



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

MIGUEL SARATY DE OLIVEIRA

**APOPTOSE DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E EVOLUÇÃO
CLÍNICA DO ERITEMA NODOSO HANSÊNICO:
ENSAIO COM AZATIOPRINA**

**BELÉM-PARÁ
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

MIGUEL SARATY DE OLIVEIRA

**APOPTOSE DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E EVOLUÇÃO
CLÍNICA DO ERITEMA NODOSO HANSÊNICO:**

ENSAIO COM AZATIOPRINA

Projeto de dissertação apresentado ao Curso de Mestrado do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em clínica das doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^ª Dra. Marília Brasil Xavier

**BELÉM-PARÁ
2008**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação(CIP).
Biblioteca do NUCLEO DE MEDICINA TROPICAL, Belém-PA.

OLIVEIRA, Miguel Saraty de

APOPTOSE DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E EVOLUÇÃO CLÍNICA DO ERITEMA NODOSO HANSÊNICO: ENSAIO COM AZATIOPRINA / Miguel Saraty de Oliveira; Orientadora Dra. Marília Brasil Xavier- 2008

Dissertação de (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2008.

Palavras-chave: Hanseníase. Apoptose. Eritema Nodoso Hansênico. Ensaio com Azatioprina.

CDD – 21. Ed 616.99809811

MIGUEL SARATY DE OLIVEIRA

**APOPTOSE DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E EVOLUÇÃO
CLÍNICA DO ERITEMA NODOSO HANSÊNICO:**

ENSAIO COM AZATIOPRINA

Dissertação apresentada ao Departamento da Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical-UFPA para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Banca examinadora:

Orientadora: _____

Prof^ª Dra Marília Brasil Xavier

Prof^ª Dra Luisa Martins Carício

Prof Dr Juarez Antonio Simões Quaresma

**BELÉM-PARÁ
2008**

Dedicatória

“Para minha mãe Genoveva e irmãos,
Giselle, Silvio, Saulo e sobrinha Gabrielle”

AGRADECIMENTOS

Todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos. O resultado de nossos estudos foi possível apenas pela cooperação e pelo esforço de outros antes de nós. Assim, quero agradecer a todos estes pesquisadores que antecederam a esta pesquisa e que contribuíram significativamente para sua realização, a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam; que foram solidárias e que torceram por mim.

Meus agradecimentos mais sinceros primeiramente a Deus, por ter me proporcionado a vida, a coragem, os amigos, a família, os professores, as oportunidades que tenho e de me fazer lutador para merecer cada uma destas maravilhas.

Aos pacientes, por serem a verdadeira razão deste trabalho.

Aos colegas de mestrado (Keila Madureira; Carla Pires; Tania Pires, Gina Bisi e todos os não mencionados aqui) e a Heliana Cunha, que me fizeram aprender com as discussões e conversas, pelos comentários e sugestões feitos aos meus primeiros rabiscos da dissertação.

Aos alunos da graduação Nilton Rocha, Geraldo Mariano Moraes de Macedo, um grande amigo que se fez presente em momentos tão complicados durante a realização desta pesquisa e a Rita de Cássia Neves Noronha, um exemplo de competência a qual me deixam sem palavras. Aos demais (Feliciano Vassoler; Fernanda D'Oliveira; Joana Abdelnor; Diego Vaz; Camila Tostes; Yonara Alves, Rosa Souza) pela realização das biópsias e por colaborarem em tudo que estava ao seu alcance.

A Michelle de Miranda Carvalho, um anjo da guarda que me acompanhou e me ajudou quando mais precisei, sem a qual não seria viável a realização deste estudo e Suenny Melo, pelo apoio incondicional, meu eterno obrigado.

Aos Drs. Juarez Antônio Simões Quaresma, Elza Baía de Brito pela colaboração com os estudos histopatológicos, ao qual favoreceram uma assistência de qualidade ao pacientes do estudo.

À Professora Dra Luisa Martins e aos demais colaboradores do “laboratório” (Fátima, Adenilson, Marcelly, Kemper, Amanda) pelas análises laboratoriais fornecidas, indispensáveis para o acompanhamento adequado de cada paciente.

À minha família que merece minhas palavras mais caras: *“Obrigado por vocês existirem, por contribuírem com o que me tornei, por acreditarem em mim em todos os momentos, por me acompanharem nos momentos mais nebulosos e acima de tudo, por fazerem de mim um homem tão feliz”*.

Agradecimento especial faço a minha orientadora, Prof^ª Dr^ª MARÍLIA BRASIL XAVIER, antes de mais nada pela paciência que teve comigo, pelo exemplo de pesquisadora, de profissionalismo, de competência e de amizade.

.... Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde.

E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.

Dalai Lama

RESUMO

A hanseníase é uma doença crônica infecto-contagiosa, atingindo preferencialmente pele e nervos periféricos, interrompida por surtos reacionais, classificados como Tipo I ou reação reversa e a reação tipo II ou eritema nodoso hansênico, geralmente acompanhadas de neurite. Talidomida e prednisona são amplamente utilizadas no tratamento do ENH, mas nem sempre são plenamente eficazes, sendo necessária a investigação de outras medicações imunossupressoras para controle da reação. O fenômeno de apoptose de células inflamatórias ocorre na hanseníase e no ENH, havendo, porém poucos estudos correlacionando o fenômeno com melhora ou piora clínica do estado reacional. Este estudo objetiva descrever a ocorrência de apoptose de células inflamatórias e evolução clínica do eritema nodoso hansênico antes, durante e após o uso de azatioprina para tratamento do ENH. Os resultados obtidos com 07 pacientes incluídos no estudo evidenciam que a azatioprina é droga imunossupressora eficaz no tratamento de casos de ENH de difícil manejo. Esta pode induzir a remissão do ENH, assim como favorecer a diminuição da dose de corticoesteróides. O fenômeno de apoptose pôde ser documentado utilizando a imunomarcagem com caspase 3 em todos os casos. Não houve variação considerada significativa entre o número de células evidenciadas com caspase 3 antes e após o tratamento com azatioprina. Não houve correlação considerada significativa entre o número de células evidenciadas com caspase 3 antes e após o tratamento com azatioprina e a melhora clínica apresentada pelos pacientes.

Palavras-chave: Hanseníase. Apoptose. Eritema Nodoso Hansênico. Ensaio com Azatioprina.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious and contagious disease, affecting mainly skin and peripheral nerves, interrupted by outbreaks reaction, classified as Type I or reverse reaction and the reaction type II or erythema nodosum leprosum, usually accompanied by neuritis. Thalidomide and prednisone are widely used in treat ENL, but are not always fully effective, it needs to be investigate other immunosuppressive drugs to control the reaction. The phenomenon of apoptosis of inflammatory cells occurs in leprosy and ENL, but few studies correlating the phenomenon with clinical improvement or worsening of the ENL reaction are available. This report describes the occurrence of apoptosis of inflammatory cells and clinical progression of erythema nodosum leprosum before, during and after the use of azathioprine to treat ENL. The results obtained with 07 patients enrolled in the study indicate that the drug, azathioprine, is effective in treating cases of ENL difficult to treat. This drug may induce remission of ENL, as well as to further decrease the dose of prednisone in use. The phenomenon of apoptosis could be documented using the immunogold with caspase 3 in all cases. There was no significant variation seen between the number of cells highlighted with caspase 3 before and after treatment with azathioprine. No significant correlation between the number of cells highlighted with caspase 3 before and after treatment with azathioprine and clinical improvement shown could be demonstrated.

Key words: Leprosy. Apoptosis. Erythema nodosum leprosum. Assay with azathioprine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CONCEITO DA HANSENÍASE, ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO.	03
2.2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE IMUNIDADE E HANSENÍASE	03
2.3 - ESTADOS REACIONAIS: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E TRATAMENTO.	06
2.4 - APOPTOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
3. OBJETIVOS	21
3.1 - OBJETIVO GERAL	21
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 - POPULAÇÃO ALVO	22
4.2 - TIPO DE ESTUDO	22
4.3 - POPULAÇÃO DE ESTUDO	22
4.4 – AMBIENTE DE PESQUISA	22

4.5 - PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	23
4.6 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
4.7-CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	26
4.8 - ASPECTOS ÉTICOS, RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO	27
5. RESULTADOS	29
6. DISCURSÃO	41
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE	63

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA I:** MECANISMO DE APOPTOSE (Simplificada representação das duas principais vias de sinalização morte celular programada). 13
- FIGURA II:** VIA INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DE APOPTOSE 15
- FIGURA III:** Fotomicrografia de pele humana. Ausência de células inflamatórias em apoptose. Coloração com caspase 3. Aumento 20 x. 36
- FIGURA VI:** Fotomicrografia de pele humana. Presença célula inflamatória em apoptose com marcação em castanho em campo superior esquerdo. Coloração com caspase 3. Aumento 40 x. 37
- FIGURA V:** Fotomicrografia de pele humana. Célula inflamatórias em apoptose. Coloração com caspase 3. Aumento 100 x. 37
- FIGURA VI:** Variação no número de células em apoptose marcadas com caspase 3 antes e depois de 30 dias de tratamento com azatioprina. 38

TABELA 1: Distribuição dos casos de acordo com sexo, idade, forma clínica e tipo de reação	30
TABELA 2: Distribuição dos casos, correlacionando tratamento clínico em uso para ENH com o novo tratamento instituído avaliando sua evolução clínica, antes; após 30 e 60 dias de tratamento com azatioprina.	32
TABELA 3: Distribuição dos casos correlacionando o número de células marcadas com caspase 3 em tecido antes e após 30 dias de uso de azatioprina, com a evolução clínica e presença de apoptose.	35
TABELA 4: Análise histopatológica das lesões antes e depois da terapêutica com azatioprina	40

LISTA TABELAS

LISTA DE GRÁFICO

- GRÁFICO I:** Correlacionado a frequência de episódios reacionais à faixa etária e ao sexo. 30
- GRÁFICO II:** Correlacionado a frequência de episódios reacionais ao tipo de episódio reacional e ao sexo. 31
- GRÁFICO III:** Correlacionado a frequência de episódios reacionais à forma clínica da hanseníase e ao sexo. 31
- GRÁFICO IV:** Número de células em apoptose marcadas com caspase 3 antes e depois de 30 dias de tratamento com azatioprina 39

1 - INTRODUÇÃO

O Eritema nodoso hansênico (ENH) é uma manifestação imunológica aguda da hanseníase que merece atenção especial em virtude de sua alta morbidade (LOCKWOOD, 1996). Tem evolução clínica variável e seu tratamento nem sempre alcança êxito (MOSCHELLA, 2004), já que os mecanismos imunopatológicos geradores são desconhecidos e os mecanismos de ação das medicações utilizadas até o momento também são incertos. O fenômeno de apoptose de células inflamatórias ocorre de forma expressiva no ENH, e já foi previamente estudado em macrófagos de pacientes com hanseníase (CREE *et al.*, 1987). É sabido também que o tratamento do ENH com talidomida pode induzir a cascata de apoptose em macrófagos (ASEFFA, A., DIETRICH, M. A., SHANNON, E. J., 1997), podendo este evento estar relacionado com a melhora clínica da reação em alguns casos. Não se conhece o comportamento dos linfócitos T teciduais e macrófagos no ENH quanto à ocorrência de apoptose, ou se há influência do tratamento medicamentoso na indução deste fenômeno. Especula-se que a apoptose de linfócitos T teciduais, bem como a persistência *in situ* de linfócitos de memória auxiliares ou supressores, podem ser fatores decisivos para regressão ou prolongamento de atividade inflamatória de vários tipos de doenças imunomediadas (TIEDE *et al.*, 2003). A azatioprina é uma medicação imunossupressora, em especial de células T, amplamente utilizada em pacientes que realizaram transplante de órgãos e doenças autoimunes como esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e doença inflamatória intestinal (MALTZMAN, 2003), sendo seu uso já tentado com resultados favoráveis em casos de ENH (MAHAJAN *et al.*, 2003). O objetivo principal deste trabalho é a realização de um estudo imunohistológico das células inflamatórias presentes em pele de pacientes com

hanseníase em ENH, antes e durante o tratamento do estado reacional com azatioprina tendo como ênfase o fenômeno de apoptose que ocorre nestas células, e uma possível relação entre o tratamento e a melhora clínica do paciente.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CONCEITO DA HANSENÍASE, ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO.

