



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

EDVALDO LIMA SILVEIRA

**IMPLICAÇÕES DO PERFIL CITOCÍNICO TH22 NAS FORMAS POLARES DA
HANSENÍASE**

BELÉM

2016

EDVALDO LIMA SILVEIRA

**IMPLICAÇÕES DO PERFIL CITOCÍNICO TH22 NAS FORMAS POLARES DA
HANSENÍASE**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais. Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

BELÉM

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Silveira, Edvaldo Lima, 1950-
Implicações do perfil citocínico TH22 nas formas polares da hanseníase /
Edvaldo Lima Silveira. - 2016.

Orientador: Juarez Antônio Simões Quaresma. Tese (Doutorado) -
Universidade Federal do
Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais, Belém, 2016.

1. Hanseníase. 2. Citocinas. 3. Imunohistoquímica. I.
Título.

CDD 22. ed. 616.998

EDVALDO LIMA SILVEIRA

IMPLICAÇÕES DO PERFIL CITOCÍNICO TH22 NAS FORMAS POLARES DA
HANSENÍASE

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Orientador

Prof. Dr. Helder Henrique Costa Pinheiro
Membro da Banca

Prof^a. Dr^a. Marizeli Viana de Aragão Araújo
Membro da Banca

Prof^a. Dr^a. Samia Demachki
Membro da Banca

Prof. Dr. George Alberto da Silva Dias
Membro da Banca

Prof^a. Dr^a. Hellen Thais Fuzii
Suplente

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida e bênçãos providas durante todas as etapas da realização deste trabalho;

A minha família, em especial minha esposa Alcinéa Silveira, aos meus filhos Igor Silveira, Tiago Silveira, Taiana Silveira e Yan Silveira, e aos netos que estão à caminho, Maria e Rafael, em nome do amor;

À Vânia do Socorro Alves da Silveira, sobrinha e grande amiga que sempre esteve disposta a nos ajudar;

Aos pacientes com hanseníase, que possam se beneficiar com os resultados deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, Professor Associado da Universidade Federal do Pará e Reitor da Universidade do Estado do Pará, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, assim como pelo incentivo e paciência;

Ao Prof. Dr. Leônidas Braga Dias Junior, Professor Adjunto IV da Universidade do Estado do Pará e Responsável Técnico do Laboratório Paulo Azevedo, pela concessão dos blocos de parafina de casos de hanseníase;

Ao médico Renan Kleber Costa Teixeira, Mestrando do Programa de Cirurgia e Pesquisa Experimental da Universidade do Estado do Pará, pela ajuda no início da realização deste trabalho;

Ao aluno Denilson José Silva Feitosa Junior, acadêmico de Medicina da Universidade do Estado do Pará, pela inestimável ajuda em todas as fases de confecção do corpo deste trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A hanseníase é uma doença crônica granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*. Entre os aspectos imunopatológicos da hanseníase sabe-se a defesa é efetuada pela resposta imunológica celular, capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada por citocinas e mediadores da oxidação. O conceito de longa data de uma dicotomia Th1-Th2 na hanseníase, com Th1 predominante tuberculóide e Th2 predominante hanseníase virchowiana, recentemente foi contestada. Além disso, a resposta Th22 foi identificada como moduladora de Th1-Th2 em doenças de pele inflamatórias, mas os seus papéis na hanseníase ainda não foram elucidados. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão tecidual de citocinas que participam da resposta Th22 nas formas polares da hanseníase. **MÉTODO:** Foram pesquisados pacientes com diagnóstico dermatológico de hanseníase. Foram selecionados 31 pacientes, sendo 16 com a forma tuberculóide (TT) e 15 com a virchowiana (VV). A imunohistoquímica para a imunomarcação do tecido com os anticorpos Anti-IL-13, IL-22, TNF- α e FGF-b, foi baseada no método envolvendo a formação do complexo biotina-estreptavidina peroxidase. A quantificação da imunomarcação foi feita a partir da seleção aleatória de 05 campos visualizados no microscópio em aumento de 400x. Na análise univariada, foram obtidas frequências, medidas de tendência central e de dispersão e para a investigação das hipóteses foram aplicados os testes de Mann-Whitney e a correlação de Pearson, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). **RESULTADOS:** Referente à imunomarcação para a IL-22 pode-se observar diferença estatística dentre os grupos estudados sendo que no polo VV a média encontrada foi de $241,3 \pm 44,63$ cells/mm² enquanto que na forma TT a média foi de $90,39 \pm 30,18$ cells/mm² com $p < 0,0001$. Envolvendo a presença da IL-13, no polo VV a média de ocorrência foi de $85,76 \pm 19,99$ cells/mm². Já no polo TT a média encontrada foi de $57,20 \pm 14,73$ cells/mm² $p = 0,0002$. Em relação à imunexpressão do FGF b, na forma VV, a média de ocorrência foi de $228,9 \pm 45,13$ cells/mm² enquanto que na forma TT a média foi de $47,80 \pm 14,29$ cells/mm² $p < 0,0001$. Para o TNF- α , a análise quantitativa mostrou-se estatisticamente significativa na forma TT onde a média das células expressando a citocina foi de $99,74 \pm 30,14$ cells/mm² quando comparada a forma VV $62,08 \pm 13,67$ cells/mm² $p = 0,0008$. **CONCLUSÃO:** A resposta Th22, mediada pela IL-22, tem fundamental importância na patogênese da hanseníase, se relacionando diretamente com a forma clínica da doença e com outras citocinas.

Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Imuno-Histoquímica; Citocinas

ABSTRACT

BACKGROUND: Leprosy is a chronic granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*. Among the immunopathological aspects of leprosy is known that the defense is done by the cellular immune response, able to phagocyte and destroy the bacilli, mediated by cytokines and mediators from oxidation. The long-standing concept of a Th1-Th2 dichotomy in leprosy, with predominant Th1 in tuberculoid lesions and Th2 predominant in virchowian patients, has recently been challenged. Furthermore, the Th22 response was identified as modulating Th1-Th2 in inflammatory skin diseases, but their roles in leprosy have not yet been elucidated. **OBJECTIVE:** Evaluate the tissue expression of cytokines involved in Th22 response in the polar forms of leprosy. **METHOD:** Patients with dermato-immunological diagnosis of leprosy were included and selected 31 patients, 16 with the tuberculoid (TT) form and 15 with lepromatous (LL). Immunohistochemistry for tissue immunostaining with antibodies against IL-13, IL-22, TNF- α and FGF-b was based on the method involving the formation of biotin-streptavidin peroxidase complex. Quantitation of the immunostaining was taken randomly from 05 fields viewed at 400x magnification microscope. In univariate analysis, frequencies, measures of central tendency and dispersion were obtained and for investigation of the hypothesis were applied the Mann-Whitney test and the Pearson correlation, considering a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). **RESULTS:** Regarding the immunostaining for IL-22 can be observed statistical difference among the groups and in the LL pole the average was 241.3 ± 44.63 cells/mm², while in the TT form the mean was 90.39 ± 30.18 cells/mm² ($p < 0.0001$). Engaging the presence of IL-13, LL pole average occurrence was 85.76 ± 19.99 cells/mm². In the TT pole the mean was 57.20 ± 14.73 cells/mm² ($p = 0.0002$). Regarding the immunostaining for FGF-b, in the LL lesions, the mean incidence was 228.9 ± 45.13 cells/mm², while in the TT form the mean was 47.80 ± 14.29 cells/mm² ($p < 0.0001$). For TNF- α , quantitative analysis was statistically significant in TT form where the average of the cells expressing the cytokine was 99.74 ± 30.14 cells/mm² when compared to the LL form where the results were 62.08 ± 13.67 cells/mm² ($p = 0.0008$). **CONCLUSION:** The Th-22 response, mediated by IL-22, has fundamental importance in the pathogenesis of leprosy, relating directly to the clinical form of the disease and other cytokines.

Key-words: Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Immunohistochemistry; Cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BB	Boderline Boderline (Ridley & Jopling, 1966)
BL	Boderline Lepromatoso (Ridley & Jopling, 1966)
BSA	Soro Albumina Bovina
BT	Boderline ou Boderline Tuberculóide (Ridley & Jopling, 1966)
C4B	Componente do complemento 4B
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CCL15	Ligante de Quimiocina 15
CCL23	Ligante de Quimiocina 23
CCL7	Ligante de Quimiocina 7
CCR10	Receptor de Quimiocina 10
CCR4	Receptor de Quimiocina 4
CCR6	Receptor de Quimiocina 6
CR1	Receptor de Complemento tipo 1
CR3	Receptor de Complemento tipo 3
CR4	Receptor de Complemento tipo 4
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FGF b	Fator de Crescimento de Fibroblastos beta
FGFs	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HE	Hematoxilina Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
I	Indeterminada (Ridley & Jopling, 1966)
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL- 4	Interleucina 4
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-22	Interleucina 22
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IFN	Interferon
kDa	Kilo-Dalton
LTA	Linfotoxina alfa
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
Min	Minuto
Mm	Milímetro
MPECs	Monotonous Population of Elongated Cells
Nº	Número
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NK	Natural Killers
NO	Óxido Nítrico
°C	Grau Centígrado

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução de Fosfato Trisódico
PGL-1	Glicolípido Fenólico 1
RNI	Reativos Intermediários do Nitrogênio
ROI	Reativos Intermediários do Oxigênio
RR	Reação Reversa
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SodA	Superóxido desmutase A
SodC	Superóxido desmutase C
Th	Linfócitos T auxiliares
Th0	Linfócito T Auxiliar tipo 0
Th1	Linfócito T Auxiliar tipo 1
Th17	Linfócito T Auxiliar tipo 17
Th2	Linfócito T Auxiliar tipo 2
Th22	Linfócito T Auxiliar tipo 22
Th9	Linfócito T Auxiliar tipo 9
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRLs	Receptores Semelhantes a Toll
TT	Tuberculóide (Ridley & Jopling, 1966)
UFPA	Universidade Federal do Pará
VDR	Receptor de vitamina D
VV	Virchowviana (Ridley & Jopling, 1966)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	ETIOLOGIA.....	16
3.2	EPIDEMIOLOGIA.....	17
3.3	CLASSIFICAÇÕES DAS FORMAS CLÍNICAS.....	18
3.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	18
3.5	HISTOPATOLOGIA.....	20
3.6	NEUROPATIA PERIFÉRICA.....	21
3.7	SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE.....	22
3.8	RESPOSTAS INATA E ADQUIRIDA.....	27
3.9	RESPOSTAS TH1 X TH2.....	29
3.10	ATIVIDADE MICROBICIDA DO MACRÓFAGO CONTRA O M. LEPRAE....	30
3.11	RESPOSTA TH17.....	33
3.12	RESPOSTA TH22	36
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	40
5.2	AMOSTRA	40
5.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	41
5.4	IMUNOISTOQUÍMICA	41
5.5	ANÁLISE QUANTITATIVA	42
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6	RESULTADOS	43
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES	63
	ANEXOS	69

1 – INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular que provoca perda da sensibilidade, inervação e lesões desmielinizantes nas células de Schwann (THAKKAR e PATEL, 2014; PASSOS et al., 2014; OGAWA e HSU, 2013; NASCIMENTO, 2013).

A forma do *M. leprae* é de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura; cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool e acetona, sendo considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, podem ser vistos tanto isoladamente quanto em agrupamentos variados ou globias, que são arranjos especiais, exclusivos do *M. leprae*, e resultam da forte união destes bacilos através de uma substância chamada gléia (GOULART, PENNA e CUNHA, 2002).

Segundo o Ministério da Saúde, o caso de hanseníase para ser tratado necessita ter um ou mais dos seguintes achados: lesão de pele com alteração de sensibilidade, espessamento de tronco nervoso ou baciloscopia positiva na pele (AJALLA, 2015).

A transmissão da hanseníase se dá por meio do convívio de uma pessoa suscetível com doentes contagiantes que não estejam fazendo o tratamento. Essa doença tem um período médio de incubação que vai de dois a sete anos, embora possa também apresentar períodos curtos de sete meses e longos de até dez anos. As vias aéreas superiores são o principal local de contato com o *M. leprae*, porém, através de uma solução de continuidade, existe a possibilidade de o bacilo penetrar pela pele (SANTOS et al., 2005).

O homem é considerado como o único reservatório natural do bacilo, apesar do relato de animais selvagens naturalmente infectados (tatus e macacos). Aqueles que possuem formas

multibacilares são considerados a principal fonte de infecção, não obstante o papel dos paucibacilares na cadeia de transmissão já ter sido demonstrado (FOSENCA et al, 2015).

A prevalência da hanseníase vem diminuindo no mundo e já foi eliminada em vários países. A ocorrência de novos casos registrados no ano tem se mantido estável. No Brasil, o Pará é considerado o estado com maior contribuição de novos casos na região Norte. Outro aspecto que preocupa é a prevalência oculta, definida como os casos novos esperados que não estão sendo diagnosticados ou o são tardiamente (NEVES, 2008).

Clinicamente, a doença é caracterizada por apresentar um amplo espectro de formas clínicas que são desenvolvidas a partir das alterações imunológicas provocadas no sistema de defesa do hospedeiro (DEGANG et al., 2014).

Segundo a classificação de Ridley & Jopling, a hanseníase apresenta cinco formas clínicas que perpassam pelos polos de transição borderline tuberculóide (BT), borderline virchowviana (BV), de instabilidade borderline borderline (BB), de resistência tuberculóide (TT), e o de suscetibilidade virchowviana (VV) (RIDLEY e JOPLING, 1966).

Estudos mostram que a forma clínica expressa pelo paciente pode estar relacionada ao tipo e quantidade de determinadas citocinas no local de infecção. Não se pode deixar de citar a predisposição genética do indivíduo, tanto na suscetibilidade quanto na resistência à infecção. Hoje, está aceita a teoria que genes modificam a suscetibilidade à doença em pelo menos dois momentos distintos: no controle da infecção per se, isto é, a doença independentemente de sua forma de manifestação clínica; e, uma vez o indivíduo infectado, na definição das diferentes formas clínicas da doença (NEVES, 2008).

Sobre o espectro imunológico da hanseníase, existem as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais, que são caracterizadas por fenômenos inflamatórios agudos, localizados ou sistêmicos, os quais ocorrem comumente antes, durante ou após o tratamento

específico da doença. Elas estão relacionadas com a carga bacilar e a resposta imunológica do hospedeiro, podendo ser classificadas em dois tipos: reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), de acordo com Jopling (LIMA, 2008).

O *M. leprae* é um bacilo com alto poder infectante e baixo poder patogênico. Depois da sua entrada no organismo, não ocorrendo a sua destruição, ele irá se localizar na célula de Schwann e na pele. Sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, nas quais o agente infectante não encontra resistência contra a sua multiplicação. Nesse caso, os linfonodos, olhos, testículos e fígado podem abrigar grande quantidade do bacilo. (MATOS, 2015)

Entre os aspectos imunopatológicos da hanseníase sabe-se que apesar da produção de anticorpos específicos contra o *M. leprae*, em grande quantidade nas formas multibacilares, ela é ineficaz para a eliminação dos bacilos. A defesa é efetuada pela resposta imunológica celular, capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada por citocinas (TNF-alfa, IFN- gama) e mediadores da oxidação, como os reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos (ARAÚJO, 2003).

Por se tratar de uma doença crônica, durante a evolução espectral os estudos têm demonstrado que o sistema imunológico do hospedeiro manifesta uma série de respostas mediadas por vários subtipos de células T-helper (Th), que induzem a produção de citocinas que podem conter ou induzir a proliferação bacilar, desencadeando a resposta inflamatória, ou supressora favorecendo a persistência da infecção (MAGOMBEDZE et al., 2013; SAINI, RAMESH e NATH, 2013; PALERMO et al., 2012).

O conceito de longa data de uma dicotomia Th1-Th2 na hanseníase, com Th1 predominante tuberculóide e Th2 predominante hanseníase virchowiana, recentemente foi contestada, e a superexpressão de CB1-b pode emergir como um fator importante na anergia e

progressão da VV. Além disso, a resposta Th22 foi identificada como moduladora de Th1-Th2 em doenças de pele inflamatórias, em especial na psoríase, mas os seus papéis na hanseníase ainda não foram elucidados (FISCHER et al., 2012).

Na hanseníase, até o presente momento ainda não foram encontrados relatos sobre a participação da resposta Th22 durante a imunopatogenia da doença. Dessa forma, por compreender que esta seja uma nova alternativa de entendimento do comportamento da resposta imunológica durante a evolução espectral da doença, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta de citocinas que participam da resposta Th22 nas formas polares da doença por meio da imunistoquímica.

2 – JUSTIFICATIVA

A hanseníase no Brasil ainda se apresenta como um problema de Saúde Pública a ser equacionado. A situação epidemiológica da doença no país é considerada heterogênea devido à grande variação do coeficiente de prevalência nas diversas regiões do país (BRASIL, 2005).

As reações hansênicas são responsáveis pela maioria dos casos de internação na hanseníase e também pelas incapacidades físicas que podem surgir no decorrer da doença crônica. A identificação de marcadores moleculares, imunológicos e genéticos das reações hansênicas pode contribuir para diagnóstico precoce e para o desenvolvimento de estratégias profiláticas nos pacientes de maior risco. A implementação destas medidas poderá contribuir para a prevenção de lesão neural e incapacidades permanentes características da hanseníase (SOUSA, 2009).

Diversas evidências indicam a existência e importância de fatores moleculares, imunológicos e genéticos potencialmente associados à ocorrência de reações hansênicas (SOUSA, 2009.)

A imunopatogênese da doença está bem caracterizada quanto ao papel de células do perfil Th1, Th2 e Th17, entretanto, estudos adicionais para caracterização de novos perfis ainda carecem de elucidação. Com a finalidade de contribuir para o conhecimento da imunologia da hanseníase, este trabalho busca conhecer melhor como o organismo humano responde a essa doença, em relação à resposta Th22. Esse conhecimento pode auxiliar o processo de formulação, implementação e reorientação de medidas de controle para redução deste agravo.

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Etiologia

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, que compromete, principalmente, locais como a pele, mucosas e sistema nervoso periférico. O agente etiológico, *M. leprae*, foi identificado por Gerhard Hansen em 1873. Antes, era chamado de Bacilo de Hansen (ALBUQUERQUE et al., 2015).

Em esfregaços, ele é corado em vermelho com fucsina usando o método de Ziehl-Neelsen, e, por causa de seu alto teor lipídico, não se descora quando lavado com álcool e ácido, mostrando assim as características de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). O *M. leprae* é diferente de outras micobactérias em termos de arranjo, uma vez que se organiza em cadeias paralelas. Quanto ao método de coloração de Gram, ele aparece como gram-positivo (LASTORIA e ABREU, 2014).

O *M. leprae* infecta, principalmente, macrófagos e células de Schwann. Sua reprodução ocorre por fissão binária e se divide lentamente. A temperatura requerida para a sobrevivência e proliferação está entre 27 e 30°C. Isso explica a alta incidência em áreas mais superficiais, como a pele, nervos periféricos, testículos e vias aéreas superiores. Além disso, este bacilo permanece viável por nove dias no meio-ambiente (LASTORIA e ABREU, 2014).

No entanto, a etiologia da hanseníase não é única do Brasil. O estudo de Han e colaboradores (2014) demonstrou que de 46 pacientes, 36 estavam infectados por *M. leprae*, sete por *Mycobacterium lepromatosis*, e três pelos dois bacilos. Os sete pacientes infectados só pelo *M. lepromatosis* tiveram, todos, hanseníase tuberculóide, enquanto somente nove dos 36 infectados por *M. leprae* desenvolveram essa forma clínica, o resto foi para o polo virchowiano.

Desde a descoberta dessa nova espécie, vários estudos vêm sendo realizados para conhecê-la. Acabou-se por descobrir que ela está relacionada com o Fenômeno de Lúcio e o eritema necrotizante, sendo, ainda, muito semelhante geneticamente com o *M. leprae*, sugerindo que, no passado, elas derivaram de uma espécie em comum (KOWALSKA e KOWALIK, 2012).

3.2. Epidemiologia

A hanseníase constitui uma das endemias mais antigas de que se tem notícia. Na própria Bíblia há relatos de casos dessa doença, com o nome de lepra, como era conhecida antigamente (SOUZA et al., 2014).

Essa doença é endêmica em países tropicais, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Sua prevalência diminuiu acentuadamente desde a introdução da terapia com múltiplas drogas, no início da década de 1980. No entanto, 105 países endêmicos, especificamente localizados no Sudeste Asiático, nas Américas, África, Pacífico Oriental e Ocidental do Mediterrâneo, ainda concentram um grande número de casos. Em 2011, 219.075 novos casos foram detectados no mundo. No primeiro trimestre de 2012, 181.941 novos casos foram registrados e houve uma prevalência de 0,34 casos por 10.000 habitantes. (WHO, 2012).

O Brasil não conseguiu eliminar a hanseníase até hoje, como problema de saúde pública (a eliminação é definida pela prevalência inferior a 1 caso por 10.000 habitantes), sendo o segundo no ranking em termos de número absoluto de casos, somente atrás da Índia, que se encontra em primeiro lugar (LASTORIA e ABREU, 2014). O território brasileiro tem uma taxa de prevalência de 17,17 casos por 100.000 habitantes, entre as Unidades da Federação, a mais endêmica foi o estado de Mato Grosso, com 80,3 casos novos por 100 mil habitantes em 2012, enquanto a menos endêmica foi o Rio Grande do Sul, com 1,4 casos por

100 mil habitantes. Enquanto isso, o Pará teve uma média de 50,01 casos por 100 mil habitantes, configurando o 5º lugar com mais casos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

3.3. Classificações das formas clínicas

A classificação de Ridley & Jopling é a mais recomendada nos estudos imunológicos. Baseia-se no critério histopatológico e sugere a possibilidade de as formas oscilarem no espectro da doença, ora para o polo de resistência (tuberculóide), ora para o polo de suscetibilidade (virchowiano). Os subtipos são TT (tuberculóide), BT (borderline tuberculóide), BB (borderline borderline), BV (borderline virchowiano) e VV (virchowiano) (RIDLEY e JOPLING, 1966).

Também existem outras formas de classificação, como a de Madrid, que leva em consideração os aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos, dividindo as várias formas em indeterminada, tuberculóide, dimorfa e lepromatosa, sendo consideradas as formas indeterminada e dimorfa grupos instáveis, podendo variar a forma clínica, e as tuberculóide e lepromatosa estáveis (INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, 1953).

Além dessas, existe a classificação operacional criada pela OMS, que leva em consideração apenas o número de lesões dermatológicas, é a utilizada, atualmente, no Brasil para definir tratamento. Aqueles que possuem até 05 lesões são considerados paucibacilares; os que possuem mais são considerados multibacilares (WHO, 1988).

3.4. Manifestações clínicas

As formas clínicas da hanseníase apresentam distribuição espectral que está associada a alterações imunológicas do hospedeiro. O grupo indeterminado (I) apresenta, geralmente, uma lesão hipocrômica com pequena diminuição da sensibilidade, no entanto, sem aumento da espessura de nervos. Na forma tuberculóide (TT) a doença é limitada por haver uma boa

resposta do hospedeiro ao *M. leprae* levando o paciente a apresentar uma única ou poucas lesões assimétricas em placas eritematosas com bordas elevadas e centro hipocrômico tendendo à cura (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

Na forma virchowviana (VV) a resposta celular ao bacilo está ausente, anticorpos são produzidos, mas, não impedem a proliferação do *M. leprae*. As lesões tendem a ser múltiplas e simétricas, preferencialmente, em áreas mais frias do corpo, e caracterizadas por serem eritematosas, hipocrômicas ou marrom brilhante de limites imprecisos, podendo ou não ter perda de sensibilidade. Às vezes, o único sinal é o ressecamento de pele. Na evolução, podem aparecer lesões infiltradas formando nódulos, os hansenomas e o fâscies leonina, caracterizado por infiltração difusa e madarose (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

Entre os dois polos extremos existem as formas intermediárias ou borderlines (B) que são consideradas formas instáveis porque exibem características entre as TT e VV. Essas formas são a borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-virchowviana (BV), e as três formas mostram uma gradual diminuição na resposta imunológica celular ao bacilo. Essas formas clínicas podem tanto oscilarem ou se manterem estáveis, mas são mutuamente incompatíveis (SOUZA-SANTANA et al., 2015).

Nessas formas clínicas podem acontecer as reações hansênicas. A reação do tipo 1 ou reação reversa (RR) afeta principalmente os pacientes BV, BB e BT e está associada à aquisição espontânea de imunidade celular contra o *M. leprae*. A reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) ocorre em pacientes multibacilares (BV ou VV) com pouca resposta imunológica e está relacionada à deposição de imunocomplexos contra os antígenos do bacilo. As reações do tipo 1 e 2 afetam cerca 30% e 50% dos pacientes, respectivamente, e causaram bastante sofrimento e sequelas (SOUZA-SANTANA et al., 2015).

3.5. Histopatologia

A coloração de lâminas histológicas pelo método da hematoxilina-eosina e Fite-Faraco, que identifica BAAR's, são fundamentais para o diagnóstico histológico da hanseníase. No grupo indeterminado, observa-se infiltrado inflamatório inespecífico, com predomínio de linfócitos, perianexial e perineural e os bacilos estão ausentes ou são raros (LASTÓRIA e ABREU, 2012).

A forma tuberculóide exhibe granulomas organizados, estendendo-se da derme profunda à camada basal, constituídos por células epitelióides e gigantes multinucleadas de Langhans, com um manto linfocítico ao redor. Frequentemente há fibras nervosas destruídas e os bacilos continuam ausentes ou raros (PINQUIER et al., 2011). Já na forma virchowiana, evidencia-se granulomas histiocitários, com alteração lipídica formando células espumosas vacuolizadas, ricas em bacilos, formando globias. A população de linfócitos é restrita. A epiderme está achatada e separada do infiltrado inflamatório por fibras colágenas (faixa de Unna) (PIRIS, LOBO e MOSCHELLA, 2010).

A distinção entre um subgrupo dimorfo de maior para outro de menor resistência baseia-se na indiferenciação progressiva dos macrófagos, diminuição do número de linfócitos e aumento do número de bacilos (PINQUIER et al., 2011).

Nas reações tipo 1, reação reversa, os granulomas são organizados, com aumento do número de linfócitos, células epitelióides e gigantes. Há redução da carga bacilar e diminuição ou desaparecimento de bacilos íntegros. A agressão neural é mais intensa (PIRIS, LOBO e MOSCHELLA, 2010). No eritema nodoso hansênico, observa-se congestão vascular, exsudação de neutrófilos polimorfonucleares nos tecidos previamente infiltrados e predominância de bacilos granulosos. Na variante necrotizante, podem-se encontrar trombos intravasculares (LASTÓRIA e ABREU, 2012).

3.6. Neuropatia periférica

A neuropatia periférica é a principal causa de morbidade na hanseníase, sendo responsável pelas deformidades e deficiências apresentadas por muitos portadores da doença (MENDONÇA et al., 2008). A mononeurite é a forma mais comum de apresentação da hanseníase, sendo os nervos dos membros superiores mais frequentemente atingidos. O envolvimento cutâneo cursa com lesões desfigurantes, sendo estas responsáveis pelo estigma que a doença ainda acarreta (VEIGA et al., 2015).

De forma sumária pode dizer-se que, no processo de infecção e subsequente destruição nervosa, o bacilo invade o nervo, resultando numa resposta imunológica promovida pelas células de Schwann com desmielinização, degenerescência axonal e posterior regeneração com fibrose tornando os nervos espessados e, por isso, frequentemente palpáveis. O próprio tratamento pode provocar uma resposta inflamatória exacerbada com destruição dos nervos (VEIGA et al., 2015).

A neuropatia hansênica é uma condição crônica. O seu desenvolvimento depende, principalmente, de três fatores: a resposta imunológica do indivíduo a uma infecção, que determina os tipos de reações que levam à neurite (isto é, reação tipo 1 nos BB, BT e TT e tipo 2 nos VV e BV); a dimensão espacial da infecção, que está relacionada com o número e a parte preferencial do nervo periférico afetada; e a dimensão temporal, que está relacionada com o perfil do tempo de progressão da doença (evolução lenta e crônica ou ataques agudos) (RAICHER et al., 2016).

As síndromes neurológicas clássicas descritas na literatura são: neurite associada ou não a reações, síndromes compressivas, neurite silenciosa ou mononeuropatia. Essas apresentações clínicas podem ou não ser acompanhada de dor neuropática. A dor nociceptiva também pode estar presente em casos de lesão aguda do nervo resultante do envolvimento da

vasa nervorum, mas este tipo de síndrome dolorosa parece diminuir de intensidade na medida em que a injúria neural progride e se torna crônica (RAICHER et al., 2016).

Em um estudo realizado na “Colônia do Prata”, no Pará, foi observado que a chance dos pacientes evoluírem com algum grau de incapacidade neurológica era maior para homens, que adoeceram depois dos 15 anos de idade e que desenvolveram a forma clínica multibacilar. Já os pacientes que não possuíam qualquer grau de incapacidade eram os que apresentavam a forma indeterminada, enquanto os que demonstravam algum grau de incapacidade tinham, essencialmente, a forma clínica virchowiana (XAVIER et al, 2014).

3.7. Suscetibilidade Genética à Hanseníase

A hanseníase é uma doença de cronicidade longa e embora se reconheça a relativa baixa infectividade da doença, pouco se sabe sobre os fatores que potencialmente influenciariam a sua suscetibilidade. Há muito tempo acreditava-se que a hanseníase era influenciada por fatores genéticos. Entretanto, os primeiros estudos só começaram após registros do mal de Hansen em irmãos gêmeos. Foi feito um grande estudo com gêmeos indianos, que indicou a participação de fatores genéticos tanto na suscetibilidade à doença propriamente dita, quanto às diferentes formas clínicas (CHAKRAVARTTI e VOGEL, 1973; MIRA et al., 2006).

A diversidade genômica baixa entre isolados de *M. leprae* também sugere que a determinação clínica da doença se deva mais à constituição genética do hospedeiro do que aos fatores bacterianos. Porém, como não há um modelo animal relevante para o estudo da doença, que permita o estudo do efeito de manipulação gênica (genética reversa), a genética clássica (*forward genetics*) é a maneira utilizada na procura por genes que possam estar relacionados aos fenótipos de suscetibilidade ou de desenvolvimento da doença. As pesquisas nessa área seguem duas estratégias: uma delas se baseia na formulação de hipótese, com base em conhecimento prévio da doença ou de doença semelhante, que dirige a escolha de genes

candidatos a serem examinados em pacientes e controles. Outra é a abordagem de extenso rastreamento genômico inicial em pacientes e controles, cuja análise propicia a formulação de uma hipótese, que será base para estudos funcionais subsequentes, como os de expressão gênica diferencial (ALCAIS et al., 2005). Essas pesquisas, dependendo do propósito, podem usar amostras populacionais ou de membros familiares.

Atualmente, grande parte dos estudos procura genes candidatos, buscando explicar os fatores genéticos que influenciariam de alguma forma a infecção e o desenvolvimento da doença, isto é, que estariam associados com a doença ou de alguma forma relacionados com os fenótipos da hanseníase.

Os genes *HLA* (6q21) do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) foram os primeiros para os quais se sugeriu associação com a hanseníase. Muitos estudos ainda estão sendo desenvolvidos tendo os genes deste complexo como candidatos, visando elucidar essa associação, enfatizando principalmente o desenvolvimento das formas clínicas da doença, que se relacionam a eles por ser diretamente dependente das respostas Th1 e Th2 (PREVEDELLO e MIRA, 2007).

Dentre os genes do MHC para os quais já foi achada associação, podemos citar: *micA* (FITNESS, TOSH e HILL, 2002) e *micB*, que são genes MHC de classe I, relacionados com a produção de polipeptídeos expressos na membrana e atuam como co-fatores para aumentar tanto a ativação de células T, como o seu reconhecimento por células NK. Na região do MHC de classe II, temos os genes *HLA: DR2* (VISENTAINET et al., 1997); *DQB1*, *DQA1* e *DRB1* que estariam interferindo na produção de interleucina 4 (SHAW et al., 2001).

A região do MHC de classe III, os genes produtores da linfotoxina alfa (*LTA*) e do TNF- α são exemplos de genes já estudados. A LTA, substância produzida pelos linfócitos e pelas células NK, é responsável pela regulação da resposta inflamatória. O TNF- α condiciona a síntese da proteína TNF α , que está associada à ativação de macrófagos, à morte do *M.*

leprae no interior da célula, à apresentação de antígenos e à modulação da produção de citocinas, que atuam no recrutamento dos leucócitos e na formação de granulomas. De alguma forma, variantes menos funcionais desses genes de classe III levariam a uma menor ativação macrofágica e ao desenvolvimento da doença por não ocorrer a morte do *M. leprae*. A deficiência de *C4B* – componente do complemento 4B, 6p21.3, também foi associada com eritema nodoso em pacientes com a hanseníase virchowviana (MESSIAS et al., 2008).

Associações entre hanseníase e variantes de genes, que não pertencem ao MHC, também foram detectadas: *VDR* – receptor de vitamina D, 12q13.11 (ROY et al., 1999); *nramp1* (natural resistance-associated macrophage protein) atualmente denominado de *SLC11A1* – membro 1 da família 11 carreadora de sódio/fosfato, 2q35 (ABEL et al., 1998; ALCAIS et al., 2000); *TAP2* – transportador 2, *ATP-binding cassette*, 6p21.3 (RAJALINGAM, SINGAL e MEHRA, 1997), *TLR2* – *toll-like* receptor 2, 4q32 (KANG e CHAE, 2001).

O gene *nramp1* é um dos genes associados à suscetibilidade do hospedeiro à infecção com *M. leprae*. Ele codifica uma proteína integral de membrana de 60 kDa, com 12 domínios transmembrânicos, que se localiza em fagolisossomas de macrófagos. A proteína possui vários sítios de fosforilação e alças extracelulares glicosiladas. Há evidências de que sua função seja de canal iônico, transportando íons divalentes através da membrana (ABEL et al., 1998; MEISNER et al., 2001; REMUS, ALCAIS e ABEL, 2003).

A proteína NRAMP1 também atua no transporte de íons para fora do fagolisossoma, o qual é dependente de pH. O decréscimo do conteúdo iônico dentro do fagolisossoma, principalmente ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), controlaria a proliferação de micro-organismos intracelulares em fagócitos, já que os patógenos utilizam estes íons como cofatores para a replicação do DNA, produção de importantes enzimas para seu metabolismo

e para neutralização de componentes tóxicos do fagolisossoma e também expressão de diferentes fatores de virulência (GRUENHEID, 1997; FORBES e GROS, 2001).

Modelos experimentais demonstram a existência de um gene dominante envolvido com resistência para infecção com micobactérias, sendo que esse gene existe em duas formas alélicas, *bcgr* e *bcgs*. O alelo *bcgr* confere resistência e é mais dominante que o alelo *bcgs*, o qual representa grande vulnerabilidade para infecção. O gene candidato murino para o gene *bcg* foi chamado de *nramp*. Esse gene atua preferencialmente em macrófagos conferindo capacidade bacteriostática aumentada nestas células. O *nramp1* é estruturalmente homólogo à família das proteínas de membrana com função transportadora ligada ao ATP e semelhante ao sistema bacteriano de membrana que transporta nitritos. A proteína NRAMP está também envolvida com um sinal de transdução durante a ativação de macrófagos e isso justifica o polimorfismo genético neste locus de intervenção na resposta imune específica primária ou inata, porém não específica à infecção, já que esta última é determinada pelo polimorfismo de moléculas de HLA de classe II, que interviriam na evolução da resposta imunológica secundária ao *M. leprae* (LAGRANGE e ABEL, 1996).

Lagrange e Abel (1996) descrevem o papel primordial do sistema HLA em controlar imunidade mediada por células, sugerindo a probabilidade de que diferenças em haplótipos de HLA contribuiriam com o largo espectro da resposta imunológica observada na hanseníase, sendo bem conhecido que isótopos HLA-DR estão associados com resposta protetora, enquanto que isótopos HLA-DQ estão associados com formas de hanseníase multibacilar. Os autores afirmaram que, em virtude dos complexos mecanismos de resistência já bem conhecidos e pelos quais, no mínimo, acredita-se que dois *loci* contribuem, os determinantes genéticos de resistência à hanseníase devem ser retestados por meio de um complexo multifatorial, no qual, eventos ambientais associados à transmissão do *M. leprae*, sua duração,

intensidade e fatores do hospedeiro, variando no tempo, possam estar intervindo na infecção com *M. leprae*.

Em um estudo realizado para avaliar e identificar a estrutura e correlação (genética, doméstica ou espacial) que fornece a melhor explicação para a distribuição de pacientes hansênicos e pessoas soropositivas para antígeno específico do *M. leprae* e quantificaram o papel de fatores genéticos na ocorrência da hanseníase e positividade ao anti-PGL-I. O principal achado deste estudo demonstrou que para hanseníase multibacilar, os fatores genéticos foram mais importantes que para hanseníase paucibacilar. Positividade foi melhor explicada pelo modelo espacial, mas o modelo genético também foi significativo. O fator hereditariedade teve uma proporção de 57% para hanseníase em si e 31% para positividade. O autor concluiu que fatores genéticos parecem ter importante papel no agrupamento de pacientes com formas mais avançadas de hanseníase, os quais poderiam explicar mais da metade da variação fenotípica total (BAKKER, 2005).

Diversas pesquisas concordam com a afirmação de que o gene humano *nramp1*, homólogo do gene murino *nramp1*, está envolvido com suscetibilidade e ou resistência à infecção com patógenos intramacrofágicos, entre eles, o *M. leprae* (MEISNER et al., 2001; REMUS, ALCAIS e ABEL, 2003).

Também foram realizados rastreamentos genômicos em regiões cromossômicas candidatas, que mostraram correlação com as formas clínicas ou a doença *per se*. As regiões identificadas foram: 6p21.32 e 17q11-q21 e a região 6q25-q27 (MILLER et al., 2004; MIRA et al., 2004).

Mira e colaboradores (2003) fizeram um extenso rastreamento genômico em uma população vietnamita e identificaram um novo *loco* relacionado com a suscetibilidade à hanseníase, localizado na região cromossômica 6q25-q27. O mesmo trabalho confirmou, na

população vietnamita, a existência de um *loco* na região cromossômica 10p13 atuando como modificador e associado com a forma paucibacilar da doença.

Outro rastreamento genômico já tinha identificado esse *loco*, realizado em uma amostra de famílias da Índia com pacientes paucibacilares, mas não havia ficado claro se a associação era com a suscetibilidade à doença propriamente dita ou se influenciaria sua forma clínica (SIDDIQUI et al., 2001).

O desenvolvimento de um mapa de desequilíbrio de ligação do segmento genômico, localizado sob o pico de *escores lod*, resultante de análise de ligação com dados da região cromossômica 6q25-q27, levou à identificação de um bloco de 80 kb, em desequilíbrio de ligação, contendo variantes genéticas de dois genes, *park2* e *pacrg*, envolvidas no controle da suscetibilidade à hanseníase *per se* na população vietnamita. O achado foi replicado e confirmado em um amplo estudo caso-controle em uma amostra populacional brasileira (MIRA et al., 2004). Esse estudo mostrou, pela primeira vez, que pesquisas sistemáticas de associação, considerando genes candidatos localizados em regiões previamente identificadas por rastreamentos genômicos, podem ser úteis para a descoberta de novos genes associados a doenças infecciosas (MIRA et al., 2003).

3.8. Respostas inata e adquirida

A resposta imune inata é o início da defesa contra agentes patogênicos externos. O *M. leprae* infecta, primeiramente, macrófagos, células dendríticas e células de Schwann. Na hanseníase, os receptores para os fragmentos do complemento CR1, CR3 e CR4 ajudam na fagocitose do bacilo. O sistema complemento reconhece o glicolípido-fenólico 1 (PGL1), um lípido específico da parede do *Mycobacterium leprae*. (NATH, SAINI e VALLURI, 2015).

Os receptores semelhantes à Toll (TLRs) são uma família que se liga a lipoproteínas. O TLR2 e 4 reconhecem o *M. leprae* e ativam os monócitos e libera IL-12, uma citocina que

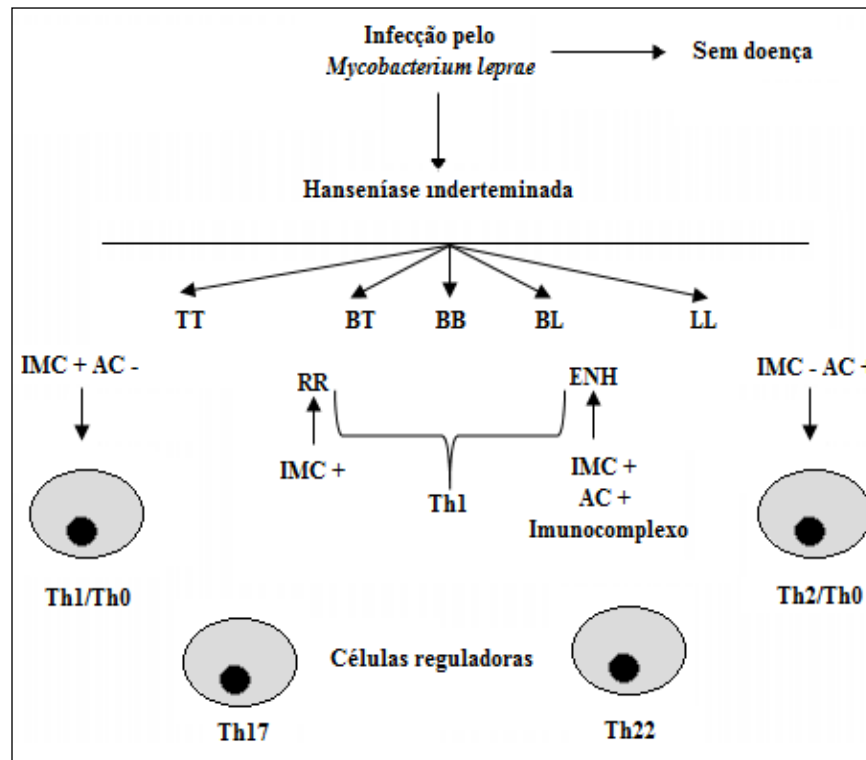
induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e destrói o agente infeccioso. Outras citocinas, como o IFN- γ e o GM-CSF, aumentam a expressão de TLR1 que conduz a inflamação através da produção de TNF α . O PGL1 diminui a produção de TNF α , IL1 β , e IL-10. A sobreposição da resposta inata com resposta adquirida mostrou que IL-4, uma citocina Th 2, e a IL-10 desempenham um papel regulador negativo fazem *downregulation* da expressão de TLR2 e da produção de citocinas (NATH, SAINI e VALLURI, 2015).

A resposta imune adaptativa envolve uma interação entre os linfócitos, células dendríticas, macrófagos e outros fatores como anticorpos, que capturam os bacilos livres e citocinas que atravessam as membranas das células para causar danos em patógenos intracelulares. Os pacientes com hanseníase mostram uma dicotomia entre a resposta mediada por células B e T. Enquanto os pacientes tuberculóides mostram níveis indetectáveis de anticorpos e uma boa resposta por células T, os virchowvianos têm elevadas taxas de anticorpos, mas pouca ou nenhuma resposta por células T (SILVA, 2016).

Os linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th) são responsáveis por direcionar os diversos tipos de resposta imune. Eles são subdivididos de acordo com sua função e pelo tipo de resposta que desencadeiam. Após a apresentação de antígenos por uma célula apresentadora de antígenos a um linfócito virgem, este passa a ser chamado de linfócito T auxiliar tipo 0 (Th0), pois ainda não sofreu diferenciação (BRAGA, 2014).

Após essa apresentação, ele pode se diferenciar para os perfis padrão tipo 1 (Th1) e padrão tipo 2 (Th2) ou outro dos subtipos identificados mais recentemente como Th17, Th9 e Th22; esses subtipos de linfócitos T CD4⁺ são morfologicamente indistinguíveis, porém, apresentam padrões distintos de produção de citocinas e, conseqüentemente, diferentes respostas efetoras (BRAGA, 2014). Um sumário dos aspectos imunológicos básicos se encontra na Figura 1.

Figura 1: Fatores imunológicos no espectro da hanseníase (Classificação de Ridley e Jopling) e reações hansênicas.



TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase borderline-tuberculóide; BB: hanseníase borderline-borderline; BV: hanseníase borderline-virchowviana; VV: hanseníase virchowviana; RR: reação reversa (reação tipo 1); ENH: eritema nodoso hansênico (reação tipo 2); Th1: T helper 1; Th2: T helper 2; Th0: T helper 0; Th17: Célula T helper produzindo IL-17; Th22: Célula T helper produzindo IL-22; IMC: imunidade mediada por células; AC: anticorpos.

Fonte: Adaptado de Nath, Saini e Valluri, 2015.

3.9. Respostas Th1 x Th2

As células T helper 1 e 2 são originadas de linfócitos Th0 indiferenciados através da influência de IFN- γ e IL-4, respectivamente. Células do tipo 1 CD4⁺ (Th1) produzem várias citocinas inflamatórias, incluindo IFN- γ , IL-2, TNF- α e a maioria dos efetores da defesa mediada por células, protegendo contra patógenos intracelulares. Já as células do tipo 2 CD4⁺ (Th2) produzem IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IL-6. Enquanto a IL-4 e a IL-10 são consideradas

citocinas anti-inflamatórias, a IL-6 tem propriedades pró-inflamatórias. Embora a IL-10 e a IL-6 sejam frequentemente referenciada como citocinas Th2, elas também são produzidas por outras células, incluindo Th1, macrófagos e linfócitos B. As citocinas Th2 são comumente associadas com uma forte resposta mediada por anticorpos, por exemplo, a IL-4 simula a produção de anticorpos IgE e IgG1 (SYKES et al., 2012).

Nos pacientes com a forma clínica tuberculóide, os linfócitos T CD4⁺ liberam citocinas do perfil Th1, incluindo o IFN- γ , que é responsável por estimular a ativação de macrófagos levando a produção de agentes microbicidas derivados de oxigênio e nitrogênio e aumento na expressão das moléculas HLA-DR. O IFN- γ também faz com que haja a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que promove a interação célula-célula e da IL-2, responsável pela expansão clonal de linfócitos T antígenos-específicos. A interleucina-12 (IL-12), produzida por macrófagos e células dendríticas, estimula a diferenciação de subpopulações de linfócitos Th1, especializados na destruição de patógenos intracelulares como o *M. leprae* através da resposta imunológica mediada por células (BRAGA, 2014).

Já os pacientes virchowianos apresentam, predominantemente, linfócitos com resposta Th2, liberando citocinas como a IL-4, responsável pela produção de anticorpos, ativação de linfócitos B, inibição da ativação de macrófagos, aumento de anticorpos contra glicolipídios do bacilo e proliferação de linfócitos do perfil Th2. Outra citocina característica deste polo é a IL-10, que possui um papel supressivo, por inibir a proliferação de linfócitos T de perfil Th1 e a liberação de citocinas que induzem respostas antimicrobianas (BRAGA, 2014). Um esquema representativo das duas respostas pode ser observado na Figura 2.

3.10. Atividade microbicida do macrófago contra o *M. leprae*

Embora a viabilidade do *M. leprae* seja confirmada em macrófagos de ratos normais, os macrófagos ativados por IFN- γ podem inibir ou destruir o *M. leprae in vitro* (RAMASEHS

et al., 1991). Estes achados confirmam que em macrófagos normais, a fusão do fagolisossomo com lisossomo é bloqueada pela sobrevivência, não pela morte do *M. leprae* (SIBLEY, FRANZBLAU e KRAHENBUHL, 1987) e, mais importante, que em macrófagos ativados, os fagossomos fundidos com lisossomos secundários abrigam *M. leprae*. Duas importantes vias antimicrobianas pelas quais os macrófagos podem inibir ou destruir patógenos invasores são: a geração de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e a ação microbicida dos lisossomos (JANEWAY, TRAVERS e WALPORT, 2001).

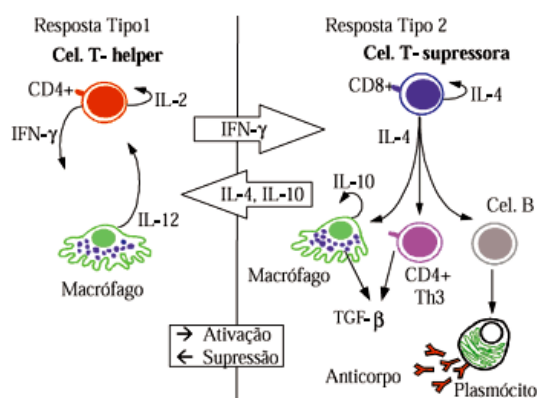
A fagocitose de microrganismos por macrófagos produz uma explosão respiratória com grande aumento no consumo do oxigênio catalisado pela NADPH oxidase e a produção de superóxido. Outros intermediários reativos do oxigênio, incluindo o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e o oxigênio, são subsequentemente gerados. Esses produtos tóxicos do oxigênio são importantes mecanismos de defesa antimicrobianos de células fagocitárias, especialmente contra patógenos extracelulares. O *M. leprae*, entretanto, é apenas um fraco estímulo à explosão oxidativa dos macrófagos (HOLZER et al., 1986.), possivelmente devido diminuição na geração de superóxido pelo PGL-1 (CHAN et al., 1989). O *M. leprae* também possui uma superóxido dismutase (THANGARAJ et al., 1990) e expressa ambas SodC e SodA detectadas por RT-PCR (WILLIAMS et al., 2004).

Os intermediários reativos do nitrogênio, principalmente, o óxido nítrico, são derivados do nitrogênio devido uma alta produção da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) produzida pelos macrófagos ativados. A habilidade dos macrófagos murinos ativados para inibir a atividade metabólica do *M. leprae* é dependente da geração de tais intermediários, como os macrófagos ativados cultivados na presença de inibidores competitivos da enzima, tais como L-monometilarginina ou aminoguanidina, não possuindo efeito prejudicial sobre o metabolismo bacteriano (ADAMS et al., 1991).

A iNOS é expressa por células inflamatórias por meio de estímulos de substâncias como os lipopolissacarídeos (LPS), fragmentos antigênicos de micobactérias, fungos e protozoários, e por citocinas inflamatórias e/ou imunorreguladoras como IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ . Em contrapartida, as citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador do crescimento β (TGF- β) inibem a expressão de iNOS e conseqüente produção de NO por macrófagos *in vitro* (LIEW, 1993).

O NO desempenha importante papel na destruição do *M. leprae*. Avaliando a expressão de iNOS e TGF- β nas formas da hanseníase, Khanolkar e colaboradores (1998) evidenciaram forte marcação de iNOS nos pacientes TT, moderada positividade nas manifestações dimorfas com reação reversa (RR) e ausência de reatividade nas formas dimorfa tuberculóide e VV. A positividade para TGF- β foi maior nos virchowvianos, sugerindo supressão da resposta imunológica por excesso de antígeno. Nos pacientes em reação reversa, essa imunomarcação foi ausente, indicando desregulação no balanço iNOS/TGF- β . O TGF- β também foi negativo dentro dos granulomas reacionais, porém, em dois casos foi positivo no perineuro, sugerindo sua produção pelas células perineurais, como forma de defesa, já que essa citocina inibe a produção de NO. Portanto, a produção de TGF- β poderia ser responsável pela fibrose dos nervos, observada após a reação reversa.

Figura 2: Padrões de resposta Th1 e Th2 na hanseníase.



Fonte: Goulart, Penna e Cunha, 2002.

3.11. Resposta Th17

Até há pouco tempo acreditava-se que os linfócitos Th1 e Th2 seriam os únicos perfis de células efetoras da resposta imunológica, porém, recentemente, foi identificado outro grupo de células T que produzem citocinas diferentes daquelas observadas no modelo Th1-Th2. Seria então, um terceiro subtipo de células efetoras Th CD4+, caracterizadas por produzir IL-17, passando a ser chamado de células T auxiliares tipo 17, ou Th17 (ROMAGNANI, 2008). Como as células Th1 e Th2, o Th17 produz um grupo distinto de citocinas, IL-17, IL-17F, IL-6, IL-21 e IL-22, e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e tem papel tanto na inflamação tecidual quanto na ativação de neutrófilos (MIOSSEC, KORN e KUCHROO, 2009).

Estudos têm mostrado que os fatores relacionados à diferenciação das células T *naive* em Th17 são o TGF- β (*transforming growth factor β*) e a IL-6 (MIOSSEC, KORN e KUCHROO, 2009).

Interessante ressaltar que o TGF- β é uma citocina classificada como imunossupressora, e não um indutor de diferenciação de células T, porém cabe complementar que com relação às células T *naive*, ele induz à expressão do Foxp3 (*forkhead Box P3*), que é o fator transcricional das células T reguladoras (Treg), as quais têm como papel a supressão da inflamação e inibição da auto-imunidade (MIOSSEC, KORN e KUCHROO, 2009).

Como exposto anteriormente, o Th17 e as Treg estão relacionados, visto que o TGF- β induz células T *naive* a diferenciarem-se em células T supressoras, e que a IL-6 modifica o programa de transcrição iniciado pelo TGF- β de forma a induzir o desenvolvimento das células Th17 (MIOSSEC, KORN e KUCHROO, 2009).

Os trabalhos publicados têm mostrado que a resposta Th17 não controlada, ou uma grande quantidade de IL-17 produzida pelas células Th17, está associada com inflamação crônica e alterações imunológicas severas.

A IL-17 apresenta efeitos em células tais como: células dendríticas, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e condrócitos (MIOSSEC, KORN e KUCHROO, 2009).

Miossec, Korn e Kuchroo (2009) relatam que os macrófagos e as células dendríticas sob a ação da IL-17 liberam IL-1, TNF e IL-6, que apresentam efeito biológico na inflamação; já as células endoteliais produzem IL-6 e fatores de coagulação, que por fim causam alteração da perfusão, trombose e aterosclerose.

Alguns autores descrevem que a IL-17 nos fibroblastos leva à destruição da matriz de colágeno, evento observado na esclerose múltipla e na doença de Crohn (YOSHIDA et al., 2010; SCRIBA et al., 2008).

A artrite reumatóide, doença caracterizada por artrite severa com destruição das articulações sinoviais, tem na sua fisiopatologia o efeito da IL-17 sobre os osteoblastos e condrócitos, fazendo com que estas células favoreçam a erosão óssea e danos na cartilagem (YOSHIDA et al., 2010; SCRIBA et al., 2008).

Com isso, observa-se que a IL-17 é uma potente citocina com capacidade pró-inflamatória atuando em um amplo número de células.

Um grande número de agentes infecciosos induz resposta por Th17, incluindo-se as micobactérias como o *Mycobacterium tuberculosis*, e fungos como a *Candida albicans* (YOSHIDA et al., 2010; SCRIBA et al., 2008).

Scriba e colaboradores (2008) concluíram que a IL-17 e a IL-22 têm um papel fundamental na resposta humana contra as micobactérias. O linfócito Th17 também recruta

neutrófilos para os tecidos, auxiliando na formação dos granulomas, além de estimular os fibroblastos, e células epiteliais a expressarem o fator de recrutamento de neutrófilos, como IL-8 e G-CSF (MIOSSEC, KORN e KUCHROO, 2009). Estes dados e trabalhos como o de Khader e Cooper (2008), dão suporte ao papel da IL-17 na resposta imunológica ao *Mycobacterium leprae*.

Para as micobactérias, as produções de IL-17 e Th17, dependem da IL-23. Yoshida e colaboradores (2010) revelaram que a perda da associação de IL-12 e IL-23 durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* diminuía o *clearance* das bactérias concorrendo para a piora da infecção na ausência da IL-12. Embora as interleucinas 23 e 17 não sejam necessárias, a administração de IL-23 melhora a resposta imune ao *M. tuberculosis*, e a IL-17 colabora para a manutenção da inflamação.

Na hanseníase, os pólos tuberculóide e virchowviano (formas estáveis) têm seu perfil de citocinas muito bem estudado, caracterizados respectivamente por resposta Th1 e Th2 (SCOLLARD et al., 2006; MENDONÇA et al., 2008; GOULART, PENNA e CUNHA, 2002). No entanto, as formas *borderline*, são altamente instáveis e complexas, podendo o linfócito TH17 ter importante papel na imunopatologia dessas lesões.

Assim como as células de perfil TH1, TH2 e TH17 são importantes na resposta imunológica da hanseníase, as células T regulatórias (Treg) também são fundamentais na regulação da resposta imunológica e doenças inflamatórias, impedindo o processo de autoimunidade e prevenindo a lesão tecidual. Elas são constituídas pelas células T NK, células T CD4CD25 que expressam o fator de transcrição Foxp3 (ROMAGNANI, 2008; MANGAN et al., 2006; KIMURA, NAKA e KISHIMOTO, 2007).

A ativação das células Treg e Th17 efetoras depende da estimulação pelo TGF- β ou na presença do TGF- β junto com a IL-6. Quando não há o dano inflamatório o TGF- β irá

suprimir a produção de células T efetoras e estimulará células T reguladoras. Entretanto, quando existe um processo inflamatório e infeccioso a IL-6 irá suprimir a produção de células Treg e ativará células T pró-inflamatórias, principalmente células Th17 (ROMAGNANI, 2008; MANGAN et al., 2006; BETELLI et al., 2006). Dessa forma, a via de ativação de células Th17 e Treg dependem do estado do sistema imunológico inato e da produção de citocinas como a IL6. As células CD4, CD25 e Foxp3 também apresentam um papel importante na supressão de células Th17 assim como as células Th1 e Th2 (BETELLI et al., 2006; DEENICK E TANGYE, 2007).

3.12. Resposta Th22

Recentemente, evidências crescentes na literatura têm demonstrado o surgimento de um novo subtipo de célula Th que dependendo da gênese da doença, pode estar associada à resposta imunológica inflamatória. Estas células são conhecidas como células Th22 CD4⁺ e são caracterizadas por secretar isoformas da família dos FGFs e citocinas como IL-22, TNF- α , IL-13, IL-26, contudo como peculiaridade, não produzem IL-17 nem IFN- γ , e proporcionam o desenvolvimento da resposta inflamatória a partir da IL-22, citocina que pertence à família da IL-10 que pode se ligar aos receptores heterodímero de IL-22R1 e IL-10R2 em processos inflamatórios crônicos (DEGANG et al., 2014). Estas células apresentam receptores de quimiocinas como os CCR4, CCR6, CCR10 e sofrem o processo de diferenciação na presença da IL-6 e TNF- α (FURUZAWA-CARBALLEDA et al., 2014).

Na resposta tecidual envolvendo a presença das células Th22, há evidências de que os FGFs podem induzir o remodelamento ou reparo epitelial por meio da expressão de quimiocinas como CCL 7, CCL 15 e CCL 23 envolvidas na fibrose tecidual e na angiogênese. Em estudo de investigação das células Th22, foi observado que os FGFs quando associados

ao TNF- α podem induzir o desencadeamento da resposta de reparo epidérmico envolvendo os queratinócitos (EYERICH et al., 2009).

Esta resposta já foi estudada em outras doenças infecciosas como na sífilis secundária, onde as citocinas relacionadas a ela foram encontradas em elevada quantidade no sangue periférico de pacientes com esta doença, sugerindo que as células Th22 estão envolvidas na resposta imunológica ao *Treponema palidum* (ZHU et al., 2012). Em se tratando da paracoccidiodomicose, uma doença granulomatosa causada pelo fungo *Paracoccidioides braziliensis*, a resposta Th22 também esteve presente, reforçando a ideia de que estas células desempenham um papel importante na resposta inflamatória dessa e outras doenças que atingem a epiderme; além de defender contra agentes bacterianos e o fungo *Candida albicans* (CASTRO et al., 2013).

Corroborando para a importância da resposta Th22 em doenças epiteliais, o estudo de Michalak-Stoma et al. (2013) comprovou a relação entre os níveis de citocina desta resposta e a gravidade da psoríase, indicando que possa contribuir para inflamação cutânea e sistêmica. Os autores sugerem, inclusive, que tais citocinas sejam utilizadas como método de rastreamento para prevenir exacerbações da doença.

Finalmente, na tuberculose, percebe-se que a IL-22 é produzida por células T CD4+ e está presente, juntamente com outras citocinas como o IFN- γ e a IL-17, no fluido pleural em pacientes portadores de tuberculose extra-pulmonar com foco pleural, podendo refletir uma ativação na resposta imunológica local contra o *Mycobacterium tuberculosis* (QIAO et al., 2011). As principais citocinas envolvidas nas respostas associadas aos linfócitos T helper, bem como sua origem e funções, estão resumidas na Figura 3.

Figura 3: Fonte e função do TNF, IL-13, IL-22 e FGF

	Fonte	Função
TNF	Macrófagos e células T	Células endoteliais (inflamação e coagulação)
IL-13	Células T auxiliares, CD4+, células T CD8+ e células NK	Fibrose tecidual nos processos inflamatórios crônicos. VCAM-1
IL-22	Macrófagos ativados e células T reguladoras	Inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas
FGF	Macrófagos, mastócitos, linfócitos T, células endoteliais e fibroblastos	Quimiotático para fibroblastos, angiogênese e deposição de MEC

Fonte: Abbas, Lichtman e Pillai, 2015.

4 – OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Verificar a participação da resposta Th22 nas formas polares da hanseníase.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Correlacionar a imunoexpressão das citocinas IL-13, IL-22, TNF- α e do FGF- β com a forma clínica da doença;
- ✓ Avaliar se há sinergismo entre as citocinas IL-13, IL-22, TNF- α e o FGF- β nas formas clínicas da hanseníase.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todas as pessoas foram pesquisadas segundo os preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitadas as Normas de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Rs. CNS 466/12) do Conselho Nacional de Saúde. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Pará - Parecer 799.160 (APÊNDICE A).

5.2 AMOSTRA

Foram pesquisados pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical – UFPA com diagnóstico dermat imunológico de hanseníase, laudo histopatológico e pesquisa de BAAR. Ao todo, foram selecionados, por amostra de conveniência, 31 pacientes não tratados com diagnóstico confirmado para a doença segundo os critérios preconizados pela classificação de Ridley & Jopling, sendo 16 da forma clínica tuberculóides e 15 da forma virchowvianas.

Foram incluídos nesta pesquisa indivíduos de ambos os sexos, com diagnóstico clínico-epidemiológico e histopatológico e/ou baciloscópico positivo para hanseníase. Foram excluídos do presente estudo pacientes já diagnosticados com hanseníase estando sob tratamento poliquimioterápico, indivíduos com outras co-infecções associadas, apresentando sorologia positiva para HIV, uso crônico de corticóides imunossupressores, e grávidas.

Para a análise histopatológica, foram feitos cortes histológicos de 5µm de espessura de biópsias teciduais emblocadas em material parafinado submetidas a coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE), Fite-Faraco para pesquisa de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) e a imunomarcagem do tecido com os anticorpos pela técnica de imunoistoquímica.

5.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As biópsias passaram pelo processamento histológico com desidratação em cinco álcoois absolutos por uma hora, clarificação em dois xilóis por uma hora e impregnação em parafina a 65° Celsius. A seguir, os blocos de parafina foram submetidos a cortes em micrótomo manual com espessura de cinco micrômetros. Duas lâminas contendo cortes foram coradas, uma pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e outra pela coloração de Fite-Faraco, que se mostra como a melhor técnica para pesquisa de BAAR (FARACO, 1938), e montadas com lamínula para a avaliação histológica.

5.4 IMUNOISTOQUÍMICA

A imunoistoquímica para a imunomarcação do tecido com os anticorpos Anti-IL-13, IL-22, TNF- α e FGF b, foi baseada no método envolvendo a formação do complexo biotina-estreptavidina peroxidase (HSU, RAINE E FANGER, 1981). Inicialmente as amostras teciduais foram desparafinizadas em xilol e desidratadas em álcool etílico. Em seguida a peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 3% por 45 min. Após, a recuperação antigênica foi feita com tampão citrato ph 6,0 por 20 min a 90°C. Em seguida, o bloqueio das proteínas inespecíficas foi feita com leite desnatado concentrado a 10% por 30 min. Finalizada esta etapa, os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários diluídos e Soro Albumina Bovina (BSA) a 1% por 14 horas. Após este intervalo, as lâminas foram imersas em solução contendo PBS 1X e em seguida incubadas com o anticorpo secundário biotilado LSAB (DakoCytomation) em estufa por 30 min a 37°C. Em seguida as lâminas foram novamente imersas em PBS1X e incubadas com estreptavidina peroxidase (LSAB DakoCytomation) por 30min a 37°C. Após este intervalo os cortes foram revelados com a aplicação da solução cromógena composta por diaminobenzidina a 0,03% e peróxido

de hidrogênio a 3%, corados com a hematoxilina de Harris por 1 min, em seguida hidratados em álcool etílico e diafinizados em xilol.

5.5 ANÁLISE QUANTITATIVA

A quantificação da imunomarcação com os anticorpos foi feita a partir da seleção aleatória de 05 campos visualizados no microscópio AXIO IMAGER Z1- ZEISS em aumento (400 X) usando retícula graduada com 10 x 10 subdivisões e 0.0625 mm².

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com os experimentos foram armazenados em planilhas eletrônicas construídas com o programa Excel 2007. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism 5.0. Na análise univariada, foram obtidas frequências, medidas de tendência central e de dispersão e para a investigação das hipóteses foram aplicados os testes de Mann-Whitney e a correlação de Pearson.

6 – RESULTADOS

Os resultados deste estudo já foram publicados (ANEXO 1). A distribuição dos casos por sexo mostrou uma proporção mais elevada no sexo masculino (62%). Quanto à variável idade, 27,5% dos pacientes estavam na faixa etária entre 30 a 39 anos, sendo a idade média \pm desvio padrão de $40,7 \pm 6,2$ anos.

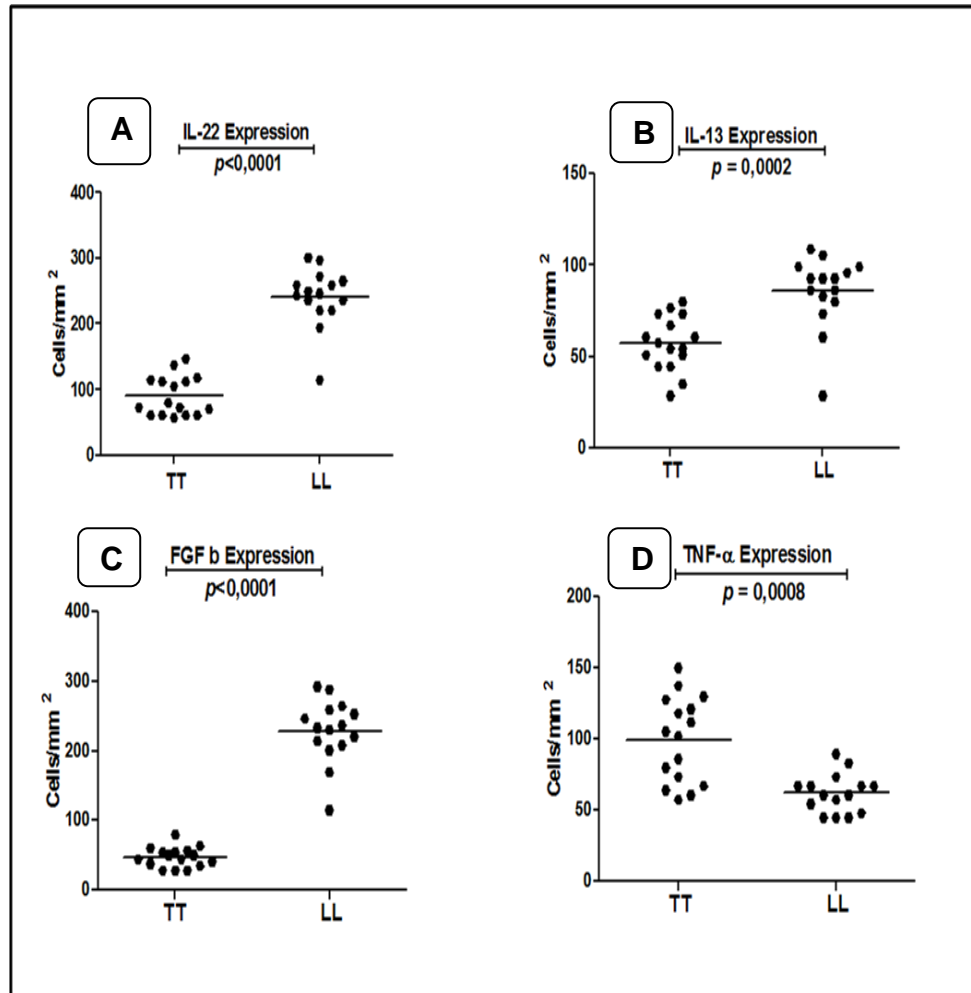
Referente à imunomarcagem para a IL-22, pode-se observar diferença estatística dentre os grupos estudados sendo que no polo VV a média encontrada foi de $241,3 \pm 44,63$ cells/mm² enquanto que na forma TT a média foi de $90,39 \pm 30,18$ cells/mm² com *p* altamente significativa $p < 0,0001$ (Figura 7A).

Envolvendo a presença da IL-13, no polo VV a média de ocorrência foi de $85,76 \pm 19,99$ cells/mm². Já no polo TT a média encontrada foi de $57,20 \pm 14,73$ cells/mm² $p = 0,0002$ (Figura 7B).

Em relação à imunoexpressão do FGF b, na forma VV, a média de ocorrência foi de $228,9 \pm 45,13$ cells/mm² enquanto que na forma TT a média foi de $47,80 \pm 14,29$ cells/mm² $p < 0,0001$ (Figura 7C).

Para o TNF- α , a análise quantitativa mostrou-se estatisticamente significativa na forma TT onde a média das células expressando a citocina foi de $99,74 \pm 30,14$ cells/mm² quando comparada a forma VV $62,08 \pm 13,67$ cells/mm² $p = 0,0008$ (Figura 7D).

Figura 7: Análise quantitativa para a imunomarcação de IL-22, IL-13, TNF- α e FGF b nas lesões de pacientes TT e VV.

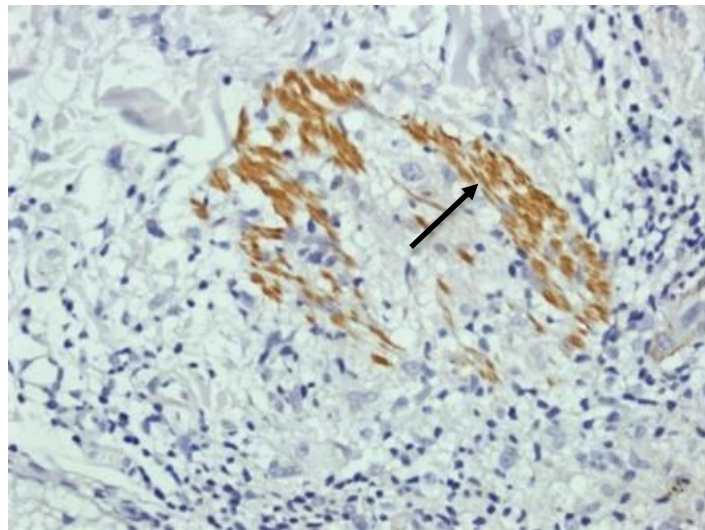


Fonte: Protocolo de pesquisa

As expressões das citocinas nas formas clínicas TT e VV estão expostas na Figura 8. Na análise paramétrica, em lesões de pacientes TT pode-se observar a correlação positiva moderada entre IL-22 e TNF- α ($r = 0,5102$, $p = 0,0435$) (Figura 9A) FGF b e TNF- α ($r = 0,5836$, $p = 0,0176$) (Figura 9B) e forte entre IL-13 e TNF- α ($r = 0,7291$, $p = 0,0014$) (Figura 9C).

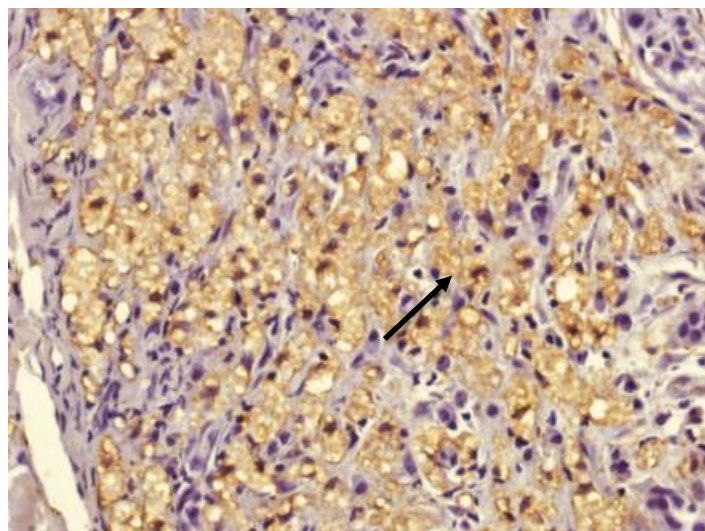
Nas lesões de pacientes VV, a análise de correlação foi positiva e moderada para a IL-22 e FGF ($r = 0,6098$, $p = 0,0158$) (Figura 9D), mantendo-se para IL-22 e IL-13 ($r = 0,5650$, $p = 0,0282$) (Figura 9E) e IL-13 e FGF ($r = 0,5424$, $p = 0,0367$) (Figura 9F).

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para IL-22 na forma TT (seta).



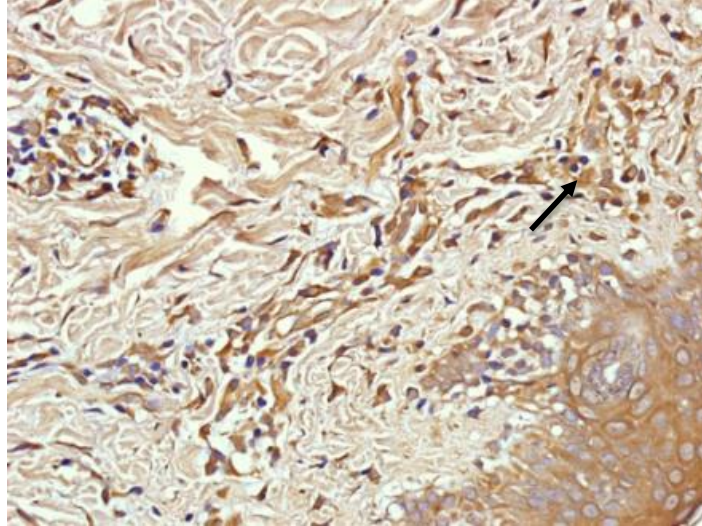
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para IL-22 na forma VV (seta).



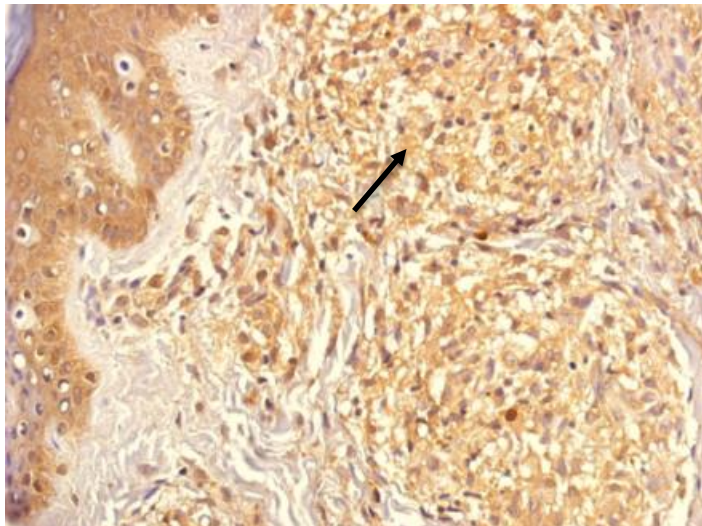
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para IL-13 na forma TT (seta)..



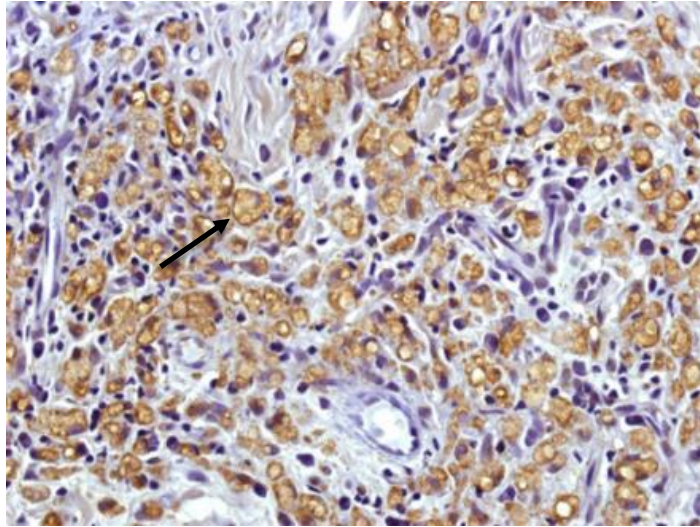
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para IL-13 na forma VV (seta).



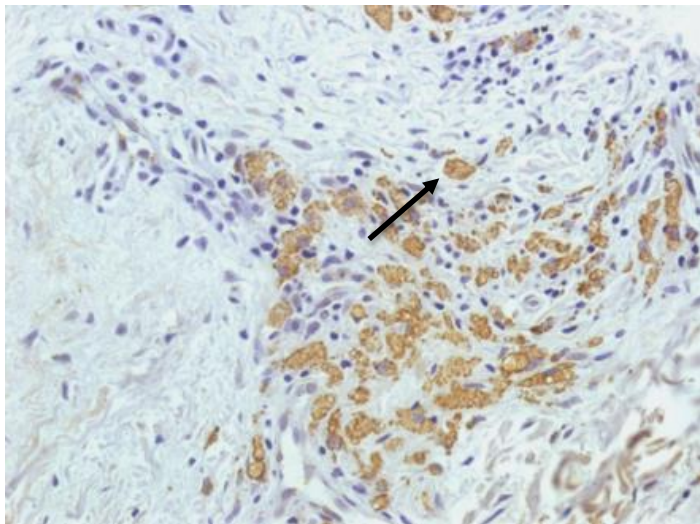
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para FGF b na forma TT (seta).



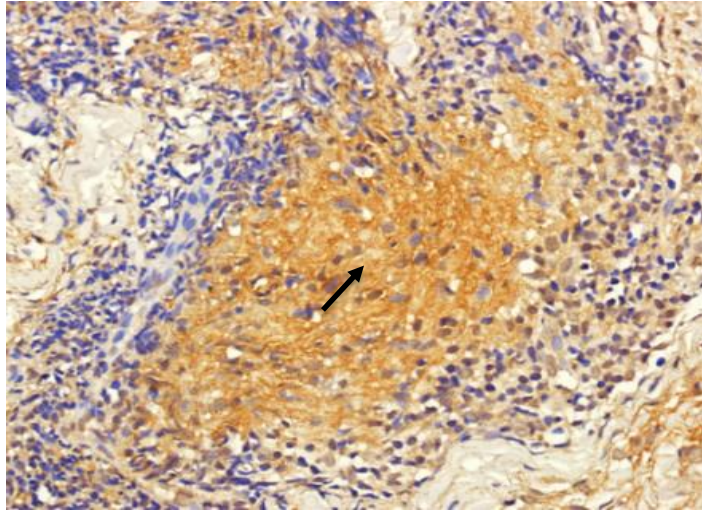
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para FGF b na forma VV (seta).



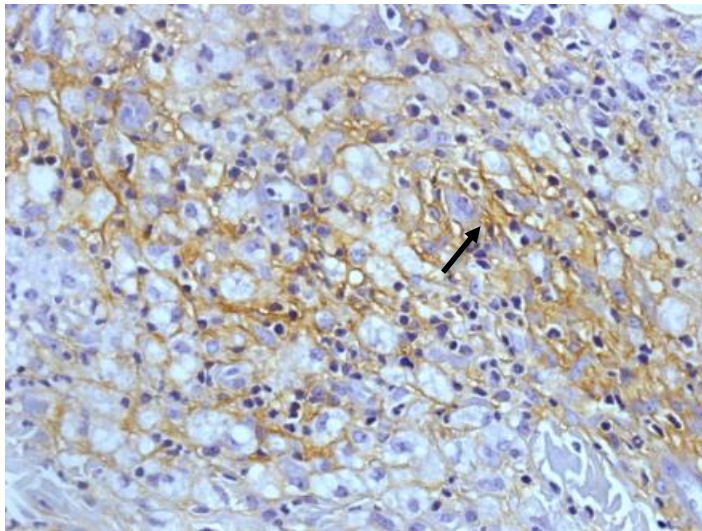
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para TNF- α na forma TT (seta).



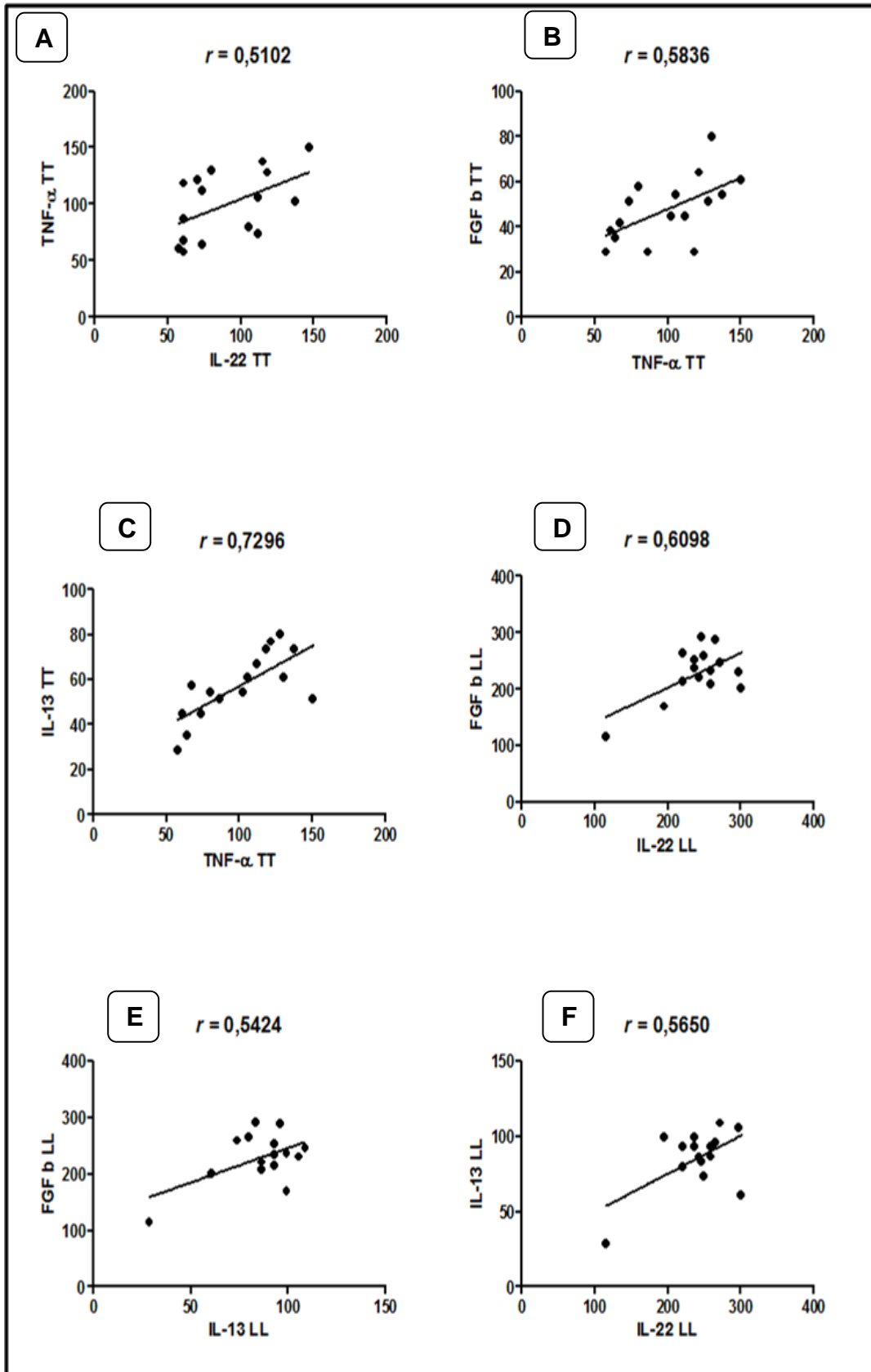
Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 8: Imunoistoquímica positiva para TNF- α na forma VV (seta).



Fonte: Protocolo de pesquisa

Figura 9: Correlação linear entre as citocinas e o FGF b nas formas polares da doença.



Fonte: Protocolo de pesquisa

7 – DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença crônica que provoca uma série de alterações no sistema de defesa do hospedeiro. É uma doença que apresenta intensa instabilidade imunológica a qual o bacilo consegue modulá-la a partir dos mecanismos de evasão que consegue desenvolver (CALLEGARO-FILHO et al., 2010). Essas alterações provocam a ativação de células Th que produzem citocinas que participam da resposta contra o *M. leprae* (QUARESMA et al., 2010).

Recentemente um novo subtipo de célula Th surge como possível alternativa para o maior entendimento da resposta de defesa do hospedeiro contra o bacilo no espectro da doença. Estas células são conhecidas como células Th22 e expressam citocinas como a IL-22, uma das principais proteínas envolvidas nesta resposta que apresenta determinadas peculiaridades. Estudos têm demonstrado que a IL-22 pode ser considerada citocina pro ou anti-inflamatória dependendo do contexto e do perfil de resposta da doença (WOLK et al., 2010; RADAIEVA et al., 2004; KONG et al., 2012).

A partir das análises quantitativas, nos resultados deste estudo, pode-se constatar que a expressão da IL-22 nas amostras teciduais analisadas apresentou diferença estatística significativa quando comparadas aos grupos do estudo, demonstrando predomínio da proteína na forma VV nas quais foram observadas a intensa marcação da citocina em macrófagos abarrotados de *M. leprae*, vacuolados e com globias.

O fato que pode justificar a maior participação da IL-22 na forma suscetível da doença é o comportamento da citocina na resposta antimicrobiana contra patógenos intracelulares. Em estudo que levou em consideração a resposta da IL-22 contra o *Mycobacterium tuberculosis*, foi demonstrado que em humanos, a citocina inibiu o crescimento intracelular do bacilo em macrófagos infectados derivados de monócitos,

revertendo o processo de maturação fagolisossomal, aumentando a capacidade lítica da célula (DHIMAN et al., 2013).

Neste estudo, essa resposta ganha reforço pelo fato de que na forma VV, ocorre disseminação bacilar e inativação da resposta lítica do macrófago a partir da modulação de resposta de evasão do *M. leprae* envolvendo o sistema fagocítico da célula. Assim, o aumento na expressão da IL-22 surge como possível alternativa para o desencadeamento da resposta de maturação do fagolisossomo, haja vista que a citocina consegue estimular o aumento da expressão de proteínas como a calgranulina A, Rab 7, elevando as concentrações intracelulares de Ca^{2+} , melhorando a fusão fagossomal e reduzindo a expressão de Rab 14 (FUJITA, 2013; DHIMAN et al., 2013; SONNENBERG, FOUSSER e ARTIS, 2011; DERETIC et al., 1997). Referente ao aumento quantitativo da IL-13 na forma VV da doença, a elevação pode estar associada ao padrão de resposta que é desencadeado pela proteína, onde a IL-13 quando produzida participa da resposta humoral, induzindo a ativação de células B, estimulando produção de anticorpos, formação de imunocomplexos e de enzimas como a arginase II produzidas por macrófagos M2 que reduzem a produção do NO comprometendo o papel microbicida do macrófago, favorecendo a persistência da infecção (ESKANDARI et al., 2014; MCWHORTER et al., 2013; SILVA e FLOETER-WINTER, 2014).

Sobre a participação do FGF b, houve maior expressão do fator de crescimento na forma VV da doença. O fato que pode explicar este aumento resulta da resposta do fator de crescimento em lesões teciduais. Neste contexto, o FGF b pode regular a participação de diferentes funções celulares que podem interferir no processo de cicatrização, migração, divisão celular, proliferação, diferenciação e formação do processo de angiogênese (GUILARDUCCI-FERRAZ et al., 2008; RIBATTI, 2014; BAKHSHAYESH et al., 2011). Nestas circunstâncias, o aumento do FGF b reforça o fato de que na forma suscetível da doença, a participação do fator de crescimento seja crucial para o desenvolvimento da

resposta reparadora haja vista que o hospedeiro apresenta maior disseminação bacilar, maior dano tecidual e conseqüentemente um maior número de lesões.

Em relação à presença do TNF- α , no polo de resistência da doença, o aumento da expressão da citocina demonstra que a proteína atua como potente indutora da resposta celular, aumentando a resposta lítica contra o bacilo, induzindo a produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, em complemento a essa resposta, a citocina induz a produção de quimiocinas que estimulam a migração, o recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o local da infecção (SONNENBERG, FOUSER e ARTIS, 2011; LOCKWOOD et al., 2011; GUERREIRO, SANTOS-COSTA e AZEVEDO-PEREIRA, 2011).

No intuito de compreender melhor o efeito das citocinas e do fator de crescimento quando associados, foram realizadas análises de correlação e em nossos resultados pode-se observar o efeito sinérgico entre a IL-22 e o TNF- α na forma TT da doença. Esse resultado demonstra que a partir da modulação de resposta espectral, a ação da IL-22 acaba potencializando a resposta desencadeada pelo TNF- α no polo de resistência da doença, aumentando a resposta pró-inflamatória contra o bacilo (SABAT, OUYANG e WOLK, 2014).

Referente à correlação positiva entre o FGF b e o TNF- α na forma TT reforça o fato de que quando associados, participam da resposta de remodelamento, do reparo epidérmico e da resposta imunológica inata envolvendo os queratinócitos (EYERICH et al., 2009).

No efeito sinérgico observado entre a IL-13 e o TNF- α nas lesões de pacientes TT, demonstra que neste contexto, as citocinas além de promoverem a diferenciação de linfócitos e macrófagos, contribuirão para a formação e manutenção do granuloma em processos inflamatórios crônicos, as proteínas estimulam a multiplicação de fibroblastos e de MPECs

interferindo na síntese de colágeno e conseqüentemente no desenvolvimento da fibrose (EYERICH et al., 2009; MCWHORTER et al., 2013; CHUAH et al., 2014; ALMADI et al., 2011; BRANDT et al., 2010). Na esquistossomose, foi observado que tanto a IL-13 quanto o TNF- α mostraram-se potentes indutores de fibrose sendo que o TNF- α apresentou efeito agravante (BRANDT et al., 2010).

Na forma VV, a participação da IL-22 no estudo de correlação demonstrou que a citocina estimula o aumento da expressão de IL-13 e do FGF b na forma suscetível da doença. Na forma VV, esta análise reforça o fato de que, a atuação do FGF b em sinergismo com a IL-22 pode interferir na resposta de reparo ao passo que estudos têm demonstrado que a IL-22 consegue estimular a produção de fatores que influenciam no remodelamento, na produção de colagenases e na diferenciação de fibroblastos em lesões teciduais (EYERICH et al., 2009; SABAT, OUYANG e WOLK, 2014; MCGEE et al., 2013). Ainda sobre o efeito reparador do fator de crescimento, em nossos resultados a correlação positiva observada entre o FGF b e a IL-13 demonstra que a citocina pode modular a resposta tecidual, aumentando a resposta do fator de crescimento.

Sobre a resposta sinérgica encontrada para IL-13 e IL-22 na forma VV, há evidências de que a IL-22 pode auxiliar a IL-13 na resposta humoral. Em estudo que avaliou a participação das citocinas em quadros de pacientes com dermatite atópica, foi demonstrado que houve correlação de resposta entre as citocinas envolvendo a presença deste novo subtipo celular onde a IL-13 apresentou-se como mediador crucial para produção de IgE e o desenvolvimento da eosinofilia auxiliada pela IL-22 que promoveu a proliferação de queratinócitos e o desenvolvimento de hiperplasia da epiderme (TERAKI, SAKURAI e IZAKI, 2013).

8 – CONCLUSÃO

- ✓ A resposta Th22, mediada pela IL-22, tem fundamental importância na patogênese da hanseníase, relacionando-se diretamente com a forma clínica da doença e com outras citocinas;
- ✓ A imunexpressão tecidual da IL-22, FGF-b e IL-13 estiveram aumentadas na forma virchowviana da doença (VV) em relação à forma tuberculóide (TT), em função da menor resposta imune celular e maior disseminação do bacilo;
- ✓ A imunexpressão tecidual do TNF- α foi maior na forma TT, às custas da maior ativação de macrófagos no local da infecção;
- ✓ Houve um efeito sinérgico entre a IL-22 e o TNF- α na forma TT da hanseníase

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. São Paulo: Elsevier, 2015. 552 p.
- ABEL, Laurent et al. Susceptibility to Leprosy Is Linked to the Human NRAMP1 Gene. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p.133-145, jan. 1998.
- ADAMS, Linda et al. L-Arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of Mycobacterium leprae. **J. Immunol.**, v. 147, n. 5, p. 1642-1646, set. 1991.
- AJALLA, Maria Elizabeth Araujo. **Hanseníase em municípios de fronteira Brasil-Paraguai com área contígua- 2001-2011**. 2015. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.
- ALBUQUERQUE, Tamires Gomes et al. Relato de experiência: Grupo de autocuidados em hanseníase no estado do Pará. **Revista Universo & Extensão**, v.3, n.3, 2015.
- ALCAÏS, Alexandre et al. Granulomatous Reaction to Intradermal Injection of Lepromin (Mitsuda Reaction) Is Linked to the Human NRAMP1 Gene in Vietnamese Leprosy Sibships. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p.302-308, jan. 2000.
- ALCAÏS, Alexandre et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion In Immunology**, v. 17, n. 1, p.44-48, fev. 2005.
- ALMADI, Majid A. et al. New insights into gastrointestinal and hepatic granulomatous disorders. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 8, p.455-466, ago. 2011.
- ARAUJO, Marcelo Grossi. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 36, n. 3, p.373-382, jun. 2003.
- BAKSHAYESH, Masoomeh et al. Effects of TGF- β and b-FGF on the Potential of Peripheral Blood-Borne Stem Cells and Bone Marrow-Derived Stem Cells in Wound Healing in a Murine Model. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p.138-142, jan. 2011.
- BAKKER, Mirjam. **Epidemiology and prevention of leprosy: a cohort study in Indonesia**. 2005. 165 f. Tese (Doutorado). Departamento de Pesquisa Biomédica. Royal Tropical Institute, Amsterdam, 2005.
- BETTELLI, Estelle et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p.235-238, abr. 2006.
- BRAGA, André Flores. **Estudo da maturação de células dendríticas em indivíduos portadores de hanseníase**. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2014.
- BRANDT, Carlos Teixeira et al. Avaliação das citocinas IL-10 e IL-13 como mediadores na progressão da fibrose de Symmers em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 5, p.333-337, out. 2010.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância epidemiológica**. Brasília, 2005.

- CALLEGARO-FILHO, Donato et al. A potential role for complement in immune evasion by *Mycobacterium leprae*. **J. Drugs Dermatol.**, v. 9, n. 11, p.1373-1382, nov. 2010.
- CASTRO, Livia Furquim de et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal Of Infection**, v. 67, n. 5, p.470-485, nov. 2013.
- CHAKRAVARTTI, Manish; VOGEL, Friedrich. **A twin study on leprosy**, Stuttgart: Georg Thieme, 1973.
- CHAN, John et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 7, p.2453-2457, abr. 1989
- CHUAH, Candy et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends In Parasitology**, v. 30, n. 3, p.141-150, mar. 2014.
- DEENICK, Elissa K; TANGYE, Stuart G. Autoimmunity: IL-21. **Immunology And Cell Biology**, v. 85, n. 7, p.503-505, set. 2007.
- DEGANG, Yang et al. Leprosy as a model of immunity. **Future Microbiology**, v. 9, n. 1, p.43-54, jan. 2014.
- DERETIC, Vojo et al. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. **Electrophoresis**, v. 18, n. 14, p.2542-2547, 1997.
- DHIMAN, Rohan. et al. Interleukin 22 Inhibits Intracellular Growth of *Mycobacterium tuberculosis* by Enhancing Calgranulin A Expression. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 209, n. 4, p.578-587, set. 2013.
- ESKANDARI, Nahid et al. Evaluation of the Correlation and Reproducibility between Histamine, IL-4, and IL-13 Release from Human Basophils. **Iran J. Allergy Asthma Immunol.**, v. 13, n. 3, p.190-197, jun. 2014.
- EYERICH, Stefanie et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **Journal Of Clinical Investigation**, p.3573-3585, nov. 2009.
- FARACO, José. Bacillos de Hansen e cortes de parafina. Methodo complementar para a pesquisa de lacillos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. **Rev. bras. Lepr.**, v. 6, n. 2, p.177-180, 1938.
- FISCHER, Max et al. Pseudoepitheliomatous hyperplasia and transepidermal elimination in lepromatous leprosy: does T-cell plasticity play a role? **J. Drugs Dermatol.**, v. 11, n. 10, p.1232-1235, out. 2012.
- FITNESS, Jodene; TOSH, Kerrie; HILL, Adrian. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes And Immunity**, v. 3, n. 8, p.441-453, dez. 2002.
- FONSECA, Juliany Marques Abreu da et al. Contribuições da fisioterapia para educação em saúde e grupo de autocuidados em hanseníase: relato de experiência. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, Brasília, v. 6, n. 1, p.770-777, mar. 2015.
- FORBES, John; GROS, Phillippe. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends In Microbiology**, v. 9, n. 8, p.397-403, ago. 2001.
- FUJITA, Hideki. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. **Journal Of Dermatological Science**, v. 72, n. 1, p.3-8, out. 2013.

- FURUZAWA-CARBALLEDA, Janette et al. Immunophenotyping of peripheral immunoregulatory as well as Th17A and Th22 cell subpopulations in kidney transplant recipients under belatacept or cyclosporine treatment. **Transplant Immunology**, v. 30, n. 2-3, p.107-113, mar. 2014.
- GOULART, Isabela Maria Bernardes; PENNA, Gerson Oliveira; CUNHA, Gabriel. 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, ago. 2002.
- GRUENHEID, Samantha. Natural Resistance to Infection with Intracellular Pathogens: The Nramp1 Protein Is Recruited to the Membrane of the Phagosome. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 185, n. 4, p.717-730, fev. 1997.
- GUERREIRO, Rita; SANTOS-COSTA, Quirina; AZEVEDO-PEREIRA, José Miguel. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **Acta Med. Port.**, v.4, n.1, p.967-976, 2011.
- GUILARDUCCI-FERRAZ, Carla Valéria et al. The increase in retinal cells proliferation induced by FGF2 is mediated by tyrosine and PI3 kinases. **Neurochem. Res.**, v. 33, n. 5, p.754-764, mai. 2008.
- HAN, Xiang Y. et al. Analysis of the Leprosy Agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in Four Countries. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 142, n. 4, p.524-532, 19 set. 2014.
- HOLZER, Timothy et al. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 2, p.514-520, fev. 1986.
- HSU, Su-Ming; RAINE, Laurence; FANGER, Herbert. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p.577-580, abr. 1981.
- INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY. Report of the committee on classification. **Int. J. Lepr.**, v.21, p.504-516. 1953.
- JANEWAY, Charles.; TRAVERS, Paul.; WALPORT, Mark. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. New York: Garland Science, 2001.
- KANG, Tae-jin; CHAE, Gue-tae. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p.53-58, jul. 2001.
- KHADER, Shabaana; COOPER, Andrea. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p.79-83, fev. 2008.
- KHANOLKAR-YOUNG, Saroj; SNOWDON, Diane; LOCKWOOD, Diana. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. **Clinical And Experimental Immunology**, v. 113, n. 3, p.438-442, set. 1998.
- KIMURA, Akihiro; NAKA, Tetsuji; KISHIMOTO, Tadimitsu. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 104, n. 29, p.12099-12104, 10 jul. 2007.

- KONG, Qing et al. Increased Expressions of IL-22 and Th22 cells in the coxsackievirus B3-Induced mice acute viral myocarditis. **Virology Journal**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.232-242, 2012.
- KOWALSKA, Maria; KOWALIK, Arthur. Mycobacterium leprae: pathogenic agent in leprosy. Discovery of new species Mycobacterium lepromatosis. Perspectives in research and diagnosis of leprosy. **Int Marit Health**, v. 63, n. 4, p.213-218, dez. 2012.
- LAGRANGE, Phelippe.; ABEL, Laurent. The genetic susceptibility to leprosy in humans. **Acta. Leprol.**, Switzerland, v. 10, supl. 1, p.11–27, 1996.
- LASTÓRIA, Joel Carlos; ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Diagn Tratamento**, v. 17, n. 4, p.173-179, dez. 2012.
- LASTÓRIA, Joel Carlos; ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **An. Bras. Dermatol.**, v. 89, n. 2, p.205-218, abr. 2014.
- LIEW, Foo Yew. The role of nitric oxide in parasitic disease. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 87, n. 6, p. 634-42, dez. 1993.
- LIMA, Luiz Wagner de Oliveira. **Avaliação imunohistoquímica da atividade macrofágica e sua relação com o fenômeno de apoptose na hanseníase**. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
- LOCKWOOD, Diana et al. Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves: Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. **Plos Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p.1-16, dez. 2011.
- MAGOMBEDZE, Gesham et al. Cellular and population plasticity of helper CD4+ T cell responses. **Frontiers In Physiology**, v. 4, p.1-9, ago. 2013.
- MANGAN, Paul et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p.231-234, abr. 2006.
- MATOS, Everson Vando Melo et al. Hanseníase em menores de quinze anos: revisão integrativa da literatura. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, Teresina, v. 1, n. 4, p.63-72, set. 2015.
- MCGEE, Heather et al. IL-22 Promotes Fibroblast-Mediated Wound Repair in the Skin. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p.1321-1329, mai. 2013.
- MCWHORTER, Frances et al. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 110, n. 43, p.17253-17258, out. 2013.
- MEISNER, Sarah et al. Association of NRAM1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west africans. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 65, n. 6, p.733-735, dez. 2001.
- MENDONÇA, Vanessa Amaral et al. Imunologia da hanseníase. **An. Bras. Dermatol.**, v. 83, n. 4, p.343-350, ago. 2008.
- MESSIAS, Iara José de et al. Association of C4B deficiency (C4B*Q0) with erythema nodosum in leprosy. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 92, n. 2, p.284-287, 28 jun. 2008.

- MICHALAK-STOMA, Anna et al. Serum Levels of Selected Th17 and Th22 Cytokines in Psoriatic Patients. **Disease Markers**, v. 35, n. 6, p.625-631, dez. 2013.
- MILLER, Erick. et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes Immun.**, v. 5, n. 1, p.63- 67, jan. 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil - análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. **Boletim Epidemiológico**, v.44, n.11, p.1-12, dez. 2013.
- MIRA, Marcelo Távora et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p.412-415, fev. 2003.
- MIRA, Marcelo Távora et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p.636-640, jan. 2004.
- MIRA, Marcelo Távora. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes And Infection**, v. 8, n. 4, p.1124-1131, abr. 2006.
- MIOSSEC, Pierre; KORN, Thomas; KUCHROO, Vijay. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. **New England Journal Of Medicine**, v. 361, n. 9, p.888-898, ago. 2009.
- NASCIMENTO, Osvaldo. Leprosy neuropathy: clinical presentations. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, v. 71, n. 9, p.661-666, set. 2013.
- NATH, Indira; SAINI, Chaman; VALLURI, Vijaya Lakshmi. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics In Dermatology**, v. 33, n. 1, p.90-98, jan. 2015.
- NEVES, Fernanda Pereira de Brito. **Perfil epidemiológico da hanseníase na infância no período de 1996 a 2006 na 21ª célula regional de saúde do estado do Ceará**. 2008. 112f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- OGAWA, Rei; HSU, Chao-kai. Mechanobiological dysregulation of the epidermis and dermis in skin disorders and in degeneration. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 17, n. 7, p.817-822, mai. 2013.
- PALERMO, Maria et al. Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 5, p.878-883, mai. 2012.
- PASSOS, Vázquez et al. Micronutrients influencing the immune response in leprosy. **Nutr. Hosp.**, v. 29, n. 1, p.26-36, jan. 2014.
- PINQUIER, Laure et al. Lèpre cutanée. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 138, n. 11, p.777-781, nov. 2011.
- PIRIS, Adriano; LOBO, Alice; MOSCHELLA, Samuel. Global dermatopathology: Hansen's disease - current concepts and challenges. **Journal Of Cutaneous Pathology**, v. 37, p.125-136, abr. 2010.
- PREVEDELLO, Flávia Costa; MIRA, Marcelo Távora. Hanseníase: uma doença genética?. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 5, p.451-459, out. 2007.
- QIAO, Dan et al. ESAT-6- and CFP-10-Specific Th1, Th22 and Th17 Cells in Tuberculous Pleurisy May Contribute to the Local Immune Response Against Mycobacterium Tuberculosis Infection. **Scandinavian Journal Of Immunology**, v. 73, n. 4, p.330-337, mar. 2011.

- QUARESMA, Juarez Antônio Simões et al. Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 4, p.135-140, out. 2010.
- RADAEVA, Svetlana et al. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. **Hepatology**, v. 39, n. 5, p.1332-1342, out. 2004.
- RAICHER, Irina et al. Neuropathic pain in leprosy. **Clinics In Dermatology**, v. 34, n. 1, p.59-65, jan. 2016.
- RAJALINGAM, Raja; SINGAL, Dharam; MEHRA, Narinder. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 2, p.168-172, fev. 1997.
- RAMASESH, Nalini. et al. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 9, p.2864–2869, set. 1991.
- REMUS, Natascha; ALCAIS, Alexandre; ABEL, Laurent. Human genetics of common mycobacterial infections. **Immunol. Res.** v. 28, supl. 2, p.109-129, out. 2003.
- RIBATTI, Domenico. The discovery of angiogenic growth factors: the contribution of Italian scientists. **Vasc Cell**, v. 6, n. 1, p.1-6, abr. 2014.
- RIDLEY, Dennis; JOPLING, William. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.31, n.3, p.255-273, set. 1966.
- ROMAGNANI, Sergio. Human Th17 cells. **Arthritis Res Ther**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.206-214, abr. 2008.
- ROY, Suchismita et al. Association of Vitamin D Receptor Genotype with Leprosy Type. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 179, n. 1, p.187-191, jan. 1999.
- SABAT, Robert; OUYANG, Wenjun; WOLK, Kerstin. Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 1, p.21-38, 31 dez. 2013.
- SAINI, Chaman; RAMESH, Venkatesh; NATH, Indira. 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**, v. 7, n. 7, p.2338-2351, 25 jul. 2013.
- SANTOS, Ana Paula Torres et al. Imunopatologia da Hanseníase: Aspectos Clínicos e Laboratoriais. **NewsLab.**, v.73, p. 142-156, 2005.
- SCOLLARD, David et al. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p.338-381, abr. 2006.
- SCRIBA, Thomas et al. Distinct, specific IL-17 and IL-22-producing CD4 + T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. **J Immunol**, v. 180, n. 3, p.1962-1970, fev. 2008.
- SHAW, Alexander et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes And Immunity**, v. 2, n. 4, p.196-204, jun. 2001.
- SIBLEY, David; FRANZBALU, Scott; KRAHENBUHL, James. Intracellular fate of *mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. **Infection And Immunity**, v. 55, n. 3, p.680-685, mar. 1987.

SIDDIQUI, Ruby et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nature Genetics**, v. 27, n. 4, p.439-441, abr. 2001.

SILVA, Maria Fernanda Laranjeira da; FLOETER-WINTER, Lucile Maria. Arginase in Leishmania. **Subcellular Biochemistry**, v. 74, n. 1, p.103-117, jan. 2014.

SILVA, Pedro Henrique Lopes da. **Participação de subpopulações de linfócitos T na fisiopatologia da hanseníase lepromatosa e na gênese do Erythema Nodosum Leprosum (ENL)**. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

SONNENBERG, Gregory; FOUSER, Lynette; ARTIS, David. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. **Nature Immunology**, v. 12, n. 5, p.383-390, mai. 2011.

SOUSA, Ana Lúcia Osório Maroclo de. **Marcadores moleculares, imunológicos e genéticos das reações hansênicas**. 2009. 94f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SOUZA, Janice Fabiana Maia de et al. O envelhecer institucionalizado de sujeitos sequelados pela Hanseníase da U/E Abrigo João Paulo II. Kairós. **Revista da Faculdade de Ciências Humanas e Saúde**, v. 17, n. 1, p.103-123, mar. 2014.

SOUZA-SANTANA, Fabiana de et al. Human leukocyte antigen class I and class II alleles are associated with susceptibility and resistance in borderline leprosy patients from Southeast Brazil. **Bmc Infect Dis**, v. 15, n. 1, p.22-31, 2015.

SYKES, Lynne et al. Changes in the Th1: Th2 Cytokine Bias in Pregnancy and the Effects of the Anti-Inflammatory Cyclopentenone Prostaglandin 15-Deoxy- Δ 12 , 14 -Prostaglandin J 2. **Mediators Of Inflammation**, v. 2012, p.1-12, 2012.

TERAKI, Yuichi; SAKURAI, Aika; IZAKI, Seiichi. IL-13/IL-22–coproducing T cells, a novel subset, are increased in atopic dermatitis. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, p.971-974, out. 2013.

THAKKAR, Sejal; PATEL, Sangitav. Clinical profile of leprosy patients: A prospective study. **Indian Journal Of Dermatology**, v. 59, n. 2, p.158-162, 2014.

THANGARAJ, Harry et al. Identification, sequencing, and expression of Mycobacterium leprae superoxide dismutase, a major antigen. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 58, n. 6, p.1937-1942, jun. 1990.

VEIGA, Andreia et al. Neuropatia da Doença de Hansen: Um diagnóstico a considerar na investigação da neuropatia periférica. **Acta Med Port**, v. 28, n. 3, p.329-332, jun. 2015.

VISENTAINER, Jeane Eliete Laguila et al. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 1, p.51-59, jan. 1997.

WHO. Expert Committee on Leprosy. **World Health Organ Tech Rep. Ser.**, v.768, p. 1-51, 1988.

WHO. Global leprosy situation, 2012. **Wkly Epidemiol. Rec.**, v.87, p. 317-328, 2012.

WILLIAMS, Diana. et al. Biological Implications of Mycobacterium leprae Gene Expression during Infection. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 8, n. 1, p.58-72, jan. 2004.

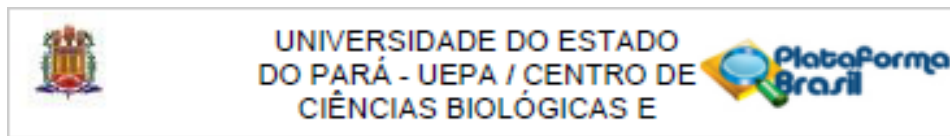
WOLK, Kerstin et al. Biology of interleukin-22. **Seminars In Immunopathology**, v. 32, n. 1, p.17-31, fev. 2010.

XAVIER, Marília Brasil et al. Correlação entre as formas clínicas da hanseníase e o grau de incapacidade neurológica. **Rev. Para. Med**, v. 28, n. 2, p.15-21, jun. 2014.

YOSHIDA, Okamoto et al. Essential Role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. **The Journal Of Immunology**, v. 184, n. 8, p.4414-4422, mar. 2010.

ZHU, Anyou et al. Increased frequencies of Th17 and Th22 cells in the peripheral blood of patients with secondary syphilis. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p.299-306, dez. 2012.

APÊNDICE A: PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A Resposta Th22 na Doença Hanseníaca

Pesquisador: Juarez Antônio Simões Quaresma

Área Temática:

Versão:

CAAE: 36127214.6.0000.5174

Instituição Proponente: Universidade do Estado do Pará - UEPA / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 799.160

Data da Relatoria: 19/09/2014

Apresentação do Projeto:

A pele é um órgão de grande importância, multifuncional, que promove, através da função de barreira cutânea, proteção mecânica, termorregulação,

vigilância imunológica, e previne a perda insensível de fluidos corporais (LUND et al, 1999; DARMSTAD e DINULUS, 2000; AFSAR, 2009). Este é um

órgão complexo, no qual ocorrem interações moleculares e celulares precisamente reguladas que governam diversas respostas importantes ao meio

ambiente. Como noutros órgãos complexos, a pele é composta de vários tipos celulares e estruturas interdependentes que são funcionalmente

cooperativas. Dentre essas células, tem-se os queratinócitos, os melanócitos, células dendríticas, anexos, terminações nervosas e linfócitos, sendo

estes últimos, tanto do sistema imune inato, quanto adaptativo. (VIRCHOW, 1860; KUPPER e FUHLBRIGGE, 2004; MURHOY, 1993). No que se

refere à imunologia da pele, a resposta imune celular do tipo auxiliar (mediada por linfócitos TCD4+ também chamados de linfócitos T helpers, Th,

ou T-auxiliares) apresenta um papel discriminativo na tradução de respostas imunes antígeno-específicas em funções teciduais ou

imunopatológicas. A capacidade desses linfócitos em induzir a resposta celular ou humoral está

Endereço: Trav. Perebeul, 2623

Bairro: Marco

CEP: 66.087-870

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3278-0829

Fax: (91)3278-8052

E-mail: cep_uepa@hotmail.com



Continuação do Parecer: 796/100

relacionada com os tipos de citocinas secretadas e proporcionará o desenvolvimento das respostas imunes clássicas Th1 e Th2 (MORAES et al, 2006). Porém, a identificação de novos perfis de células T, como as células Th17 e Th22 é importante para definir o papel das respostas imunes específicas em doenças humanas. Em diferentes patologias, perfis de células T distintos secretam citocinas que não só atuam em outras células imunes, mas também instruem células alvo (BURGLER et al, 2009; EYERICH et al, 2009; AUJLA et al, 2008). Cada perfil de células T secreta citocinas tissulares como Interferon- (Th1), Interleucina-4 (Th2) e Interleucina-17 (Th17), que induz a expressão de complexos de histocompatibilidade (MHC) em células não linfóides, secreção de muco em células epiteliais e expressão de Interleucina-6 (IL-6) em queratinócitos ou células epiteliais. (SCHMIDT-WEBER, AKDIS e AKDIS, 2007). Uma citocina de ação pouco definida é a interleucina-22 (IL-22), que é expressa pelas células Th17 (Lianget al. 2006; Kreymborg, et al. 2007), mas também pelas células natural killers (NK). (Cupedo, et al. 2009). Estudos recentes determinaram que alguns tipos de células T expressam IL-22 independentemente da IL-17, particularmente células T CCR10+. (EYERICH et al, 2009; NOGRALES et al, 2009; DUHEN et al, 2009; TRIFARI et al, 2009). A interleucina-22 pertence à família de citocinas da interleucina-10 e liga-se a um receptor heterodimérico que consiste na cadeia do receptor de IL-10 e no receptor de IL-22 (IL-22R). Porém, apesar do compartilhamento deste receptor, a sinalização da IL-22 age independentemente da IL-10 (WOLK et al, 2005) e, em contraste com esta citocina, ativa três vias de MAP-quinase (LEJEUNE et al, 2002). O receptor de interleucina-22 é expresso principalmente em células não-imunes, de tal modo que esta, assim como a IL-17, age principalmente em células teciduais (WOLK et al, 2004). A função desta citocina é difícil de generalizar. Ela não é anti-inflamatória, mas também não é necessariamente pró-inflamatória. Entretanto, ela é consistentemente descrita como ativadora da resposta imune inata epitelial que pode ser protetora ou prejudicial. Um exemplo de efeito prejudicial é a hiperplasia epitelial na psoríase, que pode ser induzida pela IL-22 em culturas de pele humana artificiais (BONIFACE et al, 2005). Além disso, a IL-22 tem sinergismo com a IL-17 na

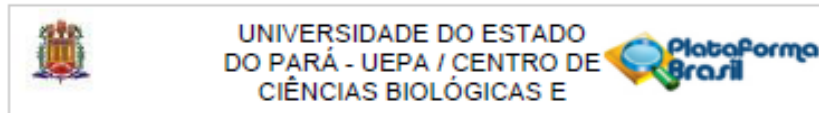
Endereço: Trav. Perebeú, 2625
Bairro: Marco CEP: 66.087-670
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3276-0829 Fax: (91)3276-8052 E-mail: cep_uepa@hotmail.com



continuação do Parecer: 796.190

ndução de citocinas pró-inflamatórias no epitélio brônquico humano (AUJLA et al, 2008) e nos fibroblastos colônias (ANDOH et al, 2005). Exemplos dos efeitos protetores da IL-22 foram descritos em pneumonias por bactérias Gram-negativas, nas quais a interleucina-22 induziu a secreção de substâncias antimicrobianas nas células epiteliais pulmonares (AUJLA et al, 2008). A IL-22 também protege contra hepatites, prevenindo a apoptose dos hepatócitos. (ZENEWICZ et al, 2007; PAN et al, 2004). Na pele, esta citocina induz a formação de peptídeos antimicrobianos, promove a proliferação de queratinócitos e inibe a diferenciação, sugerindo um papel na cura e remodelamento de feridas e nos mecanismos de defesa inata (BONIFACE et al, 2005). Dessa forma, o perfil Th22 mostra-se cada vez mais importante na imunopatologia das doenças infecciosas e, dentre essas doenças infecciosas, merece destaque a Hanseníase. A Hanseníase é uma doença causada por uma bactéria intracelular obrigatória, denominada *Mycobacterium leprae*. Esta bactéria é um bacilo gram-positivo álcool-ácido resistente (BAAR) que infecta preferencialmente pele e nervos do sistema nervoso periférico, acarretando uma variedade de formas clínicas na dependência da imunidade do hospedeiro (RIDLEY e JOPLING, 1966; SILHO, 2006). Dessa forma ela constitui um modelo exemplar para o entendimento da resposta imunológica celular no ser humano, frente à presença de um determinado agente infeccioso (REA e MODLIN, 2005). É uma doença sistêmica dermatoneurológica, infectocontagiosa crônica, curável, com alto potencial incapacitante, de notificação compulsória que pode apresentar alterações imunológicas e também reumatológicas resultante da interação patógeno-hospedeiro. Sua transmissão acontece através do contato íntimo e prolongado entre indivíduos com formas não-tratadas e indivíduos saudáveis. Tanto a sua entrada quanto eliminação ocorrem através das vias aéreas superiores, podendo a pele ferida eventualmente funcionar como porta de entrada para a infecção. Secreções orgânicas como leite, saliva, suor e secreção vaginal podem também transmitir os bacilos (TALHARI E NEVES, 1997; WHO, 2002). É uma doença que apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade, sendo que aproximadamente 95% da população apresenta imunidade à infecção (TALHARI e NEVES, 1997;

Endereço: Trav. Peregrino, 2623
Bairro: Marco CEP: 66.087-670
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3278-0629 Fax: (91)3278-8052 E-mail: cep_uepa@hotmail.com



Continuação do Parecer: 798.190

VAN BRAKEL, 2000), porém essa condição pode ser modificada em função da relação entre hospedeiro, agente e o meio ambiente (HARBOE, 1985). Ela se destacadente as afeções que originam incapacidades, podendo atingir indivíduos de todas as idades e de qualquer raça, sendo mais rara em crianças e mais incidente em indivíduos do sexo masculino. (BRASIL, 2000; VISSCHEDJIK et al, 2000; BRASIL, 2002; WHO, 2003; NORMAN, JOSEPH e RICHARD, 2004; BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Analisando a Hanseníase sob seus aspectos imunológicos, sabe-se que o destino da infecção pelo M. leprae depende de quando determinada citocina está disponível no sítio da infecção, além de levarmos em consideração também a predisposição genética do indivíduo, que pode levar a susceptibilidade ou resistência à infecção (GOULARD et al, 1996; MENDONÇA et al, 2008). O predomínio de resposta imunológica celular ou humoral, frente à infecção, pode influenciar a evolução da doença e estar associado, pelo menos em parte, com as características clínicas dos pacientes portadores das formas Tuberculóide (TT) e Lepromatosa (LL) (MORAES et al, 2006; MENDONÇA et al, 2008).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o perfil de citocinas Th22 nas diversas formas clínicas da Hanseníase.

Objetivo Secundário:

a. Correlacionar a intensidade de expressão das citocinas de perfil Th22 de acordo com a forma clínica apresentada. Correlacionar a intensidade da expressão de citocinas de perfil Th22 comparando com o aspecto histopatológico da lesão

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os participantes desta pesquisa correm o risco de sofrerem infecções pelo punch utilizado nas biópsias de amostras de pele, bem como de sofrerem dor pelo procedimento, além de terem seus dados expostos. Dessa forma, os pesquisadores comprometem-se que os materiais utilizados nos procedimentos serão esterilizados e o contato manual com o punch será efetuado por meio de luvas estéreis, e, para a realização da biópsia, será previamente efetuada anestesia com Xilocalina. Os pesquisadores correm o risco de se acidentarem

Endereço: Trav. Perebebuí, 2629
 Bairro: Marco CEP: 66.087-670
 UF: PA Município: BELEM
 Telefone: (91)3278-0829 Fax: (91)3278-4052 E-mail: cep_uepa@hotmail.com



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DO PARÁ - UEPA / CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E



Continuação do Parecer: 796.100

no decorrer da realização das biópsias e/ou de se contaminarem com as amostras extraídas, devido ao fato de que a Hanseníase possa ser disseminada por via hematogênica. Como medida para evitar esse risco, os pesquisadores serão capacitados pelas residentes do Ambulatório de Dermatologia da Universidade do Estado do Pará para realizarem as biópsias de forma correta e segura, bem como comprometem-se a utilizar as estratégias de biossegurança disponíveis no ambulatório para a realização dos procedimentos, como utilização de capotes, seringas e luvas estéreis.

Benefícios:

Com a realização deste estudo, os participantes, terão uma noção maior de sua doença e de que mecanismos seu corpo dispõe para agressão e/ou defesa de sua pele. Com este estudo, os pesquisadores aprofundarão seus conhecimentos em relação a este novo espectro imunológico da Hanseníase, compreendendo de maneira mais efetiva a correlação entre os aspectos clínicos e a imunopatologia desta doença. Além disso, o estudo poderá futuramente servir de base para novas pesquisas que fomentem estudos sobre o diagnóstico e o tratamento desta doença de saúde pública. Quanto ao risco à comunidade científica, a análise equivocada dos dados provenientes do trabalho poderão gerar conclusões precipitadas sobre esse perfil imunológico da Hanseníase. Em contrapartida, os pesquisadores realizarão análise estatística para evitar erros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta-se adequado, exequível e com relevância científica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

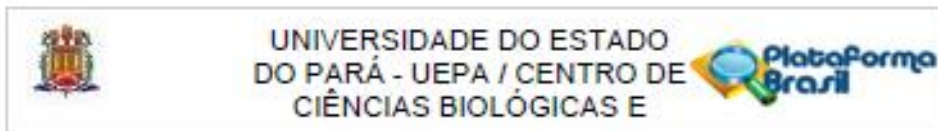
Presenta todos os termos necessários quanto aos aspectos éticos, contudo há necessidade de inclusão do termo de compromisso de uso de banco de dados (prontuários)

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendamos a inclusão em anexo do termo de responsabilidade do uso dos prontuários dos pacientes

Endereço: Trav. Pererebu, 2623
 Bairro: Merco CEP: 66.087-670
 UF: PA Município: BELEM
 Telefone: (91)3276-0829 Fax: (91)3276-8052 E-mail: cep_uepa@hotmail.com



Continuação do Parecer: 799.190

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELEM, 22 de Setembro de 2014

Assinado por:
Rodrigo da Silva Dias
(Coordenador)

Endereço: Trav. Parabeú, 2623
Bairro: Marco CEP: 66.087-870
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3276-0629 Fax: (91)3276-8052 E-mail: cep_uepa@hotmail.com

ANEXO 1: ARTIGO PUBLICADO

J AM ACAD DERMATOL
VOLUME 72, NUMBER 4

Letters 729

New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: Role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease

To the Editor: Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* with clinical manifestations that are vastly dependent on the host's immune response. The role of Th22 cells in the immunopathogenicity of leprosy has yet to be characterized.¹

Thirty-one untreated adults, 19 women and 12 men, were selected for evaluation from the Brazilian state of Para with positive leprosy diagnoses according to World Health Organization and Ridley-Jopling system criteria. Sixteen were defined as tuberculoid and 15 as lepromatous. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal do Para University (number 212.969).

For immunohistochemical analysis, tissue biopsies were immunostained with monoclonal antibodies against IL-23, IL-22, TNF- α , and FGFb (fibroblast growth factor basic) (Fig 1).² A quantitative analysis was made by randomly selecting 5 visual fields ($\times 400$ magnification; 0.0625 mm^2) using a 10×10 reticulated grid. Mann-Whitney and Pearson's correlation tests were used for univariate analyses with $P \leq .05$ considered to be statistically significant.

Quantitative analysis revealed a significant difference in IL-22 levels in tissues from patients with polar forms of leprosy (TT = 90.39 ± 30.18 ; LL = 241.3 ± 44.63 ; $P \leq .0001$), with higher levels observed in the lepromatous form with intense staining in vacuoles and globules of infected macrophages. Our results corroborate these observations, in that inactivation of the macrophage lytic response is largely responsible for the increased bacterial dissemination and evasive capacity of *M leprae*. Therefore, IL-22 expression presents as a possible alternative mechanism for triggering phagolysosomal maturation. In particular, IL-22 can stimulate the expression of

proteins, such as calgranulin A and Rab7, leading to increased intracellular Ca^{2+} levels and contributing to better phagolysosomal fusion.^{3,4} The increase in IL-13 observed with lepromatous disease could be due to the functions of IL-13 in the humoral response and B-cell activation (TT = 57.20 ± 14.73 ; LL = 85.76 ± 19.99 ; $P \leq .0002$). This leads to antibody production, immune complex formation, and the expression antiinflammatory enzymes, such as arginase II by M2 macrophages, which reduces nitric oxide production and compromises the antimicrobial role of macrophages, which generally favors the persistence of the infection.^{3,4} Furthermore, the elevation of FGFb in the lepromatous forms could influence collagen synthesis, cell migration, cell division, cell proliferation, and angiogenesis (TT = 47.80 ± 14.29 ; LL = 228.9 ± 45.13 ; $P \leq .0001$).⁴ Under these circumstances, FGFb may be essential for the repair of tissue damage incurred from the abundant lesions that characterize the lepromatous disease state. TNF- α is a potent proinflammatory mediator that can increase the lytic response toward pathogens and the production of reactive oxygen and nitrogen species (TT = 99.74 ± 30.14 ; LL = 62.08 ± 13.67 ; $P \leq .0008$). In addition, TNF- α induces the production of chemokines that stimulate migration and the recruitment of neutrophils, monocytes, and lymphocytes to sites of infection.^{4,5}

These cytokines, as Th2 cells, is related to humoral responses and induction of regenerative mechanisms of tissue, and thus to the clinical form of less effective immune response to intracellular pathogens.

Edvaldo de Lima Silveira, MSc,^a Jorge Rodrigues de Sousa, BSc,^a Tamara Leila de Sousa Aarão, PhD,^a Hellen Thaís Fuzii, PhD,^a Leonidas Braga Dias Junior, PhD,^b Francisca Regina Oliveira Carneiro, PhD,^b and Juarez Antonio Simões Quaresma, PhD^{a,b}

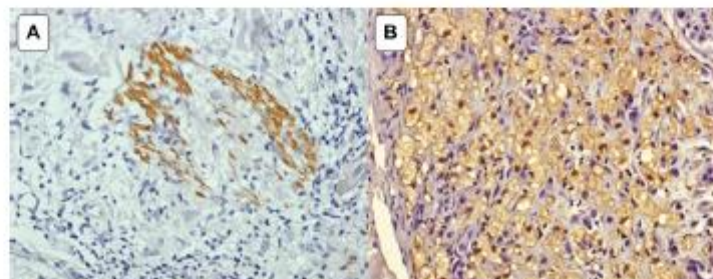


Fig 1. Immunostaining for IL-22 in tuberculoid (A) and lepromatous (B) lesions of leprosy (Original magnification: $\times 400$).

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Para,^a and Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Para,^b Belém-PA, Brazil

Funding sources: Conselho Nacional de Pesquisa (Grant Number 481020/2012-8)/CNPq - Brazil.

Conflicts of interest: None declared.

Correspondence to: Juarez Antonio Simões Quaresma, PhD, Núcleo de Medicina Tropical-UFFPA, Av Generalíssimo Deodoro 92, Umarizal, Belém, Brazil, 66055-240

E-mail: juarez@ufpa.br

REFERENCES

- Degang Y, Nakamura K, Akama T, Ishido Y, Luo Y, Ishii N, Suzuki K. Leprosy as a model of immunity. *Future Microbiol*. 2014;9:43-54.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:577-580.
- 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;25:2338.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*. 2009;119:3573-3585.
- Tezaki Y, Sakurai A, Izaki S. IL-13/IL-22-coproducing T cells, a novel subset, are increased in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:971-974.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.11.023>

Awareness and engagement in political advocacy among dermatology residents: A needs assessment

To the Editor: In a changing health care environment, where legislation may negatively impact dermatology practice and patient care, many dermatologists have become informed and engaged in political advocacy. While opportunities exist to involve dermatology residents in this process, little is known about their attitudes, competencies, or participation in this arena, factors that could impact the direction of the specialty.

In this IRB-approved (Baylor Research Institute - IRB Number 014-012) cross-sectional survey of dermatology residents and fellows, the authors sought to assess dermatology residents' experiences and views on political advocacy in order to later identify ways of increasing awareness and involvement in advocacy opportunities. Survey development began with key informant interviews of dermatology residents representing various

Table 1. Survey responder demographics

	# (%)
Gender	
Male	158 (35.5)
Female	287 (64.5)
Stage of training	
Resident - PGY2	158 (35.5)
Resident - PGY3	122 (27.4)
Resident - PGY4	127 (28.5)
Fellow	34 (7.6)
Other	4 (0.9)
Political affiliation	
Very conservative	12 (2.7)
Conservative	133 (3.2)
Centralist	111 (25.1)
Liberal	142 (32.2)
Very liberal	25 (5.7)
None	18 (4.1)

backgrounds and practice settings. It was reviewed for content and face validity by residents from 2 programs in Texas as well as leaders in dermatology political advocacy from 3 states. Of the 1441 residents and fellows in the 2013-2014 academic year (Terry Barnett, MD, written communication, October 20, 2014), 1342 were e-mailed an anonymous, voluntary electronic survey. Surveys were sent between March and May of 2014 to e-mail addresses identified through internet searches and personal contacts. Of the 446 respondents (33.2%) representing 37 of the 40 states with training programs, demographics reflected a distribution of training levels and diverse political affiliations (Table 1).

Among respondents, 99.3% considered political advocacy in dermatology important, and 98.6% believed health care policies will affect their career. However, many reported having no understanding of Medicare billing (26.9%) or the Patient Protection and Affordable Care Act (PPACA) (51.6%), and no formal residency education on Medicare (57.9%) or the PPACA (92.3%). Only 41.8% believed their training programs encouraged political advocacy, while 90.6% of residents thought health care policy should be a part of residency training and 66.8% endorsed greater likelihood to learn about health care policy if it was tested on American Board of Dermatology (ABD) exams (Fig 1).

With respect to Medicare patients, 95.3% anticipated caring for these patients after residency; however, 69.4% indicated they would see fewer Medicare patients if reimbursement decreased.

Regarding involvement in political organizations, 40.7% of respondents reported membership in the