MB com quadro clínico de reação hansênica e sem reação hansênica. As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ensaio Luminex. Os dados foram considerados com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando o valor de $p < 0,05$.

Por fim, os valores das citocinas foram associados com a presença ou não de GIF. As lesões neurológicas na hanseníase podem levar ao desenvolvimento de incapacidade nos pacientes e isso pode limitar a realização de atividades de vida diárias. Para tanto, os pacientes que apresentaram GIF 1 ou 2 foram considerados com incapacidade física sendo comparados com os pacientes com GIF 0, ou seja, que não apresentam lesão aparente em nervo periférico no momento do diagnóstico. Foram observadas concentrações mais elevadas de TNF- α nos pacientes que apresentaram grau de incapacidade física ($354,3 \pm 92,2$ pg/ml, $p= 0,04$; **Figura 10F**), quando comparadas com as dos pacientes que não apresentavam GIF ($316,2 \pm 102,5$ pg/ml). Nas demais citocinas avaliadas (INF- γ , IL-12p70, IL-17A, IL1- β e IL-10) não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figuras 10A-E).

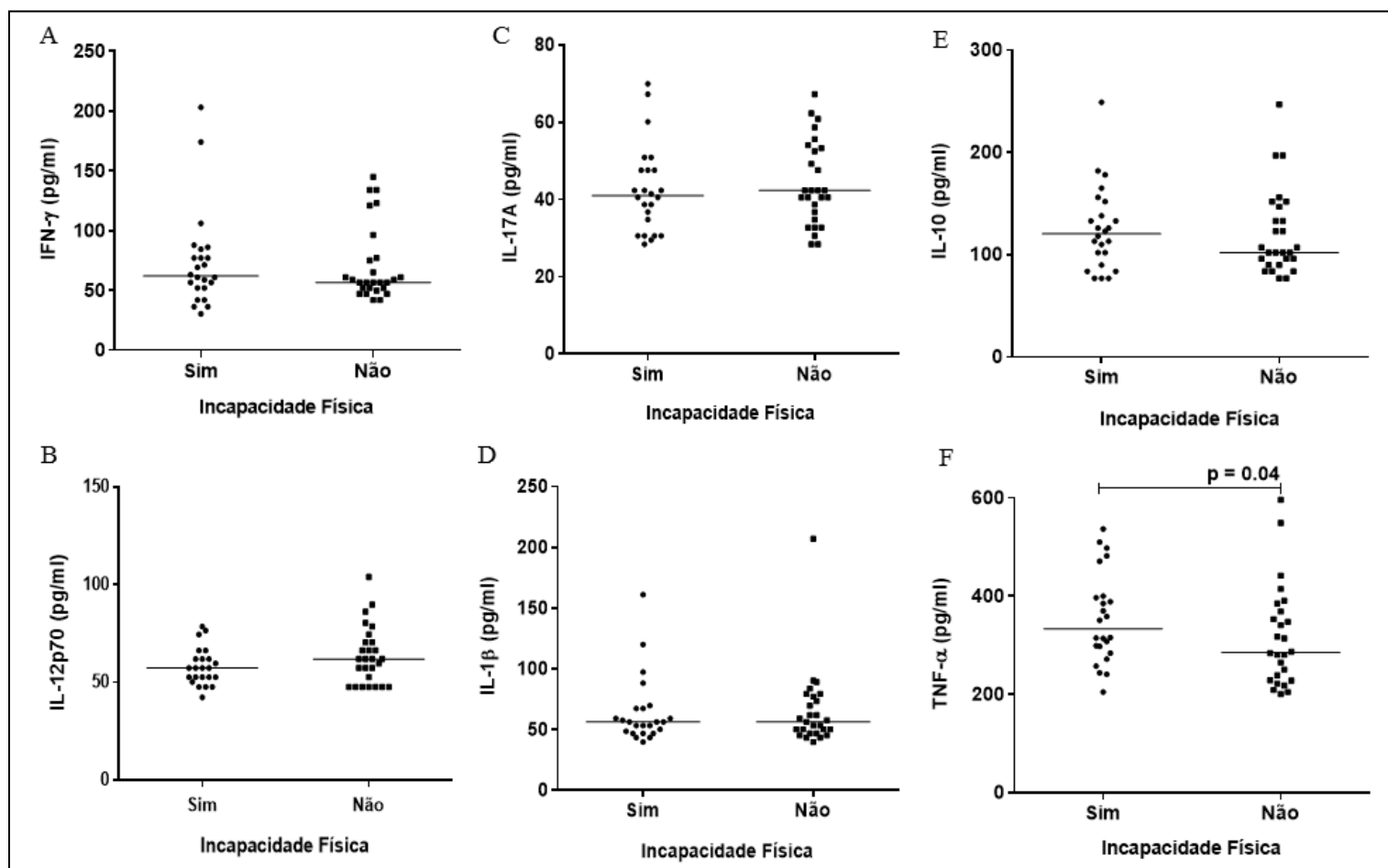


Figura 10. Citocinas em pacientes com hanseníase de acordo com a ocorrência de incapacidade física. Concentrações séricas de INF- γ (A), IL-12p70 (B), IL-17A (C), IL-1 β (D), IL-10 (E) e TNF- α (F) em pacientes segregados de acordo com o grau de incapacidade física (grau 1 ou 2) ou sem grau de incapacidade física (grau 0) definido pelo exame de avaliação neurológica simplificada. As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ensaio Luminex. Os dados foram considerados com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando o valor de $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa cuja apresentação clínica está associada à resposta imune à infecção. Embora seja importante controlar o patógeno, a indução de uma forte resposta inflamatória também pode estar envolvida com as complicações mais graves da doença que são a ocorrência de episódios reacionais e incapacidade física (Duthie, Saunderson e Reed, 2012; Rodrigues e Lockwood, 2011; Simon *et al.*, 2011). Como diversos hormônios estão envolvidos na modulação da resposta imune, a doença é um modelo especialmente atraente para o estudo de interações neuroimunoendócrinas.

A literatura relata a presença de alterações hormonais observadas em várias doenças incluindo as causadas por patógenos intracelulares, tais como: leishmaniose (Baccan *et al.*, 2011b), tuberculose (Fernández *et al.*, 2016) e hanseníase (Kumar *et al.*, 2015). Na hanseníase, distúrbios endócrinos ocultos foram encontrados em alguns pacientes quando comparados aos controles. Ao tratar sobre níveis hormonais, pesquisas relatam que o cortisol e GH são significativamente menores nos pacientes com hanseníase do que nos controles (Chaitanya *et al.*, 2013). No entanto, estes estudos não analisaram a associação dos níveis hormonais com o desfecho clínico. O presente estudo traz uma nova perspectiva sobre a compreensão da influência de hormônios como cortisol, IGF-1 e testosterona no desfecho clínico da hanseníase, avaliando, também, hormônios hipofisários que funcionam como reguladores e variáveis imunológicas relacionadas com a evolução da doença.

A gravidade da hanseníase está relacionada às formas MB, presença de reações hansênicas e incapacidade física. Os pacientes MB, particularmente as formas HV, têm uma maior frequência de reações hansênicas e estes são os mais acometidos por neurite e lesões neurológicas periféricas na doença (Monteiro *et al.*, 2015). Além disso, a incapacidade física no diagnóstico tem sido descrita como a principal causa de sequelas (Monteiro *et al.*, 2015; Paula Lima, De *et al.*, 2016). No presente estudo, confirmamos esses dados e observamos uma associação entre as formas MB com o sexo masculino, presença de reações hansênicas e incapacidade física.

A disfunção endócrina é muitas vezes silenciosa e ausente em pacientes com hanseníase (Kumar *et al.*, 2015). De todos os eixos endócrinos, o eixo HPA tem sido o mais amplamente avaliado pois regula a secreção de glicocorticóides, hormônios endógenos com potentes

propriedades anti-inflamatórias (Licinio e Frost, 2000). O cortisol é um hormônio corticosteróide envolvido na resposta ao estresse. Tem efeitos anti-inflamatórios sobre fagócitos, além do efeito imunossupressor em células T (Leal e Foss, 2009). Na população do referido estudo foram encontrados níveis mais baixos relacionados às formas graves (MB) da doença, embora todos os pacientes tenham produção de cortisol dentro da ampla faixa de normalidade. Estudos com indução de esteróides em transtornos crônicos em indivíduos saudáveis observaram que poderia ocorrer diminuição da capacidade de reserva adrenocortical (Rolak *et al.*, 2005). A regulação neuroendócrina, também foi observada em outras doenças infecciosas crônicas semelhantes como a leishmaniose cutânea (Baccan *et al.*, 2011b).

O presente estudo avaliou, além do cortisol, os níveis plasmáticos de ACTH, a fim de justificar seus resultados embasados na regulação do eixo HPA. Foram encontrados níveis plasmáticos de ACTH e cortisol dentro do padrão de normalidade, mas significativamente menores na presença de episódios reacionais. Em outro estudo, a insuficiência adrenal foi observada em 45,8% em pacientes com calazar (Lima Verde *et al.*, 2011). Os níveis plasmáticos de ACTH e cortisol dentro da faixa fisiológica não excluem necessariamente uma disfunção do eixo HPA, especialmente porque são observados em pacientes com doenças crônicas debilitantes, nos quais já se espera um aumento dos valores para essas hormônios.

O achado de concentrações mais baixas de ACTH e cortisol relacionados à presença de reação hansênica sugere que estas alterações resultam em uma resposta inflamatória sistêmica mais intensa, que pode estar envolvida com episódios de reação de hanseníase antes, durante e/ou após o tratamento. Esses dados indicam que o valor baixo de cortisol pode ser utilizado como biomarcador de risco de reação hansênica, possibilitando um tratamento preventivo destas com baixas doses de corticosteróides junto com o tratamento com a PQT. Similarmente ao presente resultado, Chaitanya *et al.* (2013) encontraram níveis mais baixos de cortisol em amostras de soro e urina de pacientes com reação tipo I. No entanto, este é um estudo transversal e os níveis mais baixos de cortisol não poderiam ser usados como biomarcadores para prever reações de hanseníase. No entanto, análises de um número maior de pacientes deve ser feita para definir melhor um valor de cortisol que possa ser utilizado como biomarcador, desde que os pacientes com reações hansênicas ainda apresentem os valores dentro da faixa de normalidade.

As reações da hanseníase são episódios inflamatórios agudos, sobrepostos ao curso crônico da doença, e responsáveis pela lesão nervosa irreversível (Scollard *et al.*, 2015).

Corticosteróides exógenos em doses elevadas são necessários para controlar a inflamação. O diagnóstico e tratamento precoce das reações hansênicas é uma estratégia eficaz para prevenir complicações mais graves da hanseníase. As diretrizes da OMS e MS sugerem a administração de 1 a 2 mg/kg de prednisona por dia durante pelo menos 30 dias para tratar as reações e evitar a incapacidade física (Oh *et al.*, 2016b; Oliveira, de *et al.*, 2013b). No entanto, o seu efeito a longo prazo no tratamento com corticosteróides é incerto (Veen, Van *et al.*, 2008). Oliveira, de *et al.* (2013) constataram que a persistência de incapacidade física após uso da PQT foi associada ao uso de subdosagem de corticosteróides.

Os efeitos dos corticosteróides em diferentes doses e duração para o tratamento da reação e comprometimento da função nervosa na hanseníase têm sido estudados extensivamente. Contudo, uma dose e uma duração eficaz de esteróides quando utilizados como agente profilático para lesão nervosa ainda não foram estabelecidas (Sahay, Kar e Gupta, 2015). O mecanismo de ação dos corticosteróides é principalmente através da supressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α . Os marcadores sorológicos podem ser detectados um mês antes do início clínico da reação e alguns permanecem elevados durante a reação Chaitanya *et al.* (2013).

O hormônio GH é produzido pelos somatótrofos da pituitária anterior e sua forma predominante corresponde a aproximadamente 75% do hormônio circulante. O GH é o principal indutor do IGF-1 e ambos têm efeitos sinérgicos no crescimento somático e efeitos complexos em várias funções corporais, incluindo a resposta imune. Os IGFs são hormônios peptídicos filogeneticamente bem preservados implicados no metabolismo, indução de proliferação, inibição da apoptose e diferenciação de diferentes tipos celulares. São produzidos na maioria dos órgãos e dos tecidos do corpo. Evidências da literatura revelam propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Martinelli Jr., Custódio e Aguiar-Oliveira, 2008b).

Na hanseníase, o presente estudo revelou que os níveis de IGF-1 foram reduzidos quando comparados aos controles saudáveis no momento do diagnóstico de hanseníase. Esses valores também foram menores nos pacientes com forma clínica HV, que é a população mais associada às reações hansênicas. Além disso, o estudo demonstra que os níveis mais baixos desse hormônio são preditivos da ocorrência de reações de hanseníase e incapacidade física.

Estudos prévios mostraram que a *Leishmania amazonensis*, também um patógeno intracelular, se beneficia do IGF-1 sugerindo que esse hormônio tem efeito imunossupressor em macrófagos (Gomes *et al.*, 2000; Sciences, 1998). Batista-Silva *et al.* (2016) também mostraram

que a infecção por *Mycobacterium leprae* induz a produção de IGF-1 e promove a sobrevivência das micobactérias no interior de macrófagos. Os dados do estudo estão de acordo com Rodrigues *et al.* (2011) que mostram níveis mais baixos de IGF-1 em pacientes com HV e também demonstram que o IGF-1 é menor durante os episódios de reações hansênicas. No entanto, enquanto nesse estudo eles coletaram o IGF-1 durante os episódios de reação, em nosso estudo, o hormônio foi coletado antes do tratamento e mostrou ser preditivo de reações e deficiências físicas.

Embora seja possível que o IGF-1 possa facilitar a persistência da infecção, também ajuda a prevenir a inflamação e os danos nos tecidos que causam as complicações da hanseníase. Além disso, foi demonstrado que o IGF-1 protege as células de Schwann da apoptose. Este hormônio contribuiria para a manutenção da homeostase dos tecidos durante a infecção retardando, assim, os efeitos inflamatórios nocivos sobre os nervos infectados (MacRae *et al.*, 2007).

Rodrigues *et al.* (2011) também descobriram que os níveis séricos de IGF-1 tendem a retornar ao normal após a conclusão da PQT sugerindo que a infecção está interferindo com a produção de IGF-1. Uma vez que um nível mais baixo de ACTH também foi detectado é possível que a infecção por *M. leprae* provoque uma disfunção geral na regulação central da produção hormonal. Esses dados precisam ser confirmados, pela avaliação de outros hormônios do eixo hipotálamo-hipófise.

Outro dado interessante do presente estudo é a associação de níveis mais elevados de testosterona com as formas MB da hanseníase. Vários estudos têm demonstrado que as doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares são mais prevalentes em homens (Guerra-Silveira e Abad-Franch, 2013; MacRae *et al.*, 2007). Guerra-Silveira e Abad-Franch (2013) mostraram um claro predomínio de homens na incidência de tuberculose, leptospirose, meningite meningocócica e hepatite A e hanseníase. Enquanto alguns atribuem isso a uma maior exposição ambiental, existem evidências para uma explicação biológica (Manuscript e Hormones, 2009). Por exemplo, nos dados epidemiológicos da hanseníase, o número de homens e mulheres com a doença é equivalente, enquanto a frequência de indivíduos com formas MB da doença é maior no gênero masculino (Oh *et al.*, 2016b). Embora se possa ainda argumentar que isso pode ser devido a uma maior exposição inicial à infecção, este fato provavelmente causaria uma diferença também no número total de infectados entre homens e mulheres.

Na infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* existem dados muito convincentes que demonstram a base biológica das diferenças de sexo na gravidade da doença de camundongos. Pinzan *et al.* (2010) observaram que os camundongos fêmeas têm doença menos grave e que suas células do baço produzem altas concentrações de citocinas Th1 e expressão de T-bet quando estimuladas com antígeno PARACOC, um componente antigênico de *P. brasiliensis*. Em contraste, os ratos machos têm uma doença mais grave e as células do baço produzem níveis mais elevados das citocinas Th2 e expressam GATA-3. Alguns estudos mostram os efeitos do estradiol na inibição do crescimento de *P. brasiliensis* e uma tendência de maior resistência do hospedeiro não-específico no sexo feminino do que no masculino (Loose *et al.*, 1983; Restrepo *et al.*, 1984; Salazar, Restrepo e Stevens, 1988). Adicionalmente, existem dados que mostram o efeito supressor da testosterona em células imunes, tais como células dendríticas e macrófagos (Pinzan *et al.*, 2010; Teixeira, Silveira, da e França, de, 2010). Kumar *et al.* (2015) detectaram níveis mais baixos de testosterona em pacientes com hanseníase em relação aos controles, mas nesse estudo não associaram os níveis hormonais às formas MB e complicações da doença.

O dano nos nervos periféricos são considerados os sintomas mais relevantes da hanseníase. Esta lesão é exacerbada com o desenvolvimento de episódios reacionais e está correlacionada com a resposta imune do indivíduo contra o bacilo. A proporção de novos casos de incapacidade física, em 6,7% globalmente, indica atraso na detecção da hanseníase (Oliveira, de, 2012; Oh *et al.*, 2016b). O *M. leprae* é o único bacilo conhecido que invade os nervos periféricos e causa lesões destrutivas. As lesões ocorrem em longo prazo, especialmente em pacientes com as formas MB, e estão relacionadas com o acúmulo de bacilos nos nervos afetados e a resposta inflamatória à infecção. Apesar da comprovada eficácia da terapia multidrogas ao matar *M. leprae*, é lamentável que o tratamento seja iniciado com frequência após o dano do nervo ter começado seu curso (Rodrigues *et al.*, 2010; Teixeira, Silveira, da e França, de, 2010).

Barbieri *et al.* (2016) encontraram 40% de pacientes com incapacidade física num centro de referência durante uma avaliação. Esse atraso no diagnóstico pode refletir mais precisamente as dificuldades envolvidas no diagnóstico da hanseníase nas unidades de atenção primária na ausência de profissionais de saúde especializados ou testes laboratoriais para auxiliar no diagnóstico da doença e prever seu curso clínico. Isto é importante, especialmente porque, no momento do diagnóstico, muitos pacientes podem apresentar uma ligeira lesão do nervo ou uma lesão assintomática da pele, o que complica ainda mais o diagnóstico precoce e a suspeita de um

mau resultado clínico. O sucesso do programa de controle da hanseníase para controlar a transmissão da doença e também as deficiências físicas depende do advento de novas ferramentas que aumentem a precisão diagnóstica a exemplo dos biomarcadores da gravidade da doença para a hanseníase.

Além disso, há uma busca constante pelo entendimento da resposta imune envolvida na resistência e patogênese da doença, pois isto poderá trazer formas de imunoterapia e pode guiar o desenvolvimento de vacinas, para induzir uma resposta protetora, mas que não seja indutora das complicações da doença.

A fim de utilizar marcadores imunológicos para predição de complicações da hanseníase foram analisadas citocinas, envolvidas em respostas inflamatórias, que podem servir como marcadores de apresentação clínica da doença. As formas clínicas da hanseníase apresentam espectro que reflete a resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*, fornece um modelo ideal para estudar a interação do patógeno hospedeiro e a desregulação imunológica em humanos, porque cada manifestação clínica está associada a diferentes níveis de respostas imunológicas ao *M. leprae* (Tarique et al., 2017).

Estudos anteriores relataram a influência das respostas Th1, Th2 e Treg na apresentação clínica da hanseníase. A participação de Th17 é, relativamente, recente e já demonstra uma resposta protetora quando observado aumento de IL-17 e IL-1 β nos pacientes com a forma tuberculóide da doença. IL-1 β regula a polarização de Th17 e sua interação com IL-23 amplifica as respostas de Th17 (Sadhu *et al.*, 2016). Com ação pró-inflamatória, a família IL-1, nomeadamente, IL-1 β e IL-18 têm papéis muito importantes na defesa antimicrobiana do hospedeiro. Defeitos encontrados nessa relação, por exemplo, podem apresentar um risco aumentado de infecção por micobactéria e salmonela (Netea *et al.*, 2010). Nesse estudo foi verificado níveis elevados de IL-1 β em pacientes PB (HI e HT), quando comparados aos MB e controles. Portanto, sugere-se que essas citocinas possam contribuir para o controle da infecção por *M. Leprae*.

Nos resultados do estudo também corroboram a associação de IFN- γ e IL-12p70, que regulam a diferenciação da resposta Th1, com as formas PB de hanseníase e mostram que há uma correlação entre IL-17A e IFN- γ . Em consonância com isso, observamos mais células que expressam IFN- γ nas lesões de pacientes HT do que em lesões de pacientes HL. Estes dados suportam o argumento de que as respostas Th1 e Th17 interagem para ajudar a controlar a

proliferação e disseminação de *M. leprae*. Okada *et al.*, 2015 descreveram uma imunodeficiência associada a susceptibilidade a candidíase e micobactérias. Nesta situação há também comprometimento da produção de IFN- γ , sendo argumentado que as predições à candidíase seria pelo defeito na produção de IL-17 e a predisposição à infecções por micobactérias pela pelo defeito na produção de IFN- γ . No entanto, acreditamos que é possível que a resposta Th17 seja também protetora contra a infecções por micobactérias, como foi demonstrado em outras doenças por agentes intracelulares (Pitta *et al.*, 2009).

Observamos que os pacientes MB com reação hansênica apresentaram concentrações mais elevadas de IFN- γ do que os pacientes MB que não apresentaram reações hansênicas. Esses dados sugerem que pacientes que respondem com altos níveis de IFN- γ desenvolvem resposta inflamatória exacerbada e progressão para formas clínicas agressivas de hanseníase. Isto reforça a observação de que existe uma necessidade de respostas pró e anti-inflamatórias equilibradas na hanseníase, semelhante às observações em outras doenças infecciosas como a leishmaniose mucosa (Stober *et al.*, 2005). No entanto, não observamos diferenças nos níveis de IL-17 entre MB com reação hansênica e MB sem reação hansênica, indicando que Th17 não contribui para o desequilíbrio imunológico durante os episódios reacionais.

A presença de episódios reacionais são o maior exemplo de interação entre a carga bacilar e a resposta imune do hospedeiro. Evidências apontam que o surgimento da reação do tipo I ocorre por aumento abrupto da imunidade mediada por células. Envolve a participação ativa de linfócitos T, com produção tecidual de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . Essa última é considerada uma das principais citocinas envolvidas no dano neural (Mendonça *et al.*, 2008). No presente estudo foi possível observar a associação entre as formas mais graves da hanseníase, presença de episódio reacional e incapacidade física nos pacientes que apresentavam TNF- α e IFN- γ aumentados. Ao considerar o processo inflamatório a quantidade aumentada pode ser mais prejudicial do que protetora. O TNF- α é um componentes essenciais da defesa do hospedeiro demonstrado pelas importantes complicações infecciosas em pacientes tratados com agentes biológicos. Evidências apontam a importância do IFN- γ na reação inflamatória diante da tuberculose e na associação entre tuberculose e diabetes tipo 2 (Fernández *et al.*, 2016). No entanto, concentrações muito elevadas dessas citocinas pode levar a danos teciduais, que no caso da hanseníase podem ser irreversíveis, por ser em nervos periféricos.

Por fim no estudo também houve um aumento da IL-10 relacionado às formas de alta carga bacilar (HV). Esta possui uma atividade imunomoduladora importante que regula, principalmente, a secreção de anticorpos e inflamação que caso sustentada poderia provocar lesão tecidual em doenças crônicas. A IL-10 inibe a resposta Th1 e diversas funções microbidas de macrófagos, favorecendo a replicação de agentes intracelulares. Na hanseníase, a produção sustentada de IL-10 aumenta a fagocitose em macrófagos e favorece a penetração do *M. leprae* que depende do meio intracelular para sua sobrevivência. Além disso, a citocina determina uma programação antimicrobiana permissiva nos macrófagos com redução de mecanismos antimicrobianos mediados pela vitamina D/catelicidina, da produção de IL-15 e ativação da expressão de CD163, que ajuda na captação do complexo haptoglobina e leva a replicação intracelular de *M. Leprae* (Alvarado-Arnez *et al.*, 2015).

7. CONCLUSÃO

1. As alterações hormonais encontradas suportam a hipótese de que a interação entre a hanseníase e os sistemas neuroendócrinos desempenhe um papel importante no curso natural da infecção pelo *M. Leprae*.
2. A associação entre concentrações reduzidas de cortisol e presença de episódio reacional, no diagnóstico e na evolução do paciente, sugere que esse hormônio seja um importante modulador desse episódio inflamatório e dá suporte a uma tentativa de tratamento profilático com cortisol.
3. A associação entre concentrações reduzidas de IGF-1 com as complicações da hanseníase sugere que esse hormônio seja um importante modulador da agressão tecidual que ocorre na doença e dá suporte a estudos terapêuticos futuros.
4. A associação entre elevados de testosterona com pior resultado clínico além de sugerir a utilização desse hormônio como marcador clínico.
5. As citocinas IL-17 e IL1- β estão associadas à forma tuberculóide da hanseníase, o que sugere um efeito no controle da multiplicação do bacilo.
6. As citocinas IFN- γ e TNF- α , apesar de serem reconhecidas como ativadores da destruição de bacilos em macrófagos, foram associados à presença de reação hansênica, sugerindo um efeito deletério na lesão tecidual.
7. A demonstração de que TNF- α encontra-se elevado em pacientes com episódios reacionais, sugere que o tratamento com Talidomida, possa ser utilizada também no tratamento da reação tipo I, em associação com corticosteróide, a fim de minimizar as complicações desta.

8. PERSPECTIVAS

1. A avaliação das relações entre as concentrações hormonais e das citocinas relacionadas à modulação da resposta imune.
2. Realizar análise mais robustas do tipo multivariáveis, com um número maior de indivíduos, visando encontrar um conjunto de parâmetros clínicos e laboratoriais preditores de complicações da doença.
3. Determinar valores de cut off para indicar tratamento profilático com Cortisol e IGF-1 para reações hansênicas e lesão neurológica.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; PANDIT, L.; DALAL, M.; SHETTY, J. P. Neurological manifestations of Hansen ' s disease and their management. v. 107, p. 445–454, 2005.

AKDIS, M. *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 701–721, 2011.

ALTER, A.; ALCAÏS, A.; ABEL, L.; SCHURR, E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Human Genetics**, v. 123, n. 3, p. 227–235, 2008.

ALVARADO-ARNEZ, L. E.; AMARAL, E. P.; SALES-MARQUES, C.; DURÃES, S. M. B.; CARDOSO, C. C.; SARNO, E. N.; PACHECO, A. G.; LANA, F. C. F.; MORAES, M. O. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.

ANGELE, M. K.; AYALA, A.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Testosterone: the culprit for producing splenocyte immune depression after trauma hemorrhage. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. C1530-6, 1998.

ARACI, M.; PONTES, D. A.; PENNA, G. O. PP005 - Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referência na região. v. 80, n. Supl 3, p. 283–288, 2005.

ARAÚJO, M. G. Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–382, 2005.

BACCAN, G. C.; OLIVEIRA, F.; SOUSA, A. D.; CERQUEIRA, N. A.; COSTA, J. M. L.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 548–554, 2011a.

_____. Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 548–554, 2011b.

BARBIERI, R. R.; SALES, A. M.; HACKER, M. A.; NERY, J. A. DA C.; DUPPRE, N. C.; MACHADO, A. DE M.; MORAES, M. O.; SARNO, E. N. Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1–11, 2016.

BATISTA-SILVA, L. R. *et al.* Mycobacterium leprae-induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 27632, 2016.

BENTEN, W. P. M.; GUO, Z.; KRÜCKEN, J.; WUNDERLICH, F. Rapid effects of androgens

in macrophages. **Steroids**, v. 69, n. 8–9, p. 585–590, 2004.

BOTTASSO, O.; BAY, M. L.; BESEDOVSKY, H.; REY, A. DEL. Adverse neuro-immune-endocrine interactions in patients with active tuberculosis. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 53, p. 77–85, 2013.

BRAKEL, W. H. VAN; NICHOLLS, P. G.; WILDER-SMITH, E. P.; DAS, L.; BARKATAKI, P.; LOCKWOOD, D. N. J. Early diagnosis of neuropathy in leprosy - Comparing diagnostic tests in a large prospective study (the INFIR Cohort Study). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, 2008.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para o controle da hanseníasis**, 2010.

BURGLER, S.; OUAKED, N.; BASSIN, C.; BASINSKI, T. M.; MANTEL, P. Y.; SIEGMUND, K.; MEYER, N.; AKDIS, C. A.; SCHMIDT-WEBER, C. B. Differentiation and functional analysis of human TH17 cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 588–595.e7, 2009.

CHAITANYA, V. S.; LAVANIA, M.; NIGAM, A.; TURANKAR, R. P.; SINGH, I.; HORO, I.; SENGUPTA, U.; JADHAV, R. S. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. **Immunology Letters**, v. 156, n. 1–2, p. 159–167, 2013.

CHIARATTI, F. C.; DAXBACHER, E. L. R.; NEUMANN, A. B. F.; JEUNON, T. Type 2 leprosy reaction with Sweets syndrome-like presentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 3, p. 345–349, 2016.

COLEGIADA, D.; INTERNO, R.; FARMAC, I.; PR, B. **Ministério da Saúde**, 2010.

CURTO, M.; BARBOZA, D. B.; PASCHOAL, V. D. A. Avaliação da importância do diagnóstico e tratamento precoce da hanseníase em relação ao custo do tratamento. **Arq. ciênc. saúde**, v. 14, n. 3, p. 153–160, 2007.

DUTHIE, M. S.; SAUNDERSON, P.; REED, S. G. The potential for vaccination in leprosy elimination: New tools for targeted interventions. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 190–196, 2012.

FERNÁNDEZ, R.; DÍAZ, A.; D'ATTILIO, L.; BONGIOVANNI, B.; SANTUCCI, N.; BERTOLA, D.; BESEDOVSKY, H.; REY, A. DEL; BAY, M. L.; BOTTASSO, O. An adverse immune-endocrine profile in patients with tuberculosis and type 2 diabetes. **Tuberculosis**, v. 101, n. September, p. 95–101, 2016.

FONSECA, A. B. DE L.; SIMON, M. DO V.; CAZZANIGA, R. A.; MOURA, T. R. DE; ALMEIDA, R. P. DE; DUTHIE, M. S.; REED, S. G.; JESUS, A. R. DE. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 5, 2017.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 335–339, 1997.

FREITAS, L. R. S. *et al.* Trends of main indicators of leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001–2012. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 472, 2016.

FRIEDMAN, D.; NETTL, F.; SCHREIBER, A. D. Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 1, p. 162–167, 1985.

GARBINO, J. A. O paciente com suspeita de hanseníase primariamente neural. **Hansen Int**, v. 32, n. 2, p. 203–6, 2007.

GARCÍA-GÓMEZ, E. *et al.* Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. **BioMed research international**, v. 2013, p. 928290, 2013.

GOMES, C.; GOTO, H.; MATTA, V. L. R. DA; GIDLUND, M.; CORBETT, C. E. P. Insulin-like Growth Factor IGF-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. **International Journal**, v. 81, p. 249–255, 2000.

GOMES, F. G.; ANDREY, M.; FRADE, C.; FOSS, N. T. Úlceras cutâneas na hanseníase: perfil clínico-epidemiológico dos pacientes. v. 82, n. 5, p. 433–437, 2007.

GONÇALVES, S. D.; SAMPAIO, R. F.; ANTUNES, C. M. DE F. [Occurrence of neuritis among leprosy patients: survival analysis and predictive factors]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 464–469, 2008.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, 2002.

GUERRA-SILVEIRA, F.; ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

GULIA, A.; FRIED, I.; MASSONE, C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. **F1000 medicine reports**, v. 2, n. April, p. 1–5, 2010.

HUNGRIA, E. M.; BÜHRER-SÉKULA, S.; OLIVEIRA, R. M. DE; ADERALDO, L. C.; PONTES, A. DE A.; CRUZ, R.; GONÇALVES, H. DE S.; PENNA, M. L. F.; PENNA, G. O.; STEFANI, M. M. DE A. Leprosy reactions: The predictive value of *Mycobacterium leprae*-specific serology evaluated in a Brazilian cohort of leprosy patients (U-MDT/CT-BR). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005396, 2017.

I, J. C. L.; APARECIDA, M.; MORGADO, M.; II, D. A. Hanseníase : diagnóstico e tratamento. v. 17, n. 4, p. 5–8, 2012.

JOPLING, R. Y. Classification of Leprosy According to Immunity. **International Journal of leprosy**, v. 31, n. 3, p. 255–273, 1966.

KLEIN, S. L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 6–7, p. 247–264, 2004.

KUMAR, K. V. S.; SINGH, R.; BHASIN, R.; BISHT, Y. Endocrine dysfunction in patients of leprosy. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 369, 2015.

LANA, F. C.; AMARAL, E. P.; LANZA, F. M.; SALDANHA, A. N. Physical disabilities resulting from hansen's disease in Vale do Jequitinhonha/State of Minas Gerais, Brazil . **Rev.Lat.Am.Enfermagem.** , v. 16, n. 0104–1169 (Print), p. 993–997, 2008.

LEAL, Â. M. O.; FOSS, N. T. Endocrine dysfunction in leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 1–7, 2009.

LEAL, Â. M. O.; MAGALHÃES, P. K. R.; SOUZA, C. S.; FOSS, N. T. Pituitary-gonadal hormones and interleukin patterns in leprosy. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 9, p. 1416–1421, 2006.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: Pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1141–1148, 2000.

LIMA VERDE, F. A.; LIMA VERDE, F. A. A.; SABOIA NETO, A.; ALMEIDA, P. C.; LIMA VERDE, E. M. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 668–673, 2011.

LIVA, S. M.; VOSKUHL, R. R. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 2060–2067, 2001.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, S. Public Health Reviews Leprosy : too complex a disease for a simple elimination paradigm. v. 13730, n. 4, 2005.

LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 24, p. 7659–63, 1983.

MACRAE, V. E.; AHMED, S. F.; MUSHTAQ, T.; FARQUHARSON, C. IGF-I signalling in bone growth: Inhibitory actions of dexamethasone and IL-1 β **Growth Hormone and IGF Research**, v. 17, n. 5, p. 435–439, 2007.

MANUSCRIPT, A.; HORMONES, S. NIH Public Access. v. 16, n. 2, p. 106–113, 2009.

MARCOS TÚLIO, R.; MARIA INES BATTISTELLA, N. Assessment of integration of the

leprosy program into primary health care in Aracaju, state of Sergipe, Brazil / Avaliação da integração do programa de hanseníase na atenção primária em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 203, 2012.

MARTINELLI JR., C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 5, p. 717–725, 2008a.

_____. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 5, p. 717–725, 2008b.

MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular Control of Immune / Inflammatory Responses : Interactions Between Nuclear Factor- κ B and Steroid Receptor-Signaling Pathways. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 4, p. 435–459, 1999.

MEDLINEPLUS. Pituitary Gland. v. 88, n. March, p. 2274–2277, 2013.

MEMPEL, M.; FLAGEUL, B.; SUAREZ, F.; RNET, C.; DUBERTRET, L.; KOURILSKY, P.; GACHELIN, G.; MUSETTE, P. Comparison of the T Cell Patterns in Leprous and Cutaneous Sarcoid Granulomas. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 509–523, 2000.

MENDONÇA, V. A.; EUSTÁQUIO, G.; ALVIM, B.; TEIXEIRA, A. L.; COSTA, R. D.; ANTUNES, C. M. Imunologia da hanseníase *. v. 83, n. 4, p. 343–350, 2008.

MONTEIRO, L. D.; MARTINS-MELO, F. R.; BRITO, A. L.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Physical disabilities at diagnosis of leprosy in a hyperendemic area of Brazil : trends and associated factors. **Leprosy review**, v. 86, p. 240–250, 2015.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; VEERDONK, F. VAN DE; KULLBERG, B. J.; MEER, J. W. M. VAN DER; JOOSTEN, L. A. B. IL-1 β processing in host defense: Beyond the inflammasomes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.

NIEVES-BONILLA, J. M. **Sex Hormone**, [s.d.].

NOBRE, M. L.; ILLARRAMENDI, X.; DUPNIK, K. M.; HACKER, M. DE A.; NERY, J. A. DA C.; JERÔNIMO, S. M. B.; SARNO, E. N. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005364, 2017.

OH, D. H. *et al.* Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. v. 2009, n. 40, p. 461–468, 2016a.

_____. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. n. 40, p. 461–468, 2016b.

OLIVEIRA, D. T. DE; BEZERRA, M. M.; ALMEIDA, J. A. P. DE; DUTHIE, M.; REED, S.; JESUS, A. R. DE. Neurological disability in leprosy: Incidence and gender association in

Sergipe, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3 SUPPL., p. 125–129, 2012.

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

_____. Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 600–604, 2013b.

OLIVEIRA, M. L. W. DE. Impacto na qualidade de vida em pacientes com hanseníase: correlação do Dermatology Life Quality Index com diversas variáveis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 1, p. 39–43, 2008.

PAULA LIMA, P. O. DE; BEZERRA CUNHA, F. M.; GONCALVES, H. D. S.; PONTES AIRES, M. A.; FREITAS DE ALMEIDA, R. L.; FRANCO SANSIGOLO KERR, L. R. Correlation between clinical tests and electroneuromyography for the diagnosis of leprosy neuropathy. **Leprosy Review**, v. 87, n. 1, p. 60–70, 2016.

PINZAN, C. F.; RUAS, L. P.; CASABONA-FORTUNATO, A. S.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

PITTA, M. G. R. *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to *Paracoccidioidomycosis*. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.

RETTEW, J. A.; HUET-HUDSON, Y. M.; MARRIOTT, I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 3, p. 432–437, 2008.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England journal of medicine**, v. 353, p. 1711–1723, 2005.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464–470, 2011.

RODRIGUES, L. S.; HACKER, M. A.; ILLARRAMENDI, X.; PINHEIRO, M. F. M. C.; NERY, J. A. D. C.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C. V. Circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) correlate with disease status in leprosy. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 339, 2011.

RODRIGUES, L. S.; SILVA MAEDA, E. DA; MOREIRA, M. E. C.; TEMPONE, A. J.; LOBATO, L. S.; RIBEIRO-RESENDE, V. T.; ALVES, L.; ROSSLE, S.; LOPES, U. G.; PESSOLANI, M. C. V. Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 42–54, 2010.

ROLAK, R.; OZKAN, Y.; ONEN, S. E.; SARAL, Y.; HALFEOGLU, I. A comparison between the effects of low (1 microg) and standard dose (250 microg) acth stimulation tests on adrenal cortex functions with leprosy patients. **Endocr. Res.**, v. 31, n. 0743–5800 (Print), p. 325–333, 2005.

ROOK, G. A. W.; BAKER, R. Cortisol metabolism, cortisol sensitivity and the pathogenesis of leprosy reactions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 7, p. 493–498, 1999a.

____. Cortisol metabolism, cortisol sensitivity and the pathogenesis of leprosy reactions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 7, p. 493–498, 1999b.

SADHU, S.; KHAITAN, B. K.; JOSHI, B.; SENGUPTA, U.; NAUTIYAL, A. K.; MITRA, D. K. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.

SAHAY, G.; KAR, H. K.; GUPTA, R. Effect of steroid prophylaxis on nerve function impairment in multi-bacillary leprosy patients on MDT-MB. **Indian Journal of Leprosy**, v. 87, n. July-September, p. 133–143, 2015.

SAINI, C.; SIDDIQUI, A.; RAMESH, V.; NATH, I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2016.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 711–713, 1988.

SAMPAIO, L. H.; SOUSA, A. L. M.; BARCELOS, M. C.; REED, S. G.; STEFANI, M. M. A.; DUTHIE, M. S. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 7, p. 1443–1451, 2012.

SCHURING, R. P.; RICHARDUS, J. H.; STEYERBERG, E. W.; PAHAN, D.; FABER, W. R.; OSKAM, L. Preventing nerve function impairment in leprosy: Validation and updating of a prediction rule. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. 4–8, 2008.

SCIENCES, M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. v. 95, n. October, p. 13211–13216, 1998.

SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Leprosy review**, v. 79, n. 3, p. 242–

253, 2008.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. **The continuing challenges of leprosy**, v. 19, 2006.

SCOLLARD, D. M.; MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. A.; FATIMA MAROJA, M. DE; VILLAHERMOSA, L.; PARDILLO, F.; TAMANG, K. B. Risk factors for leprosy reactions in three endemic countries. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 108–114, 2015.

SILVA, S.; GRIEP, R. Reação hansênica em pacientes portadores de hanseníase em centros de saúde da Área de do Rio de Janeiro. **Hansenologia Internacionais**, v. 32, n. 2, p. 155–162, 2007.

SIMON, M.; SCHERLOCK, J.; DUTHIE, M. S.; RIBEIRO DE JESUS, A. Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 509–527, 2011.

SMITH, W. C. S.; NICHOLLS, P. G.; DAS, L.; BARKATAKI, P.; SUNEETHA, S.; SUNEETHA, L.; JADHAV, R.; SUNDAR RAO, P. S. S.; WILDER-SMITH, E. P.; LOCKWOOD, D. N. J.; BRAKEL, W. H. VAN. Predicting neuropathy and reactions in leprosy at diagnosis and before incident events - Results from the INFIR cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. 6–13, 2009.

SNIDER, H.; LEZAMA-DAVILA, C.; ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. **NeuroImmuno Modulation**, v. 16, n. 2, p. 106–113, 2009.

STOBER, C. B.; LANGE, U. G.; ROBERTS, M. T. M.; ALCAMI, A.; BLACKWELL, J. M. IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine Leishmania major Infection. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2517–2524, 2005.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 521–574, 2007.

TARIQUE, M.; SAINI, C.; NAQVI, R. A.; KHANNA, N.; SHARMA, A.; RAO, D. N. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3(+) regulatory T cells in human Leprosy. **Molecular immunology**, v. 83, p. 72–81, 2017.

TEIXEIRA, M. A. G.; SILVEIRA, V. M. DA; FRANÇA, E. R. DE. Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares, atendidos em dois centros de referência para hanseníase, na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 287–292, 2010.

TURANKAR, R. P.; LAVANIA, M.; SINGH, M.; SIVA, K. S. R.; JADHAV, R. S. Infection ,

Genetics and Evolution Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context : Deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 121–126, 2012.

VEEN, N. H. J. VAN; MCNAMEE, P.; RICHARDUS, J. H.; SMITH, W. C. S. Cost-effectiveness of interventions to prevent disability in leprosy: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009.

VEEN, N. VAN; NICHOLLS, P.; SMITH, W.; RICHARDUS, J. Corticosteroids for treatment of nerve damage in leprosy. A Cochrane review. **Leprosy review**, v. 79, n. 2, p. 361–371, 2008.

VENDRAME, C. M. V; CARVALHO, M. D. T.; RIOS, F. J. O.; MANULI, E. R.; PETITTO-ASSIS, F.; GOTO, H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 287–296, 2007.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Reações hansênicas do tipo 1 e eritema nodoso hansênico. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 1, p. 75–82, 2008.

WHO. **Estratégia Global Aprimorada para Redução Adicional da Carga da Hanseníase (Período do Plano: 2011-2015)**, 2011.

WILLIAMS, R. H. **Tratado de endocrinologia**. v. 5, 2012.

ANEXO I

FICHA DE AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA

Nome _____ DataNasc. ____/____/____
 Ocupação: _____ Sexo: M ☐ F ☐
 Município: _____ Unidade Federada: _____
 Classificação Operacional: PB ☐ MB ☐ Data Início PQT: ____/____/____ Data Alta PQT: ____/____/____

FACE	1ª	2ª	3ª
Nariz	D E	D E	D E
Queixa principal			
Ressecamento (S/N)			
Ferida (S/N)			
Perfuração de septo (S/N)			
Olhos	D E	D E	D E
Queixa principal			
Fecha olhos s/ força (mm)			
Fecha olhos c/ força (mm)			
Triquiasse(S/N) / Ectrópio(S/N)			
Dimin. sensib. córnea (S/N)			
Opacidade córnea (S/N)			
Catarata (S/N)			
Acuidade Visual			

Legenda: N = não S = Sim

Membros Superiores	1ª	2ª	3ª
Queixa principal			
Palpação de nervos	D E	D E	D E
Ulnar			
Mediano			
Radial			

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da Força	1ª	2ª	3ª
	D E	D E	D E
Abrir dedo mínimo			
Abdução do 5º dedo (nervo ulnar)			
Elevar o polegar			
Abdução do polegar (nervo mediano)			
Elevar o punho			
Extensão de punho (nervo radial)			

Legenda: F= Forte D=Diminuída P=Paralisado ou S= Forte, 4= Resistência Parcial, 3=Movimento completo, 2=Movimento Parcial, 1=Contração, 0=Paralisado

Inspeção e Avaliação Sensitiva

1ª	2ª	3ª
D E	D E	D E
		

Legenda: Caneta-filamento lúsis(2g): Sente ✓ Não sente X ou Monofilamentos: segurar cores

Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção: Ferida: 

MEMBROS INFERIORES	1*	/	/	2*	/	/	3*	/	/
Queixa principal									
Palpação de nervos	D		E	D		E	D		E
Fibular									
Tibial posterior									

Legenda: N = normal E = espessado D = dor C = choque

Avaliação da força	1*	/	/	2*	/	/	3*	/	/
	D		E	D		E	D		E
Elevar o hálux Extensão de hálux (nervo fibular) 									
Elevar o pé Dorsiflexão de pé (nervo fibular) 									

Legenda: F = Forte D=Diminuída P=Paralisado ou 5=Forte, 4=Resistência Parcial, 3=Movimento completo, 2=Movimento parcial, 1=Contração, 0=Paralisado

Inspeção e Avaliação Sensitiva

1*	/	/	2*	/	/	3*	/	/
D	E		D	E		D	E	
								

Legenda: Caneta filamento lilás (2g) Sente ✓ Não sente X ou Monofilamentos: seguir cores

Garras móveis: M Garras rígidas: R Reabsorção: /// Ferida: □

CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE (OMS)

DATA DA AVALIAÇÃO	OLHOS	MÃOS	PÉS	MAIOR GRAU	ASSINATURA
	D E	D E	D E		
Aval. diagnóstico / /					
Aval. de alta / /					

LEGENDA PARA PREENCHIMENTO DO GRAU DE INCAPACIDADES

GRAU	CARACTERÍSTICAS
0	Nenhum problema com os olhos, mãos e pés devido à Hansenise.
I	perda da sensibilidade nos olhos; perda da sensibilidade nas mãos e/ou pés. (não sente 2g ou toque de caneta)
II	Olhos: lagofalmo e/ou ectrópio; triquias; opacidade corneana central; acuidade visual menor que 0,1 ou não conta dedos a 6m. Mãos: lesões tróficas e/ou lesões traumáticas; garras; reabsorção; mão caída. Pés: lesões tróficas e/ou traumáticas; garras; reabsorção; pé caído; contração do tornozelo

MONOFILAMENTOS

COR	Gramas
Verde	0,05
Azul	0,2
Lilás	2,0
Verm. Fechado	4,0
Verm. Cruzado	10,0
Verm. Aberto	300,0
Preto	s/resposta

APÊNDICE I

QUESTIONÁRIO

Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

1. Nº Estudo: ____ - ____

3. Classificação:

2. Família de Relação ____

☐ ÍNDICE (1) ☐ CONTROLE ÍNDICE (2) ☐ PARENTE do CASO (3)

IDENTIFICAÇÃO

4. Se **PARENTE**:

Relação com caso índice:

☐ Pai/Mãe (1) ☐ Irmãos (2) ☐ Filho(a) (3) ☐ Avós (4) ☐ Primos (5)
☐ Sobrinho(a) (6) ☐ Tio(a) (7) ☐ Cônjuge (8) ☐ Não se aplica (99)

5. Data de Nascimento ____/____/____ (dd/mm/aaaa)

6. Idade: ____ anos

7. Sexo:

☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐8. Raça: ☐ branca(1) ☐ negra(2) ☐ parda(3) ☐ indígena(4)9. Escolaridade: ☐ Analfabeto (1)☐ Ensino fundamental (completo/incompleto) (2)☐ Ensino médio (completo/incompleto) (3) ☐ Ensino superior (completo/incompleto) (4)

10. Ocupação:

11. ☐ Urbana (1) ☐ Rural (2)

12. Endereço:

13. Telefone:

14. Cidade:

15. Estado:

FATORES AMBIENTAIS

16. Já trabalhou como caçador ou acompanhou-os?

☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)17. Caso a resposta seja **afirmativa**, por quanto tempo (aproximado)?____ meses ☐ NS (3) ☐ NA(99)

18. Que tipo de animal caçou?

____ ou ☐ NA(99) [Se 16 for (2)]

19. Tem luz elétrica na casa?

☐ Sim (1) ☐ Não (2)

20. Tem água encanada?

☐ Sim (1) ☐ Não (2)

21. Tem rede de esgoto?

☐ Sim (1) ☐ Não (2)

22. Etilismo?

☐ Sim (1) ☐ Não (2)

23. Caso a resposta seja afirmativa, tempo total?

____ meses ou ☐ NA(99) [Se 22 for (2)]

24. Caso a resposta seja afirmativa, descreva a quantidade (ml) /semana ____, tipo de bebida ____

25. Ex-Etilista?

☐ Sim (1) ☐ Não (2) ou ☐ NA(99)

26. Caso a resposta seja afirmativa, há quanto tempo parou?

____ meses ou ☐ NA(99) [Se 24 for (2)]

27. Há quanto tempo mora na mesma casa que o [caso índice]?

____ meses ou ☐ NA(99)

28. Há mais alguém [além do caso índice] com Hanseníase na família?

☐ Sim (1) ☐ Não (2)29. Caso a resposta seja **afirmativa**, quantos parentes?____ parentes ou ☐ NA(99) [Se 27 for (2)]30. Caso a resposta seja **afirmativa**, qual o grau de parentesco?☐ Pai/Mãe (1) ☐ Irmãos (2) ☐ Filho (a) (3)
☐ Avô (ó) (4) ☐ Primo (a) (5) ☐ Tio (a) (7)
☐ Sobrinho(a) (6) ☐ Cônjuge (8) ☐ Outro (10)
☐ NA (99) [Se 27 for (2)]31. Esta(as) pessoa(as) **RESIDEM** na mesma casa que você?☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NA(99)
☐ Reside na mesma casa, mas não é parente (4)

32. Você já recebeu BCG?

☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3)

33. Você já recebeu a segunda dose da BCG?

☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3)

34. Algum dos seus parentes recebeu a 2ª dose da vacina BCG?

☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3)35. Caso a resposta acima seja **afirmativa**, quais familiares?☐ Pai/Mãe (1) ☐ Irmãos (2) ☐ Filho(a) (3) ☐
Avós (4) ☐ Primos (5) ☐ Sobrinho(a) (6)
☐ Tio(7) ☐ Cônjuge(8) ☐ NA(99) ☐ Outro(10)

HEREDOGRAMA

HISTÓRIA DA DOENÇA PREGRESSA

36. Já teve lesão cutânea da Hanseníase anteriormente? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 44 .	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
37. Caso a resposta seja afirmativa , qual foi a data de início? ____ / ____ (mm/aaaa)	OU a idade de início? ____ anos ☐ NA(99)
38. Caso a resposta seja afirmativa , apresentou quantas lesões?	____ lesões cutâneas ☐ NA(99)
39. Tem até hoje cicatrizes cutâneas características de Hanseníase?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
40. Você recebeu tratamento para a Hanseníase?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
41. Caso a resposta seja afirmativa , você completou o tratamento?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
42. Quanto tempo durou o seu tratamento?	____ meses ☐ NA(99)
43. Desenvolveu algum tipo de Reação?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
44. Caso a resposta seja afirmativa , quando desenvolveu (em relação ao tratamento)?	☐ Antes(1) ☐ Durante(2) ☐ Depois(3) ☐ NA(99)

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

45. Observa-se lesão cutânea ativa?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
46. Caso a resposta seja afirmativa , apresenta quantas lesões?	____ lesões ou ☐ NS(3*) ☐ NA(99)
47. Caso a resposta seja afirmativa , há quanto tempo apresenta essas lesão(ões)?	____ (meses) ou ☐ NS(3*) ☐ NA(99)
48. Você está tratando a Hanseníase ativa? Caso sim responder a questão 77	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NA(99)
49. Houve confirmação da Hanseníase por biópsia?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
50. Qual o nome do Hospital/UBS que recebe atendimento?	____ ou ☐ NS (3) ☐ NA(99)
51. Qual a Forma Clínica?	☐ HI (1) ☐ HT (2) ☐ HDT (3) ☐ HD (4) ☐ HDV (5) ☐ HV(6) ☐ Neural (7) ☐ NA(99)
52. Qual o esquema terapêutico ou drogas utilizadas?	☐ PQT/PB (1) ☐ PQT/MB (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)

53. Tem a marca da vacina BCG?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
54. Apresenta sangramento ou formação de crostas nasais?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
55. Grau de incapacidade avaliado no exame neurológico:	☐ Grau Zero (1) ☐ Grau 1 (2) ☐ Grau 2 (3) ☐ Grau 3 (4) ☐ NA(99)

INFORMAÇÃO ADICIONAL

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS - ASMA

56. Alguma vez na vida, você teve sibilos (chiado no peito)? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 59 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
57. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 59 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
58. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos você teve?	☐ Nenhuma(1) ☐ 1 a 3 crises(2) ☐ 4 a 12 crises (4) ☐ + de 12 (5) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
59. Nos últimos 12 meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?	☐ Nunca acordou com chiado (1) ☐ Menos de 1 noite por semana (2) ☐ 1 ou mais noites por semana (4) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
60. Nos últimos 12 meses seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de duas palavras entre cada respiração?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
61. Alguma vez na vida você teve asma?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
62. Nos últimos 12 meses você teve chiado no peito após exercícios físicos?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
63. Nos últimos 12 meses você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS – RINITE (13 A 14 anos)

OBS: Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado!

64. Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), quando não estava resfriado ou gripado? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 67 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
65. Nos últimos 12 meses você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava gripado ou resfriado? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 67 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
66. Nos últimos 12 meses esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
67. Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esse problema nasal?	☐ Nada(1) ☐ Um pouco(2) ☐ Moderado(4) ☐ Muito (5) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
68. Alguma vez na vida você teve rinite alérgica?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS – <u>DERMATITE ATÓPICA</u>			
69. Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele, que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses? Se a resposta for não , passe para a questão 73 .		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
70. Nos últimos 12 meses você teve essas manchas na pele (eczema)? Se a resposta for não , passe para a questão 73 .		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
71. Alguma vez essas manchas com coceira afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
72. Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos últimos 12 meses?		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
73. Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa de coceira na pele?		☐ Nunca nos últimos 12 meses (1) ☐ Menos de 1 noite por semana (2) ☐ 1 ou mais noites por semana (4) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
74. Alguma vez você teve eczema?		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
EXAMES COMPLEMENTARES			
75. Baciloscopia	☐ Positiva(1) ☐ Negativa(2) ☐ NA(99)		
76. Biópsia (descrever)			
77. Parasitológico de Fezes:	1º Exame	2º Exame	3º Exame
78. Há quantos meses trata a Hanseníase ativa?		_____ (meses)	
79. É Tabagista? Se a resposta for sim responda a questão seguinte		☐ Sim(1) ☐ Não(2)	
80. Quantos cigarros diários?		_____	

DADOS DA ENTREVISTA	
DATA:	____ / ____ / ____ (dd/mm/aaa)
ENTREVISTADOR:	

APÊNDICE II

FICHA DE ACOMPANHAMENTO						
IDENTIFICAÇÃO						
1. NOME DO PACIENTE:				2. N° DO REGISTRO:		
3. IDADE (ANOS) ____		MUNICÍPIO: _____		4. SEXO: ☐ M (1) ☐ F (2)		DATA DE INÍCIO DO TTO: DATA DE TÉRMINO DO TTO
6. MORADIA ☐ Rural (1) ☐ Urbana(2) ☐ NA (99)			7. DEMANDA: ☐ Espontânea (1) ☐ Encaminhamento (2) ☐ NA(99)			
8. FORMA CLÍNICA	☐ HI (1) ☐ HT(2) ☐ HD (3) ☐ HV (4) ☐ H neural(5) ☐ NA(99)					
9.BACILOSCOPIA ADMISSIONAL	☐ POSITIVA (1) ☐ NEGATIVA(2) ☐ NA (99)			10. BIÓPSIA: ☐ SIM (1) ☐ NÃO (2) ☐ NA (99)		
11.BACILOSCOPIA FINAL	☐ POSITIVA (1) ☐ NEGATIVA (2) ☐ NA (99)			12. TEMPO TOTAL DE TRATAMENTO		
13. TEMPO ABANDONO TTO MESES	_____	14. PQT ☐ PB (1) ☐ MB (2)				
15. REAÇÃO ☐ TIPO 1(1) ☐ TIPO 2 (2) ☐ Neurite Pura (3) ☐ TIPO I + Neur(4) ☐ TIPO 2 + Neu(5) ☐ NÃO(6)						
16. PERÍODO DA REAÇÃO ☐ ANTES DO TTO (1) ☐ DURANTE TTO (2) ☐ APÓS TTO (3) ☐ NÃO(6) ☐ NA(99)						
EXAME (AVALIAR MENSALMENTE)						
QUEIXAS	MÃOS (1)	PÉS (2)	MÃOS E PÉS (3)	OUTROS (4)	NÃO (5)	NA (99)
17. FRAQUEZA MUSCULAR	☐	☐	☐	☐	☐	☐
18. PARESTESIA	☐	☐	☐	☐	☐	☐
19. EDEMA	☐	☐	☐	☐	☐	☐
20. FEBRE	☐ SIM (1) ☐ NÃO (2) ☐ NA (99)					
21. PERDA DE PESO	☐ SIM (1) ☐ NÃO (2) ☐ NA (99)					
22. FADIGA	☐ SIM (1) ☐ NÃO (2) ☐ NA (99)					
EXAME FÍSICO	SIM (1)		NÃO (2)		NA (99)	
23. NODULOS NA PELE	☐		☐		☐	
24. DOR A PALPAÇÃO DE NERVO	☐		☐		☐	
25. SE SIM, QUAL(IS) O(S) NERVO(S) ?						
26. EXACERBAÇÃO DE MANCHAS ANTIGAS						
27. SURGIMENTO DE NOVAS MANCHAS	☐		☐		☐	
28. SE SIM, QUANTIDADE(S)						
CARACTERÍSTICAS DAS NOVAS MANCHAS						
☐ Hipocrômica (29)	☐ Infiltradas (30)	☐ Ulceradas (31)	☐ Elevadas (32)	☐ Descamativa (33)		
☐ Vesículo-Bolhosas (35)	☐ Edematosas (36)	☐ NA (99)	☐ Eritematosa (34)			

APÊNDICE III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

	BIOMARCADORES HORMONAIS E IMUNOLOGICOS ASSOCIADOS ÀS FORMAS GRAVES E COMPLICAÇÕES DA HANSENÍASE
---	--

COD: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar deste estudo pelo fato de ter sido diagnosticado, no ambulatório (DES)MANCHA, com Hanseníase. Existem muitos casos dessa doença no Brasil e alguns deles podem apresentar complicações como lesão nos nervos dos olhos, mãos e pés. Por isso, estamos estudando alguns fatores que podem influenciar nas complicações da doença. O seu auxílio será válido para o controle da Hanseníase no Estado de Sergipe e no País.

Este estudo tem a finalidade de investigar a IDENTIFICAR BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS E HORMONAIS ASSOCIADOS À APRESENTAÇÃO CLÍNICA E COMPLICAÇÕES DA HANSENÍASE. Por isso, solicitamos o seu consentimento para o incluirmos em nossa pesquisa. Caso o Sr. (a) concorde em participar da nossa pesquisa, essa participação ocorrerá da seguinte forma: 1 – Serão coletadas informações através de um questionário com perguntas simples sobre o surgimento da sua mancha; 2 – Será coletado seu sangue para análise de alguns hormônios; 3 – A cada mês, quando o senhor(a) retornar ao ambulatório para pegar a medicação, nos iremos avaliar se há lesão, em algum nervo do seu corpo, ou qualquer complicação da hanseníase. Solicitamos também o consentimento para realizar um seguimento após a sua alta do tratamento por um ano, a fim de acompanhar a sua condição após o uso da medicação.

O senhor (a) não será submetido (a) a nenhum tratamento a não ser aquele que fazem parte do tratamento empregado pelo seu médico assistente, portanto não há risco decorrente da sua participação e não haverá nenhum custo adicional para o senhor (a).

Esse estudo pretende caracterizar melhor quais os fatores de risco para o surgimento da Hanseníase. Informamos que as informações encontradas após os resultados dos exames realizados ficaram sob total sigilo da pesquisadora em questão. Esses dados serão armazenados em um Banco de Dados e mantidos em caráter confidencial e sigiloso, onde seu nome não aparecerá em nenhuma publicação. Informamos que os seus dados ficarão sob a responsabilidade do Profº Dra. Amelia Ribeiro de Jesus (Contato: 8823-7245) e da fisioterapeuta e doutoranda Daniela Teles de Oliveira (Contato: 8156-5516).

Ressaltamos ainda que, se concordar em participar do estudo e assinar esse termo, o (a) senhor (a) permanecerá com o direito de desistir de sua participação na pesquisa a qualquer momento, assim como poderá receber, caso solicite, informações sobre o andamento do estudo.

Nome do Paciente: _____

Assinatura do Paciente _____ **Data:** _____
(ou representante legal)

Investigador: _____

Assinatura _____ **Data:** _____

APÊNDICE IV

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18)

	BIOMARCADORES HORMONAIS E IMUNOLOGICOS ASSOCIADOS ÀS FORMAS GRAVES E COMPLICAÇÕES DA HANSENÍASE
---	--

Nome do Projeto: Estudo Imunológico, hormonal e Genético na Hanseníase

NOME DO PACIENTE: _____
 Registro.HU: _____ Nº: ____ - ____

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

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste estudo é determinar se você ou as pessoas que vivem na sua vizinhança tem maior propensão para ter doenças infecciosas. A doença que nós estudaremos é chamada Hanseníase, doença que provoca uma mancha na pele. Nós queremos entender se alguns dos seus genes (que são características que seus pais passam para você e seus familiares) fazem você ter mais chance de ter esta doença. Nós também queremos saber se coisas do seu dia a dia fazem de você mais propenso às infecções.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo sua boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de uma colher de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulha. Algumas vezes nós faremos um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Nós esperamos que este estudo nos esclareça porque você e sua família têm Hanseníase, então poderemos prevenir isto no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do paciente	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do responsável	Data	Hora
_____	_____	_____
Testemunha	Data	Hora
_____	_____	_____
Pesquisador	Data	Hora

APÊNDICE V

ARTIGO PUBLICADO

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record.

Please cite this article as doi: 10.1111/sji.12558 This article is protected by copyright. All rights reserved.

Article type : Regular Manuscript

Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions

Th17 Immune Response in Leprosy

Márcio Bezerra Santos*¹; Daniela Teles de Oliveira*; Rodrigo Anselmo Cazzaniga*; Crisuelle Santana Varjão*; Priscila Lima dos Santos*; Micheli L. B. Santos*; Cristiane Bane Correia*; Daniela R. Faria†; Marise do Vale Simon*; João Santana Silva²; Walderez O. Dutra†; Steven G. Reed¹; Malcolm S. Duthie¹; Roque Pahceco de Almeida*^{3 4} and Amélia Ribeiro de Jesus *^{3 4}

*Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brazil; †Department of Morphology, Laboratory of Biologia das Interações Celulares, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ¹Infectious Diseases Research Institute (IDRI), Seattle, Washington, USA; ²Department of Biochemistry and Immunology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP); ³Departament of Medicine (UFS), Sergipe Brasil; ⁴Instituto de Investigação em Imunologia, INCT, CNPq.

Corresponding author

Márcio Bezerra Santos

Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brazil.

Rua Cláudio Batista, S/N, Hospital Universitário.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

E-mail: bio_marcio2006@hotmail.com

Fax and telephone number: 557921051806

Abstract

It is well established that helper T cell responses influence resistance or susceptibility to *Mycobacterium leprae* infection, but the role of more recently described helper T cell subsets in determining severity is less clear. To investigate the involvement of Th17 cells in the pathogenesis of leprosy, we determined the immune profile with variant presentations of leprosy. Firstly, IL-17A, IFN- γ and IL-10 were evaluated in conjunction with CD4⁺ T cell staining by confocal microscopy of lesion biopsies from tuberculoid (TT) and lepromatous (LL) patients. Secondly, inflammatory cytokines were measured by multiplex assay of serum samples from Multibacillary (MB, n = 28) and Paucibacillary (PB, n = 23) patients and household contacts (HHC, n = 23). Leprosy patients were also evaluated for leprosy reaction occurrence: LR⁺ (n = 8) and LR⁻ (n = 20). Finally, peripheral blood mononuclear cells were analyzed by flow cytometry used to determine the phenotype of cytokine-producing cells. Lesions from TT patients were found to have more CD4⁺IL-17A⁺ cells than those from LL patients. Higher concentrations of IL-17A and IL-1 β were observed in serum from PB than MB patients. The highest serum IFN- γ concentrations were, however, detected in sera from MB patients that developed leprosy reactions (MB LR⁺). Together, these results indicate that Th1 cells were associated with both the PB presentation and also with leprosy reactions. In contrast, Th17 cells were associated with an effective inflammatory response that is present in the PB forms but were not predictive of leprosy reactions in MB patients.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. There is strong evidence that the genetic background and immunological response influence susceptibility to leprosy [1-3]. Antigen-specific T helper type 1 (Th1) cell responses, mediated by IFN- γ , control *M. leprae* multiplication and are associated with the paucibacillary (PB) presentation that contain the bacilli within granulomas in epidermal lesions [1, 4-7]. Alternatively, T helper type 2 and T regulatory cell responses (Th2 and Treg, respectively), are mediated by the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β , and are associated with the multibacillary (MB) presentations characterized by uncontrolled *M. leprae* replication and the presence of foamy macrophages within epidermal lesions [4, 5, 8]. Treg are one of the most potent cell types, with eventual regulation of effector T cell responses to limit the tissue pathology that often occurs during intracellular infections [5, 8, 9].

In addition to Th1 and Th2 cells, a CD4 cell subset that preferentially produces IL-17 has been identified (Th17) [5, 10-12]. Th17 cells have been implicated in the outcome of experimental encephalitis, sclerosis rheumatoid arthritis, leishmaniasis, filariasis, psoriasis and tuberculosis [11, 13-18]. IL-17 induces pro-inflammatory cytokines and chemokines, with subsequent recruitment and activation of neutrophils [9, 13, 15, 19]. IL-1 β , another pro-inflammatory cytokine associated with inflammasome development, is involved in the differentiation of Th17 cells [13, 20-23]. Although several studies have demonstrated a protective role of both IL-1 β and IL-17 against particular intracellular pathogens and their associated diseases [13, 15], relatively few reports have investigated these cytokines in the pathogenesis of leprosy [5, 9, 10, 24-28]. In separate studies, it has been reported that significantly greater expression and release of IL-17 isoforms occurs following antigen stimulation of PBMC from tuberculoid patients and healthy contacts relative to lepromatous leprosy patients [10]; it has been suggested that the increase in Th17 cell-associated cytokines may contribute to inflammation within lesions [5]; and IL-17A has been implicated in the erythema nodosum leprosum (ENL) complication [29].

Despite our understanding of how Th1 and Th2 responses can influence leprosy, the impact on *M. leprae* persistence and the severity of disease are less clear for many other immune mechanisms. In particular, the role of Th17 cells, as well as innate and adaptive immune

responses related to IL-17-driven responses, remains to be thoroughly delineated and consolidated [1, 8, 9, 26, 30]. With emphasis on Th17 responses, the aim of this study was to analyze, in a consolidated manner, the inflammatory cytokine profile associated with the major diverse clinical presentations of leprosy. To do this we examined cytokine expression in (i) lesions, (ii) serum samples and (iii) peripheral blood stimulated with mycobacterial antigens. We analyzed the cytokine profile according to both the primary leprosy presentation (MB or PB) and with consideration of the subsequent occurrence of reactional episodes. Improving our understanding of the immune response associated with the clinical manifestations of leprosy has the potential to reveal biomarkers that could aid case management, as well as provide important insight for the development of safe vaccines and immunotherapies [29].

Material and Methods

Ethical approval

This project involved research on human subjects and adhered to the protocols from Brazilian Consul for ethics in research (CONEP). The project was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Sergipe, CAAE 0152.0.107.000-07.

Study subjects and procedures

All individuals attended the ambulatory clinic (DES)MANCHA-Federal University of Sergipe at the University Hospital and were enrolled after thorough examination for signs of leprosy, leprosy reactions and neurological disabilities. All recruits had a scar indicating prior BCG vaccination and all signed a free and clarified term of knowledge (informed consent) and responded to an investigative questionnaire to provide demographic and clinical data. Patients were classified as MB (n = 28) or PB (n = 23) prior to treatment by multidrug therapy (MDT) for leprosy, according to Brazilian Ministry of Health and International Leprosy Association (ILA) standards. Patients were also thoroughly evaluated for leprosy reaction occurrence: LR+ (n = 8) and LR- (n = 20). The LR patients included 6 with reversal reaction (RR) and 2 with erythema nodosum leprosum (ENL). Based on histopathological analyses, patients were further classified as either indeterminate (IL; 9), true tuberculoid (TT; 14), borderline (encompassing borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB) and borderline lepromatous (BL) classifications; a total of 12) or lepromatous leprosy (LL; 8). Biopsies were obtained from skin lesions of 9 TT and 8 LL patients to permit immunohistochemistry and analysis by confocal microscopy. These patients were examined by two dermatologists and did not present with LR at the time of biopsy and blood sample collection. A total of 23 household contacts of the patients (HHC) were recruited to serve as controls living under the same economic and environmental conditions as patients. These contacts are also more likely to have been exposed to *M. leprae* than the general population. Serum was collected from all subjects and stored at -80 °C until analyses.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Skin biopsies of TT and LL patients, not presenting with reactional episodes, were treated with 30% sucrose at 4°C for 30 min prior to storage in TissueTeK at -80°C. Individual 4-5µm

cryosections were cut and placed in saline-pre-coated slides and fixed for 10 minutes with acetone. Slides were incubated with phosphate buffered saline (PBS) for 15 minutes. Standard hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to assess tissue integrity, and to establish the location and intensity of the inflammatory infiltrate. Immunofluorescence staining was conducted by incubating with FITC- or PE-labeled monoclonal antibodies binding CD4 and either IFN- γ , IL-17 or IL-10. Isotype control antibodies were used to control for non-specific binding (Biolegend, San Diego, CA) [31]. Sections were incubated with antibodies overnight at 4°C, then extensively washed with PBS, counter-stained with DAPI and mounted using anti-fade mounting media (Molecular Probes, USA). Slides were protected from light and kept at 4°C until imaging with a Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal system running the software LASERSHARP 3.0 coupled to a Zeiss Axiovert 100 microscope stand. A water-cooled argon UV laser (488 nm) or a krypton/argon laser was used to excite the preparation (through its 363 nm line, 488 nm line or 568 nm line), and light emitted was selected with band pass filters (522/35 for FITC and DAPI, 598/40 for PE). For each section, the inflammatory infiltrate was located and an area presenting uniform infiltrate was selected for analysis. A minimum of 3 fields of view were captured within this area. Image analysis and processing were performed with Lasersharpp software (Bio-Rad), Confocal Assistant, Photoshop (Adobe Systems) and Image Tool. The total number of cells in each acquired field was counted and the average number of cells per section calculated for each patient. This calculation was performed for each fluorescent parameter analyzed. The counts were performed blindly by two different individual researchers and results were expressed as the average of cells per field for each fluorescence parameter. Values were then averaged for each group. Normal, healthy skin sections from plastic surgery served as negative control in all staining procedures.

Measurement of cytokine levels and flow cytometry

To evaluate the Th1 and Th17 immune response, serum from 51 leprosy patients (23 PB and 28 MB) and 23 HHC were collected and stored at -80 °C. Concentrations of the cytokines IL-12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-1 β and IL-10 were measured by Luminex multiplex analyses (Milliplex kit - Human TH17 Magnetic Bead Panel, Panomics, Affymetrix, Fremont, CA). Assays were performed according to the manufacturer's instructions.

To determine which cells were producing cytokines, PBMC from subsets of TT (n = 5), LL (n = 6) and HHC (n = 6) were seeded at 1×10^6 cells/ml in plates with 48 wells (Greiner CELLSTAR®) and cultured with RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, New York, USA) for 6 hours at 5% CO₂, 37°C. Subsequently, GolgiPlug (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) was added to the cells and incubated for an additional 12 hours. At the end of culture period, cells were stained for cell surface markers CD3 (V500), CD4 (FITC) and CD8 (PE-Cy5) and intracellular cytokines IL-17A (PE) and IFN- γ (PE-Cy7). All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Purified mouse IgG1 (final concentration of 10 μ g/ml; Bioscience) was used as an isotype control. Cells were suspended in staining buffer and events were acquired using the BD FACS Canto II. Analysis of the acquired datasets was performed using FlowJo v10 (FlowJo LLC) software.

Statistical analysis

Cytokine concentrations were compared across the different subgroups and according to clinical forms of leprosy. Mean, median and standard deviation of the groups were calculated. D'Agostino and Pearson tests were applied to data that demonstrated a normal distribution. Statistical differences between the groups were determined by Mann-Whitney U tests. Correlation between cytokine levels were performed by Spearman correlation. All analyses were performed using Graph Pad Prism version 5.0. Statistical analysis of confocal imaging data was performed using JMP statistical software from SAS. Comparisons of means for a given parameter were made by non-parametric (one tailed, considering unequal variance of groups) t-tests. Results were considered statistically different when a p -value < 0.05 was obtained.

Results

Composition of study groups

Patients presenting as MB or PB were of similar age to HHC. The proportion of men presenting with MB (57.2%) was, however, significantly higher than that presenting with PB (26.1%; p -value = 0.04) (**Table 1**). As expected, MB patients had more lesions (6.58 ± 2.85) than the PB patients (1.91 ± 1.59 ; p -value < 0.0001) and the occurrence of reactional episodes was significantly higher in MB than PB (71.4% vs. 17.4%, p -value = 0.0002). We also observed that neurological disability occurred more frequently in MB than PB patients (60.7% vs. 30.4%, p -value = 0.04).

Differential expression of regulatory cytokines within leprosy lesions

To reveal potential differences in the cytokine expression of leprosy patients, we analyzed biopsies from patients at the opposing poles of disease (the TT and LL presentations). As expected, higher numbers of cells expressing IFN- γ , and CD4 in conjunction with IFN- γ , were observed in the lesions of TT relative to the lesions of LL (**Figure 1A and B**, p -value = 0.01). Microscopy also revealed significantly more cells expressing IL-17A in the lesions of TT patients compared to LL patients (**Figure 2A**). Further analysis indicated IL-17A co-localized with CD4 (**Figure 2B and 2C**). No difference was observed, however, in the number of total of CD4⁺ T cells expressing IL-10 (**Figure 3A, B and C**). Taken together, these data confirm that TT have a higher frequency of Th17 cells in their lesions than LL, suggesting a role for IL-17A, together with Th1 cells, in controlling bacterial multiplication.

Circulating cytokine levels

We next analyzed circulating cytokine levels of patients to assess the systemic immune response. For these analyses, we considered MB patients within 2 categories i.e, either without subsequent leprosy reactions (LR-) or with subsequent leprosy reactions (LR+). Regarding to conventional Th1 responses, we observed higher concentrations of serum IL-12p70 in PB (66.6 ± 14.04 pg/ml) than MB without leprosy reaction (MB LR-) (56.4 ± 9.57 pg/ml; p -value = 0.009), or MB with leprosy reaction (MB LR+) (56.8 ± 8.2 pg/ml; p -value = 0.09) and HHC (52.5 ± 7.51 pg/ml; p -value = 0.0001 **Figure 4A**). Similarly, a higher concentration of serum IFN-

γ in PB (74.9 ± 38.7 pg/ml) than HHC (54.7 ± 17.5 pg/ml; p -value = 0.009; **Figure 4B**), but we also observed that MB LR+ patients presented with the highest levels of IFN- γ (90.2 ± 45.5 pg/ml; p -value = 0.02). However, MB LR+ did have lower levels of IL-10 (110.3 ± 31 pg/ml) than MB LR- (136.8 ± 47.3 pg/ml), while no differences were observed in IL-10 levels of PB (115.5 ± 30.9 pg/ml) and MB LR- (**Figure 4C**). Taken together, this indicates that PB patients and MB LR+ exhibit a greater systemic inflammatory response and lower down regulatory response.

Higher concentrations of IL-17A were observed in serum from PB patients (47.2 ± 11.4 pg/ml) than MB patients without leprosy reaction (LR-, 40.5 ± 6.3 pg/ml; p -value = 0.003) or with leprosy reaction (LR+; 38.5 ± 14.7 pg/ml; p -value = 0.02) and HHC (37.3 ± 6.8 pg/ml; p -value = 0.001; **Figure 4D**). Given its involvement in Th17 responses, we also measured serum IL-1 β levels. PB presented higher levels of IL-1 β (62.1 ± 13.6 pg/ml) than MB LR- (53.2 ± 19.5 pg/ml; p -value = 0.04) and HHC (50.5 ± 9.8 pg/ml; p -value = 0.0007; **Figure 4E**). These data further support the involvement of Th17 in PB leprosy but not in predicting leprosy reactions. Positive correlations were observed between IL-17A and IL-1 β concentrations (**Figure 5A**; Spearman $r=0.59$, p -value < 0.0001), as well as between IL-17A and either IFN- γ ($r = 0.67$) or IL-12p70 ($r = 0.57$) (**Figure 5B-C**). There was, however, no correlation between IL-17A and IL-10 ($r = 0.21$) (**Figure 5D**). Taken together, although differences were quite minor, these systemic data generally corroborate the observations made within lesions.

We next determined which cells were contributing to the elevated levels of IL-17A and IFN- γ in TT patients. No differences were observed in the proportion of CD4+ or CD8+ T cells within PBMC of TT, LL and HHC (**Figure 6B and Figure 6C, respectively**). However, the percentage of CD4+ T cells producing IL-17A was higher in TT (% ; 0.24 ± 0.12) and HHC (0.19 ± 0.15) than in LL (0.08 ± 0.06 ; p -value = 0.04). Similarly, the percentage of CD8+ T cells producing IL-17A was higher in TT (0.29 ± 0.28 ; p -value = 0.03) than LL (0.11 ± 0.1) and HHC (0.04 ± 0.06) (**Figure 6C**). Surprisingly, IFN- γ levels in both CD4+ and CD8+ T cells were higher in LL (0.16 ± 0.12) when compared with TT (0.03 ± 0.04) and HHC (0.11 ± 0.09) (**Figure 6B-C**). These data are consistent with the IFN- γ levels observed in serum samples. All patients were managed throughout their treatment and we observed that the LL patients with the higher levels of IFN- γ developed LR (dots identified in the Figure 6). Taken together, our data reinforce the role of IFN- γ in LR at the same time as indicating the presence of Th17 cells in the circulation of TT patients.

Discussion

Previous studies have reported roles for Th1, Th2 and Treg cells in the clinical evolution of leprosy [1, 5, 8-10, 13]. In this study we examined the relationship of Th17 cells and the clinical presentation of leprosy. Microscopy of lesions and flow cytometry of PBMC from patients revealed that TT patients had greater numbers of CD4+IL-17+ cells than LL patients. Expanded analyses indicated that serum IL-17A concentrations are elevated in PB patients and suggest that Th17 responses are associated with the development of this clinical form. We did not, however, observe differences in IL-17A levels between MB patients that did or did not develop reactional episodes, suggesting that Th17 cells are not predictive of leprosy reactions. A role of Th17 has been observed in limiting other intracellular infections [13, 32, 33], and our data suggests a similar protective role for Th17 cells during leprosy.

IL-1 α regulates Th17 polarization and its interplay with IL-23 amplifies Th17 responses [34]. In the present study, we observed high levels of IL-1 β in PB patients. IL-1 β mediates many diseases by initiating and potentiating immune and inflammatory responses. Moreover, IL-1 α knockout mice have increased susceptibility to *Shigella*, *Salmonella*, *C. albicans* and *S. aureus* infection [35]. Our data indicate that IL-1 β and IL-17A are associated with the PB clinical presentation and indicate that these cytokines contribute to the control of *M. leprae* infection.

Our data also corroborate the association of IFN- γ and IL-12p70, which regulate Th1 responses, with the PB forms of leprosy and show that there is a correlation between IL-17A and IFN- γ . Consistent with this we observed more cells expressing IFN- γ in the lesions of TT patients than in lesions from LL patients. These data support the argument that both Th1 and Th17 responses interact to help control of the proliferation and dissemination of *M. leprae*.

Our data indicate that LL patients who had serum IFN- γ concentrations over 50 pg/ml were more likely to present with reactional episodes or neurological disabilities (80% and 60%, respectively). Moreover, reactional MB patients presented higher levels of IFN- γ than others groups. Considering that these LL patients also presented with higher percentages of CD4+IFN- γ + and CD8+IFN- γ + T cells, these data suggest that patients that respond with high levels of IFN- γ , develop exacerbated inflammatory response and progression to more aggressive clinical forms of leprosy. This strengthens the observation that similar to other infectious diseases, such as mucosal leishmaniasis, there is a need for a balance between pro- and anti- inflammatory

responses in leprosy [36-38]. While Saini and colleagues study similarly found an association of the Th17 response with the PB forms of leprosy [10], they reported that leprosy reactions (Type 1 and 2) are also associated with Th17 response [5]. We did not, however, observe differences in IL-17 levels between MB LR+ and MB LR- at the time of initial diagnosis, indicating that Th17 are not predictive of inflammatory episodes associated with leprosy reactions.

The development of Th17 is under the master transcription factor ROR γ t [5, 10] and lymphocytes from ROR α - and ROR γ T-deficient individuals also display an impaired IFN- γ response to *Mycobacterium*. This mutation has been associated with susceptibility to *Candida albicans* and *Mycobacterium* infection. Okada and colleagues [26] described a bi-allelic RORC mutation that cause a lack of functional ROR α and ROR γ T isoforms and an absence of IL-17A/F-producing T cells, with the suggestion that IL-17 is important for protective responses to *C. albicans* and systemic protection against *Mycobacterium*. While an impaired IFN- γ response increases the susceptibility to mycobacterial infections, our results demonstrate that in addition to the critical role of the Th1 response and IFN- γ production in protection against *M. leprae*, the actions of IL-17A/F and Th17 cells are also involved. The role of IL-17A may not be exclusively limited to T helper cell subsets, as IL-17A has also been detected in CD8+ T cells, $\gamma\delta$ T cells, NK cells and neutrophils [13, 39]. IL-17A attracts neutrophils to defend against different pathogens [13, 39] and has been associated with other immune mechanisms that help to control other infectious diseases such as visceral leishmaniasis and tuberculosis [32, 33]. Taken together, our data further indicates that a combination of Th1/Th17 responses exert a protective effect during *M. leprae* infection and guide the development of the PB presentations of this disease. However, we highlight the need for studies that seek at clarifying the molecular and genetic mechanisms involved in the regulation of Th17 cells and the role of innate immunity in the clinical forms of leprosy. Furthermore, it is required to investigate the mechanisms involved in the inflammatory response associated with leprosy reactions mediated by IFN- γ , and if the Th1/Th17 plays a distinct role on the different leprosy reactions (type 1 and 2). In this present study, due to the small number of patients with ENL (n = 2) we recognize the limitations to investigate the role of Th17 in this type of reaction. In summary, as expected, IL-12p70 and IFN- γ (Th1 profile) were associated with the PB forms of leprosy. We also showed a role of Th17 in PB clinical forms by different methods: immune response in lesion (local response), serum (systemic response) and PBMC by flow cytometry (cells producing cytokines spontaneously)

from leprosy patients and HHC. Taken together, our data indicates that Th17 cells are associated with effective inflammatory response that promotes the PB forms in leprosy, but these cells are not predictive of the subsequent development of inflammatory leprosy reactions in MB patients. This suggests that Th17 cells are protective against *M. leprae* infection and promote the milder clinical forms of leprosy.

Acknowledgments

This work was funded by Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC)/SE/FUNTEC/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grants: CNPq n°12/2009, Process n° 019.203.02712/2009-8 (ARJ). ARJ and RPA are CNPq investigators. MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, Process: 454848/2014-5 (ARJ). We would like to thank also the residents and dermatologists of Dermatology Clinic-HU/UFS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We also thank Professor Michael W. Lipscomb for excellent suggestions on the manuscript.

Conflict of interest statement

The authors state no financial or commercial conflicts of interest.

References

- 1 Simon M, Scherlock J, Duthie MS, Ribeiro de Jesus A. *Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy*. Drug Development Research. 2011;72:509-27.
- 2 de Oliveira DT, Bezerra MM, de Almeida JA, Duthie M, Reed S, de Jesus AR. *Neurological disability in leprosy: incidence and gender association in Sergipe, Brazil*. Geospat Health. 2012 Sep;6:S125-9.
- 3 Duthie MS, Gillis TP, Reed SG. *Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine*. Hum Vaccin. 2011 Nov;7:1172-83.
- 4 Dupnik KM, Bair TB, Maia AO et al. *Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy*. J Infect Dis. 2015 May 15;211:1658-76.
- 5 Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. *Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF-beta and Increase in IL-6*. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Apr;10:e0004592.
- 6 Duthie MS, Saunderson P, Reed SG. *The potential for vaccination in leprosy elimination: new tools for targeted interventions*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 2012;107:7.
- 7 Duthie MS, Orcullo FM, Abbelana J, Maghanoy A, Balagon MF. *Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy*. Appl Microbiol Biotechnol. 2016
- 8 Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA et al. *Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy*. Am J Trop Med Hyg. 2012 May;86:878-83.
- 9 Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. *Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy*. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan;10:e0004338.
- 10 Saini C, Ramesh V, Nath I. *CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2338.
- 11 Wang X, Zheng XY, Ma C et al. *Mitigated Tregs and augmented Th17 cells and cytokines are associated with severity of experimental autoimmune neuritis*. Scand J Immunol. 2014 Sep;80:180-90.
- 12 Bretscher PA. *On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases*. Scand J Immunol. 2014 Jun;79:361-76.
- 13 Akdis M, Burgler S, Cramer R et al. *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol. 2011 Mar;127:701-21 e1-70.
- 14 Yang C, He D, Yin C, Tan J. *Inhibition of Interferon Regulatory Factor 4 Suppresses Th1 and Th17 Cell Differentiation and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Scand J Immunol. 2015 Oct;82:345-51.
- 15 Bi Y, Yang R. *Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions*. Scand J Immunol. 2012 Jun;75:543-52.
- 16 Eysteinsdottir JH, Sigurgeirsson B, Olafsson JH et al. *The role of Th17/Tc17 peripheral blood T cells in psoriasis and their positive therapeutic response*. Scand J Immunol. 2013 Dec;78:529-37.
- 17 Halvorsen EH, Stronen E, Hammer HB, Goll GL, Sollid LM, Molberg O. *Interleukin-15 induces interleukin-17 production by synovial T cell lines from patients with rheumatoid arthritis*. Scand J Immunol. 2011 Mar;73:243-9.
- 18 Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. *Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis*. Scand J Immunol. 2011 Jul;74:1-13.

- 19 Bellemore SM, Nikoopour E, Schwartz JA, Krougly O, Lee-Chan E, Singh B. *Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice*. Clin Exp Immunol. 2015 Dec;182:261-9.
- 20 Burgler S, Ouaked N, Bassin C et al. *Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells*. J Allergy Clin Immunol. 2009 Mar;123:588-95, 95 e1-7.
- 21 Soong L, Henard CA, Melby PC. *Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis*. Semin Immunopathol. 2012 Nov;34:735-51.
- 22 Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. *Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis*. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul;8:e2914.
- 23 Martinon F, Tschopp J. *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation*. Cell Death Differ. 2007 Jan;14:10-22.
- 24 Aarao TL, de Sousa JR, Botelho BS, Fuzii HT, Quaresma JA. *Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy*. Microb Pathog. 2016 Jan;90:64-8.
- 25 Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E et al. *Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines*. Arch Dermatol Res. 2014 Nov;306:793-801.
- 26 Okada S, Markle JG, Deenick EK et al. *IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations*. Science. 2015 Aug 7;349:606-13.
- 27 Khadge S, Banu S, Bobosha K et al. *Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal*. BMC Infect Dis. 2015 Oct 28;15:477.
- 28 Sampaio LH, Sousa ALM, Barcelos MC, Reed SG, A. SMM, Duthie MS. *Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:9.
- 29 Martiniuk F, Giovinazzo J, Tan AU et al. *Lessons of leprosy: The emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity*. J Drugs Dermatol. 2012;11:5.
- 30 Gulia A, Fried I, Massone C. *New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy*. F1000 Med Rep. 2010;2.
- 31 Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr. et al. *Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis*. Infect Immun. 2005 Dec;73:7853-9.
- 32 Pitta MG, Romano A, Cabantous S et al. *IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani*. J Clin Invest. 2009 Aug;119:2379-87.
- 33 Torrado E, Cooper AM. *IL-17 and Th17 cells in tuberculosis*. Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Dec;21:455-62.
- 34 Schmidt RL, Lenz LL. *Distinct licensing of IL-18 and IL-1beta secretion in response to NLRP3 inflammasome activation*. PLoS One. 2012;7:e45186.
- 35 Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. *IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes*. PLoS Pathog. 2010 Feb;6:e1000661.
- 36 Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D. *TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against Leishmania (Viannia)*. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jun;5:e1204.

- 37 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:e1874.
- 38 Stober CB, Lange UG, Roberts MTM, Alcamí A, Blackwell JM. *IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine Leishmania major Infection*. The Journal of Immunology. 2005;175:2517-24.
- 39 Lee DJ, Li H, Ochoa MT *et al*. *Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy*. J Infect Dis. 2010 Feb 15;201:558-69.

Figure Legends

Figure 1. IFN- γ expression in lesions of TT and LL patients. A) Number of IFN- γ + cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. B) Number of CD4+ IFN- γ + cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. (C) Representative confocal microscopy analyses for total IFN- γ + and for CD4+ IFN- γ + cells in TT and LL lesions. Frozen tissue sections were stained with PE-labeled anti-IFN- γ antibody (red), FITC-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (green) and DAPI (blue), as described in Materials and Methods. The three optical sections for each patient were obtained, simultaneously, with 363, 488 and 568 lines of argon/krypton lasers and the proper set of filters. The overlay for CD4 (green), IFN- γ (red) and DAPI (blue) in TT and LL lesions is shown on the right hand panels. The cells that are double positive for each pair of staining (CD4+ IFN- γ +) appear in yellow. Values represent the average $\pm$ standard deviation of each group. * indicates $p < 0.05$, comparing TT and LL. The bar represents 10 μ m.

Figure 2. IL-17 expression in lesions of TT and LL patients. A) Number of IL17+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. B) Number of CD4+IL17+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. (C) Representative confocal microscopy analyses for total IL-17+ and for CD4+IL17+ cells in TT and LL lesions. Frozen tissue sections were stained with PE-labeled anti-IL-17 antibody (red), FITC-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (green) and DAPI (blue), as described in Materials and Methods. The three optical sections for each patient were obtained, simultaneously, with 363, 488 and 568 lines of argon/krypton lasers and the proper set of filters. The overlay for CD4 (green), IL-17 (red) and DAPI (blue) in TT and LL lesions is shown on the right hand panels. The cells that are double positive for each pair of staining (CD4+IL-17+) appear in yellow. Values represent the average $\pm$ standard deviation of each group. * indicates $p < 0.05$, comparing TT and LL. The bar represents 10 μ m.

Figure 3. IL-10 expression in lesions of TT and LL patients. A) Number of IL-10+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. B) Number of CD4+ IL-

10+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. (C) Representative confocal microscopy analyses for total IL-10+ and for CD4+ IL-10+ cells in TT and LL lesions. Frozen tissue sections were stained with PE-labeled anti-IL-10 antibody (red), FITC-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (green) and DAPI (blue), as described in Materials and Methods. The three optical sections for each patient were obtained, simultaneously, with 363, 488 and 568 lines of argon/krypton lasers and the proper set of filters. The overlay for CD4 (green), IL-10 (red) and DAPI (blue) in TT and LL lesions is shown on the right hand panels. The cells that are double positive for each pair of staining (CD4+ IL-10+) appear in yellow. Values represent the average $\pm$ standard deviation of each group. * indicates $p < 0.05$, comparing TT and LL. The bar represents 10 μ m.

Figure 4. Circulating cytokine levels of leprosy patients and contacts. Concentrations of serum (A) IL-12p70, (B) IFN- γ , (C) IL-10, (D) IL-17A and (E) IL-1 β from PB, MB (with Leprosy reaction LR+ and without leprosy reaction LR-) and household contacts (HHC). Cytokine concentrations were collected and determined by Luminex assay. A minimum of 15 patient samples were used per cohort. Statistically significant differences between groups are at a p value < 0.05 .

Figure 5. Correlation among serum cytokines. Cytokine concentrations from PB (n = 23) and MB (n = 28) leprosy patients and HHC (n = 23) samples were analyzed by Luminex Technique and correlation between the cytokines values were determined by Spearman test. CI = Confidence Interval. *Asterisks indicate statistically significant correlations, at a p value < 0.05 .

Figure 6. Cellular source of IL-17 and IFN- γ in leprosy patients and contacts. (A) Representative flow cytometry analysis showing CD3+CD4+ IL-17A and IFN- γ production. (B) Percentage of CD3+CD4+ T helper cell expression and (C) CD3+CD8+ T cytotoxic cell expression of IL-17A+ and IFN- γ + in PBMCs isolated from peripheral blood of TT (n = 5), LL (n = 6) and contact controls (n = 6). The red dots in CD4+IFN- γ + and CD8+IFN- γ + graphics indicate the LL patients who developed leprosy reaction later.