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, que acomete preferencialmente pele e nervos periféricos, e é endêmica em certas regiões subdesenvolvidas. É causada pelo *Mycobacterium leprae*, parasita intracitoplasmático, do tipo bastonete álcool-ácido-resistente ligeiramente encurvado e de extremidades arredondadas, com granulações em seu corpo bacilar denominadas de *Lutz- Unna*. O bacilo apresenta uma parede celular de dupla membrana, a mais interna contendo peptoglicanas e a externa lipossacarídea. A patologia pode atingir praticamente todos os órgãos e sistemas onde haja macrófagos, exceto o sistema nervoso central. É transmitida através do contato com doente bacilífero, possui uma alta infectividade, porém a patogenicidade é relativamente baixa, e as vias aéreas são consideradas a porta de entrada principal (mucosa nasal), através do contato direto (AZULAY; AZULAY, 2004).

2.2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE IMUNIDADE E HANSENÍASE

Os eventos que se desenvolvem nas fases precoces da infecção humana pelo *M.leprae* são pouco entendidos. Sabe-se que tanto fatores genéticos como a presença do gene *FARK2/FACRG*, que confere susceptibilidade humana ao *M.leprae* (MIRA *et al.*, 2004), como a presença de determinados antígenos leucocitários humano (HLA), como HLA-DR2 e HLA-DR-3 (OTTENHOLF, 1987) e mutações nos receptores do tipo *toll-like* do tipo 2 (TLR-2) favorecem que alguns indivíduos desenvolvam a hanseníase em suas

diversas formas (KANG *et al.*, 2001; 2002; BOUCHUD *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2004). Tanto a imunidade inata como a imunidade adaptativa desempenham papéis fundamentais na elaboração de resistência eficaz a doença.

A imunidade inata frente ao *M.leprae* é constituída basicamente pelos macrófagos, células dendríticas e por receptores de membrana que reconhecem padrões específicos como o receptor do tipo *toll-like 2* (UNDERHILL *et al.*, 1999).

O *M.leprae* em contrapartida, por meio de seu glicolípido fenólico 1 (PGL-1) e de sua superóxido desmutase, tem capacidade de fazer regulação negativa e diminuir a capacidade oxidativa do macrófago, bem como impedir a fusão interna de fagossomo-lisossomos que geram destruição bacilar. Há evidências de que o bacilo tem capacidade de tornar o macrófago refratário à ativação induzida pelo IFN-gama e de que module a interação entre o macrófago infectado e as outras células de defesa (SIBLEY *et al.*, 1987; 1988).

As células dendríticas (CD) são apresentadoras eficazes dos antígenos do *M.leprae*. No entanto foi observado que a expressão de moléculas de apresentação tipo MHC de classe I e II por parte de CD derivadas de monócitos infectadas por *M.leprae* sofrem regulação descendente (*downregulation*), só ocorrendo regulação ascendente (*upregulation*) na expressão de moléculas de MHC classe II e CD40 ligante por parte das células dendríticas se houver expressão conjunta de IL-12. Tal fato sugere que o bacilo pode interferir na interação entre a CD e as células T caso ocorra deficiência na expressão de determinada citocina (MAEDA *et al.*, 2003).

As células da linhagem T exercem papel essencial na resistência ao *M.leprae* como evidenciado em experimentos com inoculação em pata de camundongo (COLSTON, M. J.

AND G. R. HILSON, 1976). As populações de linfócitos T descritas por coloração imunohistoquímica são basicamente células CD4+ e CD8+. As lesões tuberculóides exibem predominantemente células CD4+ auxiliares numa proporção CD4+/CD8+ de 1,9:1, embora a proporção CD4+/CD8+ seja 2:1 no sangue periférico, parece haver uma migração preferencial, ou proliferação ou retenção de células selecionadas, nos vários tipos de lesões de hanseníase. Nas lesões tuberculóides tipo TT, o fenótipo de memória T auxiliar supera em 14 vezes o número de células T com fenótipo virgem (*naive*) (MODLIN *et al.*, 1983; 1988).

As células T citotóxicas também são numerosas em lesões tuberculóides. Estas células parecem desempenhar um importante papel em orientar a localização do macrófago, sua ativação e maturação, o que levaria a restrição ou eliminação do patógeno. Interessante que as células CD4+ estão amplamente distribuídas por toda a lesão, enquanto que as células CD8+ ficam estacionadas na periferia da lesão. Em contraste, as lesões de hanseníase Virchowiana demonstram uma proporção de CD4+/CD8+ de 0,6:1 e ao contrário das lesões Tuberculóides, os linfócitos CD8+ encontram-se espalhados por toda a lesão (MODLIN *et al.*, 1983; 1988). O emprego da técnica que utiliza anticorpos monoclonais demonstra que a maioria dos linfócitos T CD 4+ nas lesões Virchowianas é do fenótipo virgem (*naive*) e os linfócitos CD 8+ são do subgrupo de linfócitos T supressores. A partir deste fato foi especulado que os linfócitos CD8+ serviriam para gerar regulação descendente na ativação de macrófagos e suprimir a imunidade mediada por células (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Existe um grupo de células T chamadas CD1 restritas que participam de forma peculiar na defesa do organismo face à infecção por micobactérias. As moléculas do tipo CD1 são estruturas únicas de ligação hidrofóbicas que apresentam antígenos

micobacterianos lipídicos ou glicolípidicos, ao invés de peptídeos, a uma população de células T CD1+ restrita. No caso do *M.leprae* o lipoarabinomanano é capaz de induzir proliferação de linfócitos T CD1b e de monócitos de maneira restrita. Em casos de pacientes com formas lepromatosas, poucas células CD1+ foram encontradas nos sítios de lesão, enquanto houve uma forte regulação positiva de células CD1+ nas lesões granulomatosas de pacientes com formas tuberculóides ou em reação reversa (SAMPAIO *et al.*, 1992; SIELING *et al.*, 1995; ROSATE *et al.*, 1999). Interessante que após administração de fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GMCSF), uma citocina capaz de induzir a ativação de células dendríticas, à pacientes com formas lepromatosas, ocorreu infiltração de células CD1+ nos sítios de lesão (SAMPAIO *et al.*, 1992; SIELING *et al.*, 1995; ROSATE *et al.*, 1999).

2.3 - ESTADOS REACIONAIS: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E TRATAMENTO.

Reações hansênicas são complicações inflamatórias de caráter agudo que geralmente se manifestam como emergências médicas em pacientes portadores de hanseníase tratados ou não. São denominadas reação tipo I ou reação reversa e o eritema nodoso hansênico ou reação tipo II e juntas podem acometer entre 30 a 50 % de todos os pacientes hansênicos pelo menos uma vez no curso da doença (KUMAR, B.; DOGRA, S.; KAUR, I., 2004). Em virtude da predileção topográfica do *M.leprae* pelo sistema nervoso periférico, o fenômeno de agudização do quadro inflamatório durante o episódio reacional, se não diagnosticado e tratado adequadamente, pode resultar em dano neural de rápida instalação com subsequente perda de sensibilidade, paralisia e deformidade.

As reações hansênicas têm mecanismos imunológicos distintos (WEMANHU *et al.*, 1962; YAMAMURA *et al.*, 1992; ROJAS *et al.*, 1997; MORAES *et al.*; 2001) e apesar de relativamente comuns e de serem foco constante de pesquisas, as causas iniciais, os mecanismos deflagradores e o tratamento das reações permanece problemático por serem pouco entendidas as relações de causa e efeito na gênese do estado reacional.

A reação tipo I ocorre em pacientes que imunologicamente se encontram nas faixas *boderline* tuberculóide, *boderline* e *boderline* lepromatosa conforme classificação descrita por RIDLEY e JOPLING, em 1966, também são chamadas de reações reversas. Geralmente se apresentam como induração ou eritema intenso em lesões cutâneas pré-existentes, com edema acral e instalação de quadro típico de neurite, ou seja, dor intensa associada à perda sensorial e motora. Em quadros severos as lesões podem ulcerar e a evolução do quadro pode perdurar por várias semanas. Durante a reação tipo I, a análise histopatológica das lesões sugere que a imunidade local sofre um avanço no seu *status* (*upgrade*). Estudos utilizando imunofenotipagem revelaram que o número e o percentual de células T CD4+ aumentam nos tecidos em reação tipo I (MODLIN *et al.*, 1983; 1988; 1994), bem como os níveis séricos de receptor solúvel de IL2. Estes níveis tendem a diminuir no decorrer do tratamento (TUNG *et al.*, 1987). Surge também imunidade celular evidente ao antígeno do *M. leprae* durante a reação, com positivação de teste cutâneo de sensibilidade tardia. Nota-se também proliferação aumentada de linfócitos T CD 4+ em resposta a antígenos micobacterianos *in vitro* (GODAL *et al.*, 1973; BARNETSO *et al.*, 1976).

Sob o ponto de vista imunológico, o entendimento do paradigma de diferenciação funcional do linfócito T em populações com atividade predominantemente celular, ou Th1, ou humoral, ou Th2, de acordo com o perfil de citocinas apresentado (MOSMANN *et al.*,

1986) é de grande importância para compreensão do comportamento espectral da hanseníase e do estado reacional. Trabalhos previamente publicados tentam agrupar os pacientes com hanseníase de acordo com os perfis de citocinas apresentados e predomínio de resposta celular adaptativa evidenciada (Th1 ou Th2), fazendo inclusive correlação com a classificação polar de Ridley-Jopling (SARNO *et al.*, 1991; YAMAMURA *et al.*, 1992; SREENIVASAN *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 1999; NATH *et al.*, 2000; LITTLE *et al.*, 2001; ATKINSON *et al.*, 2004).

O padrão de citocinas evidenciado na reação tipo I representa um padrão de resposta Th1 (SREENIVASAN *et al.*, 1998; LITTLE *et al.*, 2001). Durante a reação reversa ocorre um aumento na expressão de genes de citocinas próinflamatórias incluindo IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α , tanto sistemicamente, quanto nos tecidos. Interessante notar que os níveis séricos dessas citocinas inflamatórias tendem a cair após instituição de um tratamento bem sucedido com prednisolona na reação reversa, mas mostram pouca ou nenhuma redução em seus níveis no eritema nodoso hansênico (TUNG *et al.*, 1987; FOSS *et al.*, 1993; LITTLE *et al.*, 2001; ATKINSON *et al.*, 2004).

Os eventos ou condições que serviriam de gatilho para o início da reação tipo I são desconhecidos e variados. Reações tipo I já foram observadas após imunização com vacinas contendo outras micobactérias, mas não foram observadas após inoculação intradérmica direta de IL-2 ou de IFN- γ (SAMPAIO *et al.*, 1992.). Embora o TNF- α seja presente na reação tipo I, e a talidomida tenha sido relatada como potente inibidora desta citocina, ela é ineficaz no tratamento da reação tipo I (TRAMONTANA *et al.*, 1995).

Na reação tipo II, também chamada de eritema nodoso hansênico (ENH), a agudização se traduz por aparecimento abrupto de vários nódulos eritematosos, dolorosos

em várias partes do tegumento, sem predileção por lesões pré-existente, associadas a sintomas sistêmicos como febre e mal estar geral. Acomete pacientes multibacilares na faixa *boderline e borderline* lepromatosa e pode atingir outros órgãos além da pele e dos nervos periféricos como olhos, fígado e testículos. Em casos severos as lesões também podem ulcerar.

O ENH ocorre em pacientes com pobre imunidade celular específica, apesar da abundância de bacilos e de antígenos na pele e nos nervos e uma forte resposta humoral policlonal, com altos níveis de imunoglobulinas circulantes. Os achados teciduais observados na lesão aguda são caracterizados por um infiltrado neutrofílico superajuntado a um padrão lepromatoso crônico. Tal achado histopatológico fez com que alguns autores (WENAMBU *et al.*, 1969) propusessem que o ENH seria uma lesão mediada por imunocomplexos. Esta teoria não pode ser nem confirmada nem refutada pelo fato de que, apesar dos níveis de complemento sérico estarem reduzidos e terem sido identificados depósitos de imunocomplexos e complemento nas lesões de pele (ROJAS *et al.*, 1987), nem os complexos imunes circulantes, nem os complexos fixados puderam ser reproduzivelmente demonstrados em lesões de ENH.

Alguns estudos identificaram uma possível ativação na da imunidade celular nas reações tipo II, incluindo aumento na expressão de IL-12, IFN- γ e TNF- α circulantes (SARNO *et al.*, 1991; SAMPAIO *et al.*, 1993; MORAES *et al.*, 2001), bem como aumento na expressão de RNAm dessas citocinas observado em amostras de tecido (YAMAMURA *et al.*, 1992), indicando que a ativação celular ocorre localmente. Testes de linfoproliferação de células T positivos *in vitro* e aumento considerável dos níveis séricos circulantes de receptor solúvel de IL-2 em pacientes em reação tipo II (SARNO *et al.*, 1996) reforça essa possibilidade.

Paradoxalmente também foram observados aumentos nas expressões de IL-6, IL-8, IL-10 e mantidas as de IL-4 e IL-5 RNAm em lesões de ENH, todas estas citocinas associadas a produção de anticorpos, quimiotaxia de neutrófilos e redução da imunidade mediada por células.

Os fatores associados ao surgimento das reações de ENH são variados e obscuros. Infecções bacterianas, virais, imunizações, febre e estresse emocional já foram implicados sem evidências plenamente explicativas ou convincentes. A gravidez parece ter efeito inibitório sobre a reação tipo II, ressurgindo de forma severa no período pós-parto. Relatos também sugerem que a reação tipo II costuma ser mais freqüente e grave em crianças que desenvolvem hanseníase no início da puberdade.

O fenômeno de Lúcio é uma vasculite necrotizante severa, não muito comum, que ocorria em pacientes com ascendência mexicana e apresenta alta morbidade e mortalidade. Esse tipo de reação ocorria em pacientes com alta carga bacilar e é associada a altos níveis de crioglobulinas e de antígenos de *M.leprae*. Os achados histopatológicos típicos são os de células endoteliais do hospedeiro densamente infectadas e em vários estágios de degeneração. O quadro necessita de acompanhamento hospitalar e eventualmente desbridamento semelhante a casos de queimaduras.

Há uma predominância na transcrição de IL-2, TNF- α e TNF- γ nas formas tuberculóides e de IL-4 nas formas lepromatosas. No entanto esses achados são associados às formas de doença clínica fora de estado reacional.

Durante os episódios reacionais do tipo I e em especial do tipo II, a organização da população celular nos sítios de lesão se modifica, a produção de citocinas e seus referidos

perfis de secreção se intensificam ou tendem a polarizar para um esboço de resposta mediada por células (Th1).

Dados já publicados na literatura por SREENIVASAN *et al.*, 1998, demonstram que pacientes com quadro de hanseníase *boderline* ou *boderline* lepromatosa estáveis, isto é, fora do estado reacional, possuem linfócitos T que expressão no sangue periférico citocinas com padrão Th2 ou Th 0, mas não Th 1. Em estudos subsequentes com uso de RT-PCR e ensaios tipo ELISA para detecção de citocinas, tanto em tecido como em células mononucleares de sangue periférico de pacientes hanseníacos em estado reacional o grupo observou que 64% dos pacientes em estado reacional tipo eritema nodoso hanseníaco apresentaram padrão de citocinas do tipo Th 1 nos tecidos analisados. Em alguns indivíduos um padrão Th0 pode ser observado, mas o padrão Th2 esteve ausente.

A presença de IL-12p40 mRNA também foi identificada em 21 de 25 pacientes com ENH, em todos os pacientes com reação tipo I. No ENH o padrão de citocinas apresentado no tecido é concordante com o padrão apresentado no sangue periférico, TNF- γ e IL-12 foram detectados tanto em polimorfonucleares do sangue periférico (PMN) não estimulados, quanto em tecido analisado em ambos os tipos de estado reacional sugerindo expressão *in vivo* destas citocinas durante as reações. A expressão de IL-10 tem sido associada principalmente às células PMN aderentes e tem sido observada somente no ENH e não na RR, mesmo em cultura de células estimuladas. Durante os estudos realizados com tecidos não foi identificada IL-10 em nenhum dos dois tipos de reação. Quanto a IL-4, citocina de perfil Th2 associada a pacientes *boderline* ou *boderline* lepromatosos fora de estado reacional, não foram detectadas na grande maioria dos pacientes durante o ENH. Este estudo demonstra que ocorre polarização para resposta celular durante o estado reacional na maioria dos pacientes hanseníacos com a forma lepromatosa, em contraste com

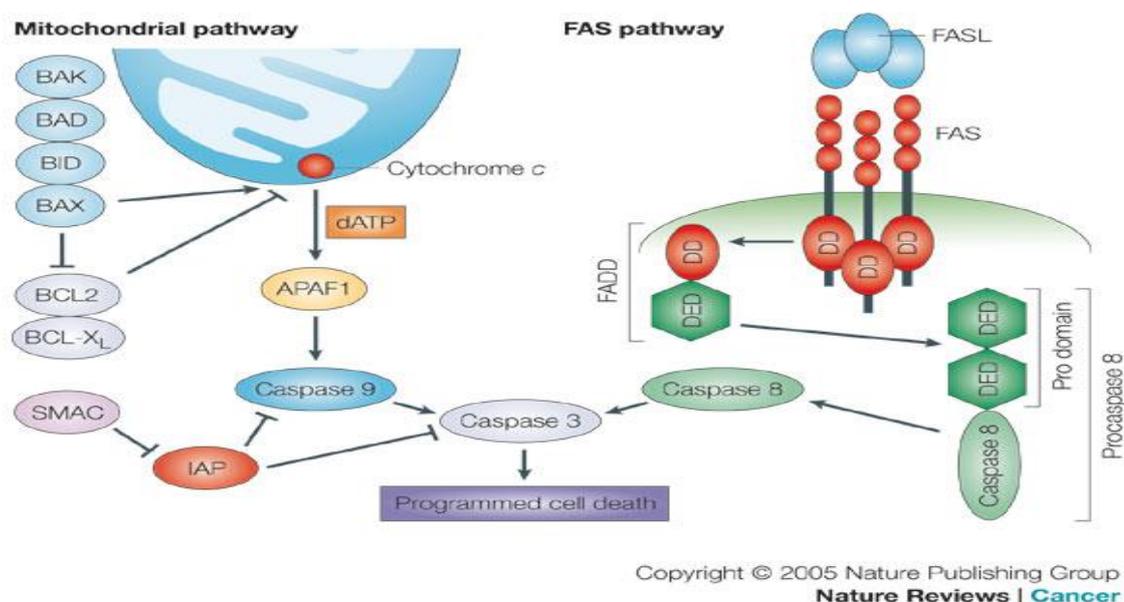
o perfil Th2 ou Th0 apresentado durante a fase não reacional da doença. O padrão de linfócitos Th1 nos pacientes com ENH persistiu por 6 a 7 meses após o início das reações e foi igualmente observado em pacientes em tratamento com talidomida e doses baixas de corticosteróides. A talidomida e o corticoesteróide não foram capazes de inibir a expressão de TNF- γ e IL-12 mRNA de pacientes em ENH (SREENIVASAN *et al.*, 1998).

2.4 - APOPTOSE: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo apoptose foi proposto por Kerr e colegas em 1972 para descrever um padrão morfológico específico de morte celular observado à medida que células embrionárias eram eliminadas durante o desenvolvimento embrionário, na renovação de células de tecidos normais em adultos e na atrofia decorrente da retirada de hormônios NGF. O termo denota um processo fisiológico controlado de remoção de componentes individuais de um organismo sem destruição ou dano ao todo. A morfologia associada com esse fenômeno é caracterizada por condensação celular e citoplasmática e desmanche celular em fragmentos ligados a membrana. Estes fragmentos ou corpos apoptóticos são recolhidos por outras células e degradados dentro de fagossomos. O fenômeno ocorreria em virtude de um mecanismo geral de deleção celular controlada, que exerce papel complementar a mitose e citocinese, em manter estável o número de elementos celulares nos tecidos. O conceito de apoptose apóia a hipótese de que as células são geneticamente programadas e possuem elementos da cascata metabólica que permite seu desmantelamento. A questão principal proposta é de que a morte celular resultante de processos celulares intrínsecos deve ser considerada de forma distinta da morte celular por perturbação grave e irreversível no ambiente homeostático da célula, que geraria o padrão morfológico conhecido como necrose (ABBAS *et al.*, 2000).

A morte programada da célula é importante em muitos aspectos do desenvolvimento animal, incluindo morfogênese e homeostasia ([SAUNDERS 1966](#); [JACOBSON et al. 1997](#)). Estudos dos mecanismos de morte programada no nematódeo *Caenorhabditis elegans* identificaram uma via que é amplamente conservada em outros organismos, incluindo humanos ([METZSTEIN et al. 1998](#)).

FIGURA I: MECANISMO DE APOPTOSE (Simplificada representação das duas principais vias de sinalização morte celular programada).



FONTE: Nature Reviews acessado em http://www.nature.com/nrc/journal/v5/n11/fig_tab/nrc1736_F1.html

A caracterização como modelo do mutante *Caenorhabditis elegans* CED (morte celular anormal) revelou a produção de produtos genéticos envolvidos na morte celular no período de desenvolvimento embrionário (HEDGECOCK, E. M.; SULSTON, J. E.; THOMSON, J. N., 1983). A seqüência de aminoácidos de CED-3 mostra uma similaridade com uma protease dos mamíferos conhecida como enzima conversora da interleucina 1 β

(IL-1 β). Investigações subseqüentes revelaram a existência de uma família destas proteases, conhecidas atualmente como caspases ou proteases aspartase-cistina dependentes; logo a enzima conversora IL-1 β foi renomeada caspase 1 (ALNEMRI *et al.*, 1996). As caspases existem como zimogênios latentes que possuem um prodomínio N terminal, seguida da região que forma um domínio efetor catalítico de duas subunidades.

Embora todos os membros da família das caspases dividam similaridades em seqüência de aminoácidos e estrutura, elas diferem significativamente em seus papéis fisiológicos. As caspases podem ser separadas amplamente em dois grupos: aquelas que estão centralmente envolvidas com a apoptose (caspases 2, 3, 7, 8, 9 e 10) e as relacionadas com a caspase 1 (caspase 1, 4, 5, 13, 14 e as caspases murinas 11 e 12) que agem no processamento de citocinas durante a resposta inflamatória (CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN S. J., 2003).

As caspases implicadas na apoptose podem ser reagrupadas em dois subgrupos baseados em sua estrutura e em seu aspecto temporal de ativação durante a morte celular (LOS, M.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K., 1999). As caspases iniciadoras (caspase 2, 8, 9,10) tem longos prodomínios e são primariamente responsáveis por iniciar a cascata de ativação das caspases.

As caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7) tem um pequeno prodomínio e são, de fato, as responsáveis pelo desmonte da célula, por clivar seus substratos. A ativação das caspases iniciadoras requer dimerização, que é mediada pela ligação de seus prodomínios com moléculas de adaptação domínio recrutadas pela caspase. Após a ativação, as caspases iniciadoras propagam sinais de morte por meio da ativação das caspases efetoras em cascata. Estas últimas são convertidas em suas formas ativas através de proteólise em

As caspases efetoras quando ativadas clivam seletivamente um grupo de proteínas alvo, produzindo os achados bioquímicos e morfológicos característicos associados com a apoptose. Um marcador frequentemente utilizado é a cadeia de DNA produzida pela clivagem do DNA genômico entre os nucleossomos para gerar fragmentos com comprimentos de aproximadamente 180 pares de bases. A nuclease responsável por esta característica é uma DNase-Caspase ativada (CAD ou DEFF40), que está presente nas células vivas ligada ao seu inibidor (ICAD ou DEFF45). A ativação da CAD ocorre por clivagem da ICAD mediada pela caspase 3 e caspase 7, resultando na liberação e ativação da CAD (ENARI, M., *et al.*, 1998; SAKAHIRA, H.; ENARI, M; NAGATA S., 1998).

As lâmininas, que são proteínas do envelope nuclear, são clivadas pelas caspases efetoras, levando ao encolhimento do núcleo e fragmentação. A perda do formato da célula se deve provavelmente a clivagem das proteínas do citoesqueleto, tal como a foldrina. A clivagem dos componentes do complexo de adesão local leva descolamento das células apoptóticas de suas vizinhas e da membrana basal. A vacuolização da membrana plasmática ocorre pela ativação da gelsolina, uma enzima despolimerizadora de actina que é mediada pelas caspases.

Outro processo dependente das caspases é a exposição à fosfatidilserina (FS). A fosfatidilserina encontra-se ativamente localizada na face internada da membrana citoplasmática de células saudáveis.

A regulação da morte programada da célula ocorre por uma via intrínseca, envolvendo a liberação mitocondrial de citocromo C e a ativação da caspase 9 ou pela via extrínseca, envolvendo a estimulação de receptores de morte expressos na superfície da

célula e ativação de caspase 8, onde deve se mencionar a via dos receptores de morte FAS (CD95) e FAS-ligante (CD95-L) (ABBAS *et al.*, 2000).

Na via extrínseca da apoptose, moléculas sinalizadoras conhecidas como ligantes, que são liberadas por outras células, ligam-se a receptores de morte transmembrana na célula alvo para induzir a apoptose. Por exemplo, as células natural killer (NK) possuem ligante FAS (FasL) na sua superfície (CSIPO *et al.*, 1998). A ligação do FasL da célula NK ao receptor FAS (um receptor de morte) na célula alvo ativa múltiplos receptores a se agregarem na superfície da célula alvo. A agregação desses receptores recruta uma proteína adaptadora conhecida como proteína do domínio de morte associada ao FAS ou FADD (*FAS associated death domain*) no lado citoplasmático do receptor. FADD, por sua vez, recruta a caspase-8, uma proteína iniciadora, para formar o complexo sinalizador indutor de morte (*DISC-death-inducing signal complex*). Através do recrutamento da caspase 8 para o DISC, esta será ativada e poderá ativar diretamente a caspase 3 que é uma proteína efetora e irá iniciar a degradação da célula. A caspase 8 ativada também pode clivar a proteína pró-apoptótica BID em sua forma ativa, agi para facilitar a liberação do citocromo cna via intrínseca (ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J, 2002).

A via intrínseca é desencadeada por estresse celular, especificamente o estresse mitocondrial causado por fatores como dano ao DNA e choque térmico (ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J, 2002). Após receber o sinal de estresse, as proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, BAX e BID, ligam-se a membrana externa da mitocôndria para sinalizar a liberação de seu conteúdo interno. No entanto o sinal de BAX e BID não é suficiente para liberar o conteúdo completamente. BAK, uma proteína pró-apoptótica que reside no interior da mitocôndria também é necessária para promover a completa liberação do citocromo C e o conteúdo intramembrana da mitocôndria (HAGUE, A.; PARASKEVA,

C., 2004). Após sua liberação, o citocromo C forma complexos no citoplasma com a adenosine trifosfato (ATP), uma molécula de energia, e a Apaf-1, que é uma enzima. Em seguida, o complexo irá ativar a caspase 9, que é uma proteína iniciadora. A caspase 9 ativada trabalha junto com citocromo C, ATP e a Apaf-1 para formar um apoptossomo, que por sua vez, ativa a caspase 3, que é a proteína efetora que inicia a degradação. Além da liberação do citocromo C, o conteúdo intramembrana liberado também contém fator indutor de apoptose (AIF) para facilitar a fragmentação do DNA e proteínas Smac/Diablo, que inibem o inibidor da apoptose (IAP) (HAGUE, A.; PARASKEVA, C., 2004).

A família de proteínas Bcl2 compreende membros anti-apoptóticos: Bcl-2, Bcl-xl e Mcl-1 e membros pró-apoptóticos como *Bad*, *Bid*, *Bax* e *Bak* (ABBAS *et al.*, 2000).

As proteínas pró-apoptóticas estão localizadas no citosol e agem como sensores de dano e desgaste celular. Após ativação elas se relocalizam na superfície da mitocôndria, onde as proteínas anti-apoptóticas estão localizadas. A ativação de *Bax* e *Bad* e o bloqueio das proteínas anti-apoptóticas são passos fundamentais na via mitocondrial de apoptose. *Bad* regula positivamente a função de apoptose formando heterodímeros com Bcl-xl e Bcl-2, revertendo suas atividades repressoras de morte. *Bak* pode ser seqüestrada por Bcl-xl e Mcl-1. Quando há um excesso de proteínas pro-apoptóticas a célula torna-se mais sensível a apoptose (ABBAS *et al.*, 2000)

As micobactérias interferem com a apoptose das células do hospedeiro modificando a expressão das proteínas Bcl-2. Cepas virulentas de *M.bovis* têm sido demonstradas como capazes de reprimir a apoptose por regular positivamente Bcl-2 e Mcl-1 e desativar *Bad* e *Bax*. Previamente foi demonstrado que *M.leprae* induzia apoptose em monócitos por meio da ativação dos genes *Bax* e *Bak*, porém a inibição da apoptose também pode servir como

um mecanismo de evasão do *M.leprae* do sistema inato. Em estudo conduzido com células de leucemia monocítica aguda linhagem THP-1, que é um modelo experimental para estudo de micobactérias, para avaliação comparativa entre o fenômeno de apoptose induzido por cepas virulentas de *M.leprae* e de *M bovis*, pode se observar que o *M.leprae* induz uma regulação decrescente na expressão dos genes pró-apoptóticos *Bad* e *Bak*, combinado com uma reduzida capacidade de induzir a produção de TNF- α e uma regulação crescente de Mcl-1, resultando na inibição da apoptose em monócitos THP-1 *in vitro* (HASAN *et al.*, 2006).

Por outro lado, já está documentado que há frequência mais elevada de apoptose em células macrofágicas em pacientes com hanseníase, em especial nos pacientes paucibacilares (WALSH *et al.*, 2004) e que esse fenômeno tende a se intensificar durante os estados reacionais (AJITH *et al.*, 2007), com frequência mais significativa em macrófagos, linfócitos T CD8+, linfócitos T CD19+ do que em linfócitos T CD4+ (NIAG *et al.*, 1999) sugerindo que a apoptose seria um mecanismo de eliminação de células infectadas. Existe escassa literatura descrevendo como a população de linfócitos se comporta no tecido durante o ENH, no que se refere a sua susceptibilidade ou resistência a ocorrência de apoptose influenciada ou não por variações quantitativas nas citocinas teciduais.

Apesar de utilizadas durante a reação tipo II e da conhecida ação de prednisona, azatioprina e talidomida como imunossupressores ou imunomoduladores, em especial sobre a população de células T, a correlação entre os eventos de melhora clínica ou de falta de êxito após o tratamento com tais drogas e as modificações no infiltrado linfocitário tecidual do ENH não foram ainda bem estabelecidas (TRAMONTANA *et al.*, 1995; SHANNON, SANDOVAL, 1996; ASEFFA.; DIETRICH; SHANNON, 1997).

A apoptose de linfócitos T teciduais bem como a persistência *in situ* de linfócitos de memória auxiliares ou supressores pode ser fator decisivo para regressão ou prolongamento de atividade inflamatória em vários tipos de doenças imunomediadas (TIEDE *et al.*, 2003).

A azatioprina é um análogo das purinas e seu mecanismo de ação preciso ainda não é completamente esclarecido. Sua ação imunossupressora é notória, principalmente em linfócitos T ativados (TIEDE *et al.*, 2003), já sendo relatados resultados favoráveis com sua utilização no ENH (MAHAJAN *et al.*, 2003). Desta maneira a realização de um estudo imunohistológico de populações de células inflamatórias presentes em tecido de pacientes com hanseníase em ENH, antes e após o tratamento com azatioprina, tem grande importância, pois pode trazer informações novas sobre o impacto desta medicação na reação tipo II.

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Descrever os resultados clínicos e aspectos imuno Histoquímicos relacionados à apoptose em lesões de pacientes com hanseníase com estado reacional tipo ENH, antes e após utilização tratamento medicamentoso com azatioprina para controle de eritema nodoso hansênico.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Documentar e comparar a ocorrência e a variabilidade na frequência do fenômeno de apoptose em células inflamatórias de tecidos de pacientes hansênicos com ENH, antes e após tratamento farmacológico com azatioprina.
- ✓ Correlacionar alterações nas populações de células inflamatórias, em especial a ocorrência de apoptose, com o resultado clínico obtido no controle do ENH, associando-os a terapêutica utilizada.

4 – METODOLOGIA

4.1 - POPULAÇÃO ALVO

Pacientes com diagnóstico de hanseníase que apresentem quadro reacional do tipo eritema nodoso hansênico severo, segundo os critérios da WHO e que não apresentarem resposta eficaz ao tratamento preconizado para este tipo de reação.

4.2 - TIPO DE ESTUDO

Ensaio clínico, aberto, tipo *self control*, quase experimental, antes e após tratamento de ENH com azatioprina estabelecendo correlação imonohistoquímica de material coletado da pele dos pacientes envolvidos com sua respectiva evolução clínica.

4.3 - POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pacientes apresentando ENH grave, oriundos das Unidades de Básicas de Saúde, atendidos no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) - UFPA.

4.4 - AMBIENTE DE PESQUISA

O estudo foi desenvolvido no Ambulatório e Laboratórios do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, onde existe atendimento ambulatorial de rotina em dermatologia tropical, com ênfase no estudo de Hansenologia.

4.5 - PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial conforme descrito:

História da doença atual e progressão foram registradas em prontuário, em ficha protocolo (apêndice II). Foi realizado exame físico e dermato-neurológico por ocasião do diagnóstico do ENH e frequência registrada na ficha protocolo nas dias 0, 30, 60 e 90 após a inclusão do paciente na pesquisa. Foram descritos sexo, idade, forma clínica da hanseníase, evolução do ENH, grau de incapacidade, a forma clínica segundo Ridley Jopling e co-morbidades relevantes. Foram realizadas biópsias de pele e histopatologia utilizando coloração HE e anticorpo para marcação de caspase 3 por ocasião do diagnóstico da reação tipo II e após 4 semanas do uso da medicação.

As medicações utilizadas foram: azatioprina em doses de 1 a 3 mg/kg; prednisona 0,5 a 2 mg/kg e talidomida 100 a 400mg/dia. A azatioprina foi utilizada por período de 60 dias. Prednisona e talidomida foram utilizadas por ocasião do uso da azatioprina e mantidas enquanto persistiram os quadros reacionais. As medicações foram utilizadas por via oral conforme respectivas orientações.

As biópsias de pele foram colhidas, após anestesia com lidocaína 2%, no local das lesões selecionadas com punch N° 3 e emblocadas em parafina. O material foi submetido ao estudo morfológico com a coloração HE e ensaio de apoptose com caspase 3. As secções histológicas de 5µm foram obtidas por microtomia e montadas em lâminas previamente sinalizadas sendo coradas pelo método de hematoxilina-eosina e histoquímica para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Após coloração, os cortes foram desidratados em material com concentrações crescentes de álcool e xilol, sendo posteriormente montadas em meio apropriado (entellan – MERCK). Após montagem, os cortes foram analisados em microscopia de luz sendo classificados de acordo com o aspecto histopatológico das lesões.

Utilizou-se do método imuno-histológico de Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês Streptavidin- Biotin Peroxidase) (HSU *et al.*, 1981) com anticorpos monoclonais anti- caspase 3 (marcador de apoptose). O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada e em seguida os preparados serão novamente lavados em água corrente e água destilada por 5 minutos cada, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4.

A exposição antígenica, quando necessária, foi realizada por incubação em panela a vapor (Steam Cuisine 700 Hi Speed- T-FAL) com tampão Target Retrieval Solution 10x concentrado (Dako- cód. S1699) durante 20 minutos após o aquecimento do tampão a temperatura de 85°C a 90°C ou ainda por digestão enzimática utilizando-se solução de tripsina 0,25%(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA- cód. T8253). Os preparados foram novamente lavados em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4 por média 5 minutos cada. Também foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a incubação dos preparados com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V (Serva cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “overnight” a 4°C. Após duas lavagens com tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos cada, foi feita a incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho e anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra diluído 1:500 em PBS pH 7,4, durante 30 minutos a 37°C ou ainda o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de cabra produzido em coelho diluído 1:500 em PBS pH 7,4, para os anticorpos primários produzidos em cabra. Os preparados foram novamente lavados em tampão PBS pH 7,4 e incubados com o complexo SABC diluído 1:500 em PBS pH 7,4 durante 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em tampão PBS pH

7,4, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3, 3'-diaminobenzidine) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. Os preparados assim processados foram lavados em água corrente por 10 minutos, contra- corados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount.

Na tentativa de uniformizar a contagem de células em apoptose, a quantificação dos eventos positivos foi feita pela contagem de número de células marcadas pela caspase 3 em 5 campos de grande aumento aleatórios na área de pele que recebeu marcação com anticorpo. Uma vez determinada a quantidade de células presentes, foi relatado o número total de células obtidas nestes cinco campos.

Para documentação obtenção de fotomicrografias foi utilizado um sistema CARL ZEISS composto de microscópio binocular e um sistema automático de fotografia, Photomicroscope III, com filme negativo Kodak ASA 100.

4.6 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos casos de hanseníase que apresentaram estado reacional do tipo eritema nodoso hansênico severo e que apresentaram insucesso ao tratamento corticosteróide específico sugerida pela WHO.

Define-se como caso de hanseníase em estado reacional do tipo eritema nodoso hansênico severo: paciente com diagnóstico clínico e laboratorial confirmado de hanseníase que apresentem: numerosos nódulos de ENH associados à febre; nódulos de

ENH associados à neurite; nódulos de ENH ulcerados ou pustulosos; lesões recorrentes de ENH; envolvimento de outros órgãos como olhos, testículos, linfonodos e articulações.

Insucesso na terapia preconizada pela Organização Mundial de Saúde, WHO, foi definida por: ausência de melhora clínica com uso da terapia corticosteróide adequadamente empregada por no mínimo 2 semanas, necessidade de uso de doses acima de 1mg/kg/dia de prednisona, reaparecimento de sinais e sintomas de ENH durante o período de redução da corticoterapia e necessidade de uso de corticoterapia por mais de 12 semanas.

Além desses, foram inclusos também pacientes com quadro de ENH severo, que se mantêm sintomáticos apesar do uso de drogas alternativas sabidamente eficazes no tratamento deste tipo de estado reacional, como talidomida e clofazimina. A falta de resposta clínica a estas medicações foi definida como: ausência de melhora clínica com uso da terapia com talidomida estando estas adequadamente prescritas para idade e peso do paciente e empregada por no mínimo 2 semanas, necessidade de uso de prednisona em doses acima de 1mg/kg/dia de prednisona, reaparecimento de sinais e sintomas de ENH durante o período de redução da corticoterapia ou da droga alternativa e necessidade de uso de corticoterapia ou da terapia alternativa vigente por mais de 12 semanas.

4.7-CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes que não se enquadraram na população alvo do estudo, que não apresentaram quadro de ENH severo e que optaram por não serem incluídos na pesquisa. Pacientes que apresentaram as seguintes contra-indicações: Infecção ativa, quadro atual ou pregresso de tuberculose, quadro atual ou prévio de malignidades em especial linfoproliferações, insuficiência cardíaca, gravidez, amamentação, imunodeficiência

adquirida ou congênita, quadros sugestivo de neurite óptica, anafilaxia ou “*rash*” cutâneo grave em virtude de uso de fármacos.

4.8 - ASPECTOS ÉTICOS, RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO

Os riscos esperados estão relacionados à evolução própria do quadro reacional hansênico e a efeitos adversos da droga descritos em outros ensaios clínicos utilizando este mesmo medicamento em outras doenças imunomediadas.

Deve-se salientar que a indicação do uso desta medicação por pacientes elegíveis foi rigorosamente restrita à ausência de contra-indicações e quando evidências clínicas sugeriram que o benefício que a medicação trouxe na melhora do estado geral do paciente superou os possíveis efeitos adversos já descritos com a medicação.

Os seguintes sinais e sintomas tem sido descritos como efeitos adversos relacionados ao da azatioprina: Depressão da medula óssea, toxicidade hepática, diarreia, vômitos, dores articulares.

A programação para os pacientes que aceitaram serem incluídos incluiu avaliações clínicas e laboratoriais antes, durante e após o fim dos tratamentos propostos, sendo que nenhuma técnica ou modalidade propedêutica nova ou laboratorial experimental, não aprovada ou não estabelecida por meio de testes prévios, que pudessem gerar dano, constrangimento ou prejuízo físico, material, moral ou emocional aos pacientes foi utilizada. A medicação em estudo foi administrada em regime ambulatorial sob supervisão de equipe médica.

Os pacientes obtiveram o benefício de assistência multiprofissional e o fornecimento da poliquimioterapia para tratamento da hanseníase e das reações hansênicas.

O estudo trouxe o benefício de poder contribuir para com a comunidade científica com informações novas sobre o assunto estudado.

Este estudo constituiu-se de um sub-projeto do projeto denominado “Avaliação *in situ* da resposta imunológica celular, expressão de citocinas e marcadores de lesão neural em pacientes hansenianos nas diversas formas clínicas e em quadros reacionais”, que foi submetido de ética em pesquisa em seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical em conformidade com a resolução 196 do CONEP.

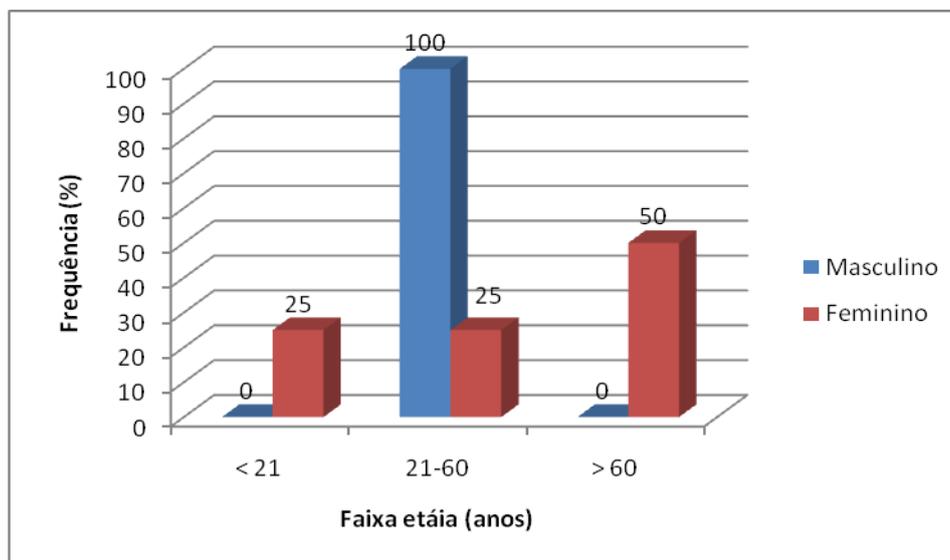
5 – RESULTADOS

Achados epidemiológicos e clínicos: dos 07 pacientes incluídos no estudo, 42,8% eram do gênero masculino. A faixa etária predominante no momento da ocorrência da reação tipo II foi de 21 a 60 anos nos pacientes do gênero masculino (100%) e em maiores de 50 anos nos pacientes do gênero feminino (50%). Com relação ao tipo de reação desenvolvida entre os pacientes ENH, houve uma predominância de reação do tipo reentrante tanto nos pacientes pertencentes ao gênero masculino, com 66,7% dos casos, quanto nos pacientes pertencentes ao gênero feminino, com 42,9% dos casos. A forma clínica predominante entre os pacientes com reação Tipo II foi a MHBV nos pacientes do gênero masculino (100%), enquanto que nos pacientes do gênero feminino houve uma predominância das formas MHV e MHBV com 42,9% cada. (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos casos de acordo com sexo, idade, forma clínica e tipo de reação

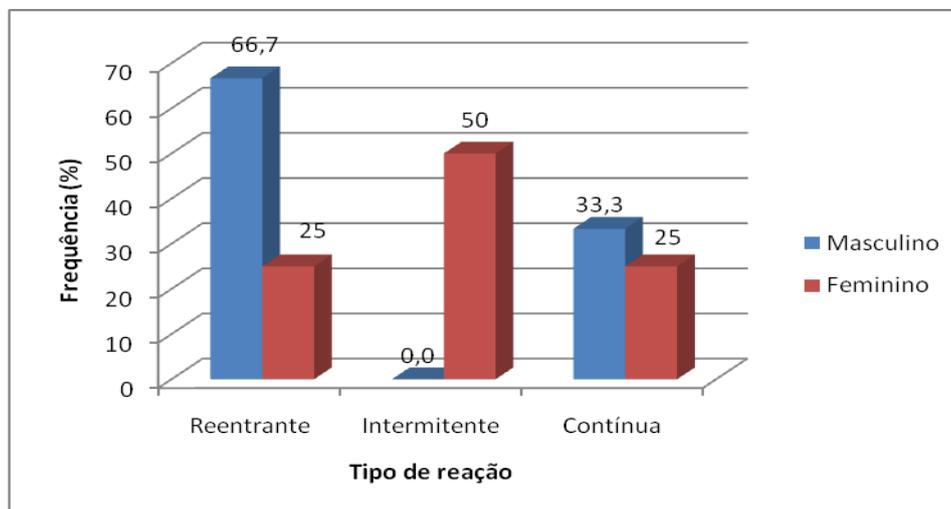
Características	Masculino		Feminino		Total	
	N	%	N	%	N	%
Faixa etária (anos)						
< 21	0	0	1	25	1	14,3
21-60	3	100	1	25	4	57,1
> 60	0	0	2	50	2	28,6
Total	3	100	4	100	7	100
Tipo de reação						
Reentrante	2	66,7	1	25	3	42,9
Intermitente	0	0,0	2	50	2	28,6
Contínua	1	33,3	1	25	2	28,6
Total	3	100	4	100	7	100
Forma clínica						
MHV	0	0	3	75	3	42,9
MHDV	3	100	0	0	3	42,9
MHDD	0	0	1	25	1	14,3
Total	3	100	4	100	7	100

FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

GRÁFICO I: Correlacionado a frequência de episódios reacionais à faixa etária e ao sexo.

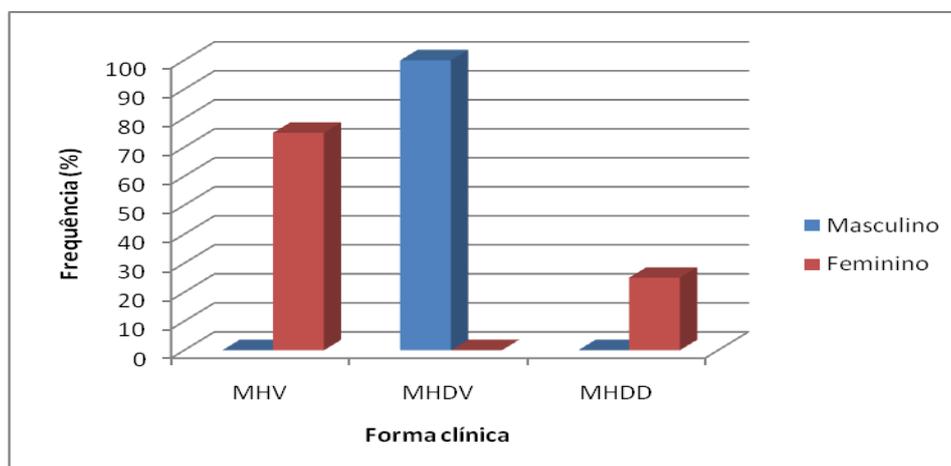
FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

GRÁFICO II: Correlacionado a frequência de episódios reacionais ao tipo de episódio reacional e ao sexo.



FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

GRÁFICO III: Correlacionado a frequência de episódios reacionais à forma clínica da hanseníase e ao sexo.



FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

Tabela 2: Distribuição dos casos, correlacionando tratamento clínico em uso para ENH com o novo tratamento instituído avaliando sua evolução clínica, antes; após 30 e 60 dias de tratamento com azatioprina.

Paciente	Tratamento em uso	Tratamento instituído	Antes do tratamento	Após 30 dias de tratamento	Após 60 dias de tratamento
1	Dapsona 100mg;	Azatioprina 200mg;	Evoluía com graves episódios reacionais de ENH reentrantes por 6 meses, que necessitaram internação hospitalar e não apresentavam resolução com talidomida associada a prednisona. Paciente apresentava também quadro de osteoporose associada ao uso prolongado de corticoesteróides	Apresentava melhora clínica importante com redução quase completa dos sintomas sistêmicos	Observou-se o controle clínico da reação e melhora clínica persistente do paciente, que se manteve mesmo após a suspensão do tratamento com azatioprina.
2	Prednisona 40 mg	Azatioprina 150mg;	Possuía histórico de ENH há 2 anos, evoluía com quadro reacional importante apesar do uso de prednisona 40mg. Paciente recusava utilizar talidomida em virtude de sedação excessiva e episódio de taquiarritmia	Paciente apresentava grande melhora clínica com desaparecimento dos sintomas sistêmicos e do quadro cutâneo	Persistiu assintomático nas avaliações após 60 e 90 dias do início do tratamento
3	Talidomida 300mg; Prednisona 15mg;	Azatioprina 150mg; redução das drogas anteriores	Apresentava quadro de ENH que necessitava internação hospitalar	Evoluiu com grande melhora geral, mantendo aparecimento de poucos nódulos cutâneos de maneira esporádica	Necessitou suspender uso da azatioprina e da prednisona em virtude de hemorragia digestiva por bulboduodenite

4	Prednisona 30mg; Talidomida 100mg;	Azatioprina 150mg; redução das drogas anteriores	Apresentava episódios reacionais desde maio de 2006, necessitando de doses variáveis de talidomida e prednisona. Quadro reacional se manifestava sempre com importantes sintomas sistêmicos e recidivava com a tentativa de retirada da prednisona	Paciente apresentava evidente melhora clínica, que persistiu mesmo com a diminuição da prednisona para 5mg	Diminuição da dose de azatioprina de 100mg para 50 mg em virtude de intolerância gástrica resultou em piora clínica.
5	Talidomida 200mg; Prednisona 40mg;	Azatioprina 100mg; redução das drogas anteriores	Necessitou internação hospitalar em virtude de reação com graves sintomas sistêmicos e quadro cutâneo exuberante. Manteve quadro reacional durante todo tratamento com poliquimioterapia, necessitando utilizar talidomida em doses entre 100 a 400mg dia e prednisona entre 10 a 40 mg, mantendo reação apesar do tratamento	Evoluiu com melhora importante dos sintomas sistêmicos e aparecimento de poucos nódulos cutâneos	Persistiu com aparecimento de alguns nódulos, tendo sido reintroduzido tratamento com talidomida 200mg dia
6	Talidomida 100mg; Prednisona 20mg.	Azatioprina 150mg; suspensão talidomida/ redução prednisona.	Evoluiu com episódios graves de ENH por 4 anos, inclusive necessitando de internação hospitalar. Quadro reacional reaparecia com sintomas sistêmicos e manifestação dermatológica extensa sempre que se tentava diminuir dose de prednisona para menos de 40 mg ou de talidomida para menos que 200mg .	Apresentou regressão do quadro de ENH e sem sintomas sistêmicos.	Evoluiu em bom estado e com queixa de poucos nódulos cutâneos. Paciente conseguiu manter controle da reação com talidomida 100 mg e prednisona 20 mg após suspensão da azatioprina.

7	Amitriptilina 12,5mg; Talidomida 100mg; Prednisona 20mg.	Azatioprina 50mg; Talidomida 100mg; Prednisona 20mg.	Evoluia com quadros reacionais graves por 3 anos, apesar do uso de prednisona e talidomida. Paciente fez uso de 50 mg de azatioprina	Observou-se grande piora do estado geral com surgimento de neurite de ulnares e quadro cutâneo extenso, sendo necessário aumentar dose da prdnisona para 40mg e introduzir talidomida 200mg	Azatioprina foi suspensa
---	---	---	--	---	--------------------------

FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

O fenômeno de apoptose ocorre no ENH e pôde ser documentado utilizando a imunomarcacão com caspase 3 em 100% dos casos, sendo que em 57,14% foi realizado antes do tratamento com azatioprina e em 71,42% após 30 dias de utilizacão de azatioprina. A melhora no estado clínico dos pacientes foi observada em 85,70% dos pacientes após 30 dias de tratamento com azatioprina. A medicacão precisou ser suspensa em 14,28% dos casos antes de 30 dias de tratamento em virtude de piora clínica.

Na avaliacaão após 60 dias de tratamento 33,33% dos pacientes apresentaram remissão completa do ENH; 33,33% dos pacientes apresentaram significativo controle do ENH mesmo após a suspensão da azatioprina; 16,67% dos pacientes precisaram suspender o tratamento para ENH em virtude de hemorragia digestiva e 16,67% dos pacientes apresentaram piora clínica do ENH em virtude de reduçãõ da dose de azatioprina.

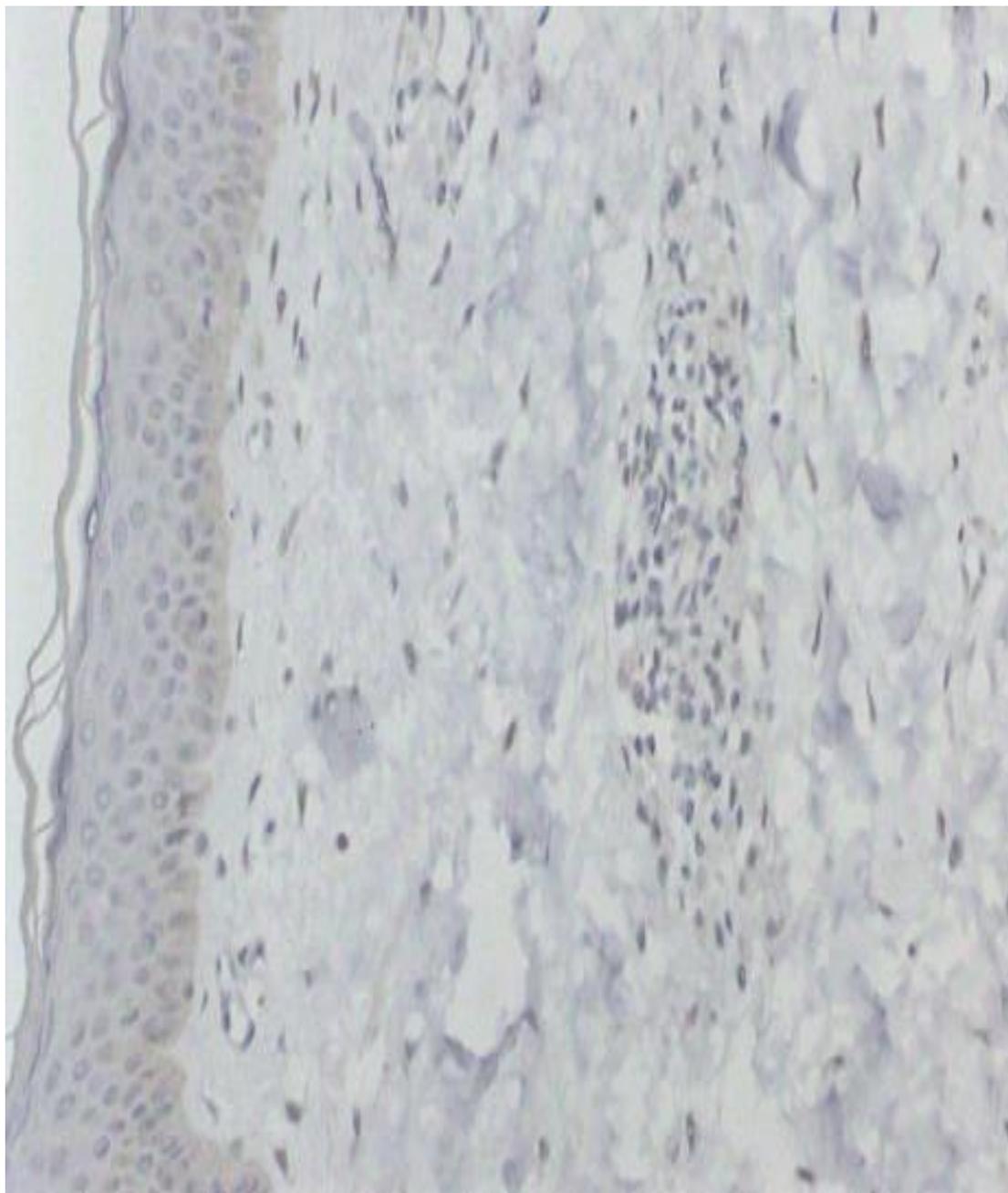
Tabela 3: Distribuicão dos casos correlacionando o número de células marcadas com caspase 3 em tecido antes e após 30 dias de uso de azatioprina, com a evoluçãõ clínica e presença de apoptose.

Paciente	Nº de células marcadas com caspase 3 em tecido antes do tratamento	Após 30 dias tratamento	Evolução clínica relacionado a apoptose em 30 dias
1	1	0	Melhora
2	0	2	Melhora
3	1	3	Melhora
4	0	1	Melhora
5	1	5	Melhora
6	5	0	Melhora
7	0	1	Piora

FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

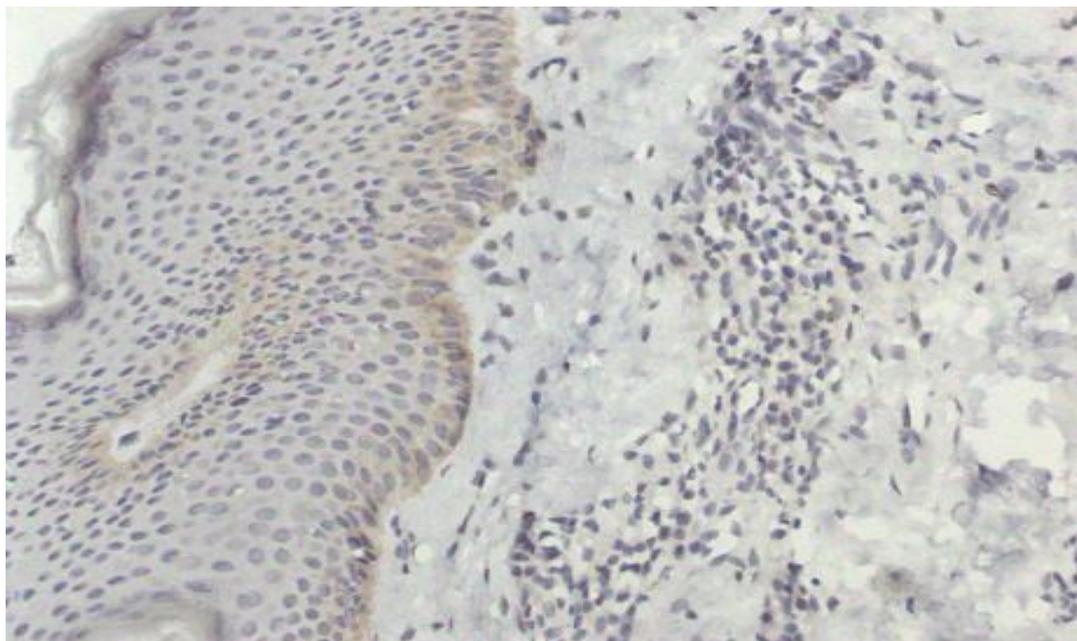
Por meio da estatística descritiva, o número mínimo de células marcadas com caspase 3 em tecidos antes do tratamento com azatioprina encontrado foi zero e o máximo foi de cinco células, perfazendo uma amplitude total de cinco células. Quanto às medidas de tendência central, obteve-se como média de 1,14 células marcadas com caspase 3 e mediana de uma célula. O desvio padrão encontrado foi de 1,7728 e o erro padrão foi 0,6701. Já a contagem mínima de células após o tratamento com a azatioprina foi zero e o máximo de cinco células, perfazendo uma amplitude de 5 células. Quanto às medidas de tendência central, obteve-se como média de 1,71 células marcadas com caspase 3 e mediana de uma célula. O desvio padrão encontrado foi de 1,7995 e o erro padrão foi 0,6801 (Figura x).

FIGURA III: Fotomicrografia de pele humana. Ausência de células inflamatórias em apoptose. Coloração com caspase 3. Aumento 20 x.



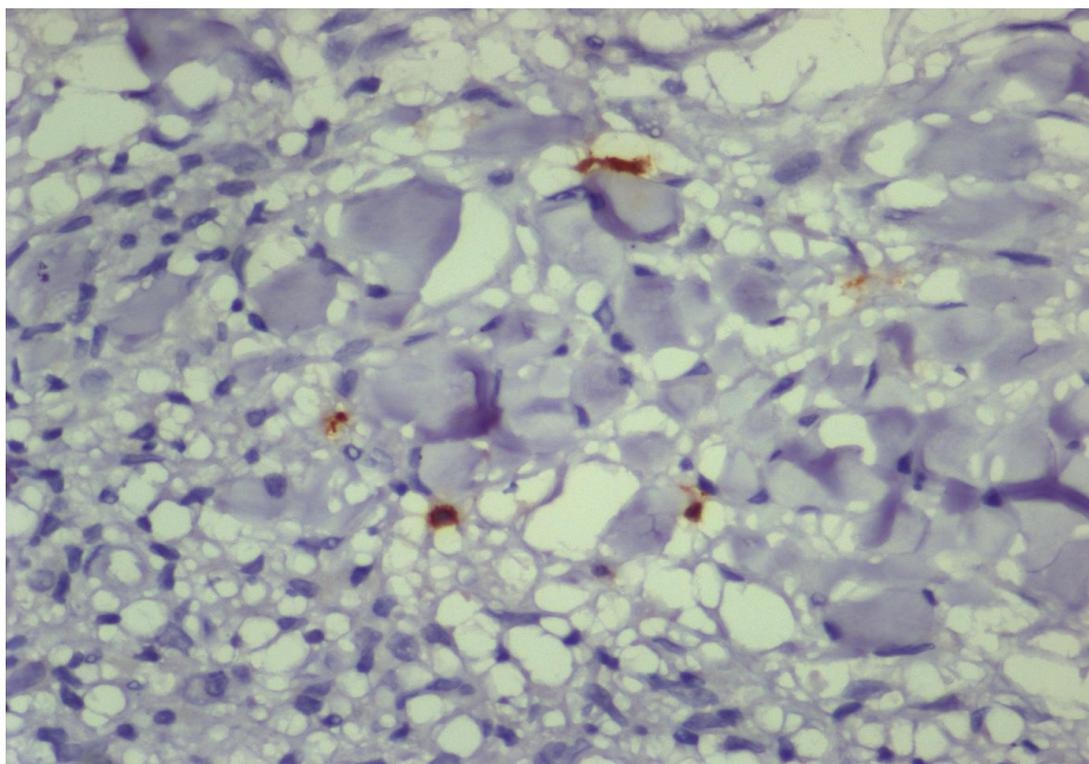
FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

FIGURA VI: Fotomicrografia de pele humana. Presença célula inflamatória em apoptose com marcação em castanho em campo superior esquerdo. Coloração com caspase 3. Aumento 40 x.



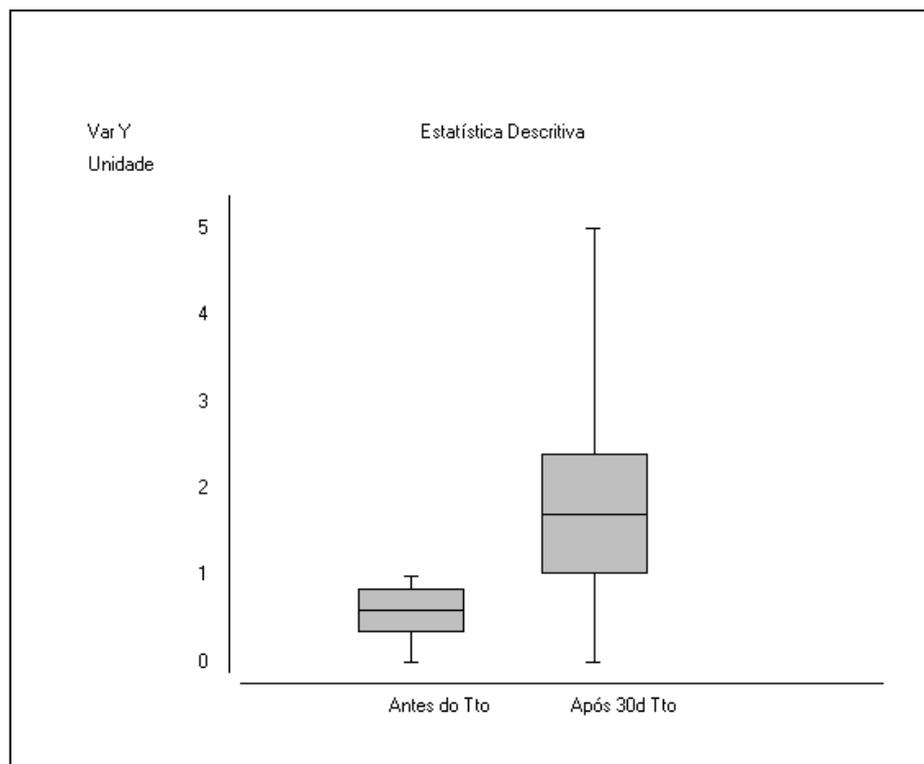
FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

FIGURA V: Fotomicrografia de pele humana. Células inflamatórias em apoptose. Coloração com caspase 3. Aumento 100 x.



FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

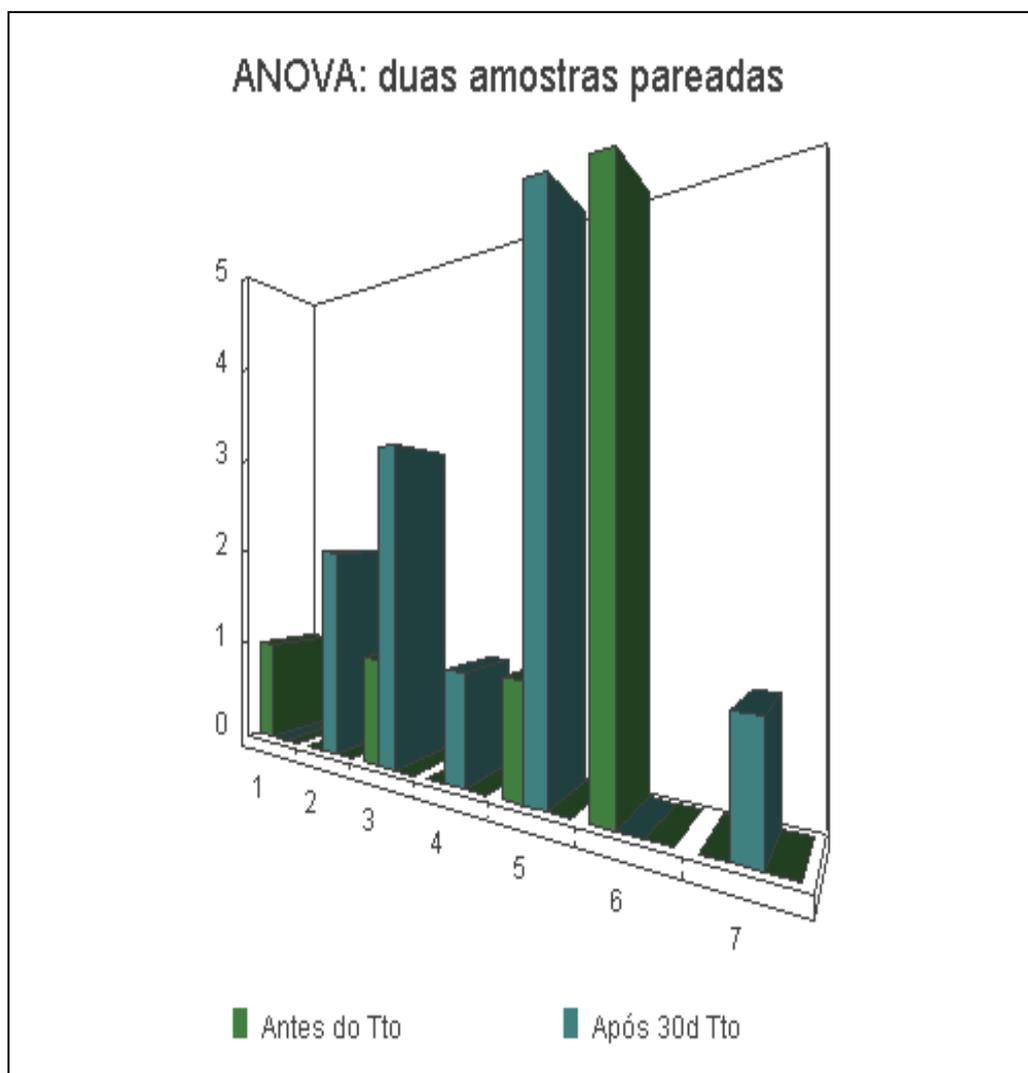
FIGURA VI: Variação no número de células em apoptose marcadas com caspase 3 antes e depois de 30 dias de tratamento com azatioprina.



FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

Não houve diferença estatisticamente significativa (teste ANOVA, $p > 0,05$) entre a contagem de células marcadas com caspase 3 antes do tratamento e 30 dias após o tratamento com azatioprina.

Gráfico IV: Número de células em apoptose marcadas com caspase 3 antes e depois de 30 dias de tratamento com azatioprina



FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

Tabela 4: Análise histopatológica das lesões antes e depois da terapêutica com azatioprina

Paciente	Histopatológico	
	Antes	Depois
1	Derme com infiltrado de linfomononucleares e histiócitos formando esboços de granulomas com moderados neutrófilos associados.	Presença de infiltrado de linfócitos e plasmócitos na derme, que se arruma ao redor de vasos e anexos.
2	Pele apresentando leve infiltrado de linfócitos com raros neutrófilos que se arruma ao redor de vasos com congestão.	Minima infiltração linfocitária que se estende na derme superficial e média.
3	Pele com derme onde se observa infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e moderados neutrófilos associado a edema, congestão. O infiltrado se arruma ao redor de nervos e anexos.	Pele com derme onde se observa edema e infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos com intensidade leve e estendendo-se na derme superficial e média.
4	Pele com derme onde se observa infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e moderados neutrófilos associado a edema, congestão. O infiltrado se arruma ao redor de nervos e anexos.	Pele com derme onde se observa edema e infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos com intensidade leve e estendendo-se na derme superficial e média.
5	Pele com derme onde se nota presença de granulomas duros estendendo-se na derme superficial e média e associada a moderado infiltrado de linfomononucleares com neutrófilos associados.	Pele com derme onde se observa presença de infiltrado de linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos que se estende na derme superficial e média.
6	Pele com presença de infiltrado linfohistocitário com moderados neutrófilos que se arruma ao redor de anexos.	Pele mostrando leve edema dérmico associado a infiltrado linfomononucleares que se arruma ao redor de anexos e vasos.
7	Pele com presença de infiltrado linfohistocitário com moderados neutrófilos que se arruma ao redor de anexos.	Pele mostrando leve edema dérmico associado a infiltrado linfomononucleares que se arruma ao redor de anexos e vasos.

FONTE: Núcleo de Medicina Tropical

6 – DISCUSSÃO

O Eritema Nodoso Hansênico (ENH) é uma complicação aguda da hanseníase que gera morbidade, internação hospitalar e incapacidade para o paciente. Seu mecanismo de aparecimento não é completamente claro, sendo o aumento do TNF- α grandemente implicado na sua patogênese (SAMPAIO *et al.*, 1991; SARNO *et al.*, 1991; SCHOLARD, 2006).

Embora a prednisona, clofazimina e talidomida sejam drogas documentadamente eficazes no controle do ENH, nem sempre estas conseguem resultados satisfatórios ou isentos de efeitos indesejados (HERNANDEZ, 2001) logo, o longo período até que se consiga o controle da reação é considerado um ponto negativo.

A talidomida tem se mostrado uma droga de grande utilidade no controle ENH, sua ação tem sido atribuída ao fato de conseguir diminuir os níveis de TNF- α , embora esta não seja a única alteração imunológica isolada que provoque a reação tipo II. O uso da talidomida ainda divide a opinião dos especialistas em virtude dos seus efeitos teratogênicos, não sendo amplamente disponível na maioria dos países do mundo (CRAWFORD, 2004; CRAWFORD, 2006).

Existem poucos relatos pontuais na literatura mundial descrevendo a eficácia da azatioprina no ENH (VERMA *et al.*, 2006; ATHEREYA, 2007), sendo que não há estudos brasileiros sobre o tema.

A apoptose de células inflamatórias em doenças imunomediadas tem sido alvo de vários estudos, pois há evidências de que o fenômeno é alterado nas doenças autoimunes e que a utilização de medicações que possam induzir apoptose de monócitos e linfócitos, resulta em controle da enfermidade (TEM HOVE *et al.*, 2006). No caso da hanseníase, o fenômeno da apoptose de células inflamatórias tem sido objeto de estudos

recentes, com publicação de dados discordantes (CREE *et al.*, 1987; ROJAS *et al.*, 1999; HERNANDEZ, 2003; HASAN *et al.*, 2006). Há relato do fenômeno de apoptose ocorrendo de forma expressiva em várias formas de hanseníase, em especial de forma multibacilares e também relato da supressão de apoptose pelo *M.leprae* (HASAN *et al.*, 2006). Não foram observados na literatura dados sobre a correlação entre a eficácia na utilização de azatioprina no ENH e o fenômeno de apoptose como já descrito em outras doenças autoimunes. (CREE *et al.*, 1987; ROJAS *et al.*, 1999; HERNANDEZ, 2003).

Os sete casos selecionados para utilizar azatioprina eram considerados graves ou refratários a terapia padrão, conforme critérios da OMS. Em virtude da complexidade do histórico clínico de ENH dos pacientes selecionados, optou-se por manter a medicação já em uso e acrescentar a azatioprina como terapia coadjuvante. Os resultados clínicos foram positivos em relação à melhora clínica do quadro de ENH.

O estudo com marcação de células inflamatórias por caspase 3 evidenciou que o fenômeno de apoptose ocorreu antes e após o tratamento da reação com azatioprina. Não foi possível observar de maneira significativa variação no número de células inflamatórias marcadas com caspase 3 neste estudo e nem uma correlação nítida entre a melhora clínica e o aumento ou diminuição do número de células inflamatórias marcadas em pele com ENH coletada após o trigésimo dia de tratamento. A comparabilidade desses dados com os disponíveis na literatura é complexa em virtude da diferença dos métodos utilizados para identificar células em apoptose (CREE *et al.*, 1985; WALSH *et al.*, 2004; AJITH *et al.*, 2005). Quanto à descrição dos dados referentes ao tratamento dos pacientes deste estudo, de difícil controle, pôde-se evidenciar que a azatioprina é muito eficaz para o controle da reação se em dose igual ou superior a 100mg/dia e quando esta terapia é combinada com Talidomida. Sua eficácia neste estudo foi de 85,71% (6 pacientes), com resultados laboratoriais avaliados

após 30 dias de tratamento. Nos pacientes não foram observados efeitos colaterais graves diretamente relacionados ao uso da azatioprina que provocassem a suspensão da droga. O caso 3 apresentou quadro de hemorragia digestiva associada à bulbodyodenite e teve o uso da medicação estudada suspenso. Entre os pacientes estudados, dois deles, o caso número 4 e o 7, apresentaram agudização importante da reação, relacionada ao uso de doses de azatioprina de 50 mg/dia.

O insucesso no tratamento do caso 4 pode ter ocorrido por ocasião da redução da dose de azatioprina de 100 mg para 50 mg/dia e do caso 7 pode estar relacionado com utilização de subdose de azatioprina.

CREE *et al.*, realizaram estudo descritivo de vários tipos de granulomas e puderam observar a ocorrência elevada tanto de mitoses quanto de apoptose em células de granulomas de pacientes com hanseníase *boderline* tuberculóide, *boderline* lepromatosa e lepromatosa. O presente estudo notou a ocorrência do fenômeno de maneira bem menos expressiva, tanto antes quanto após a utilização da azatioprina. A comparabilidade dos dados com o estudo de CREE *et al.*, não pode ser feita em virtude das diferentes técnicas de marcação e contagem de células em apoptose que foram utilizadas.

Por outro lado, Hasan e colaboradores demonstraram que o *M.leprae* induziria um “*downregulation*” dos genes “*bad*” e “*bak*” associado a uma resposta reduzida ao TNF- α resultando na inibição da apoptose em monócitos. Tal mecanismo poderia estar relacionado à disseminação da doença.

Neste estudo não se pode observar uma correlação numérica clara entre a quantidade de células inflamatórias em apoptose à gravidade do ENH e a melhora clínica após tratamento proposto com a azatioprina. Embora alguns estudos sugiram que um dos mecanismos pelo qual a azatioprina pode exercer sua atividade supressora seja

através da apoptose de células do infiltrado inflamatório, esta ação da droga não foi claramente documentada no presente estudo.

O fenômeno de apoptose já foi descrito em pacientes com hanseníase em relação à forma clínica apresentada segundo os critérios de Ridley-Jopling (CREE *et al.*, 1987), porém não há relato da descrição do fenômeno antes e após uma intervenção terapêutica como em outros tipos de doença imunomediadas com medicações imunossupressoras ou imunomoduladoras (TEN HOVE *et al.*, 2006).

7- CONCLUSÕES

O estudo clínico e imunopatológico de pacientes com eritema nodoso hansênico grave submetidos a tratamento com azatioprina para controle da reação, tendo como foco a observação do fenômeno de apoptose na pele, permitiu as seguintes conclusões para o grupo estudado:

A azatioprina é droga imunossupressora eficaz no tratamento de casos de ENH de difícil manejo. Esta pode induzir a remissão do ENH, assim como favorecer a diminuição da dose de corticoesteróides. Em doses insuficientes, menores que 100mg/dia, não tem benefício pra o controle do ENH.

Não foram descritos efeitos colaterais graves que levassem a suspensão da azatioprina.

O achado histopatológico em pele corada com HE mais significativo foi o desaparecimento do infiltrado neutrofílico após o uso da azatioprina. Na avaliação com HE a estrutura arquitetural de granuloma se manteve, bem como o infiltrado linfocítico, mesmo após a utilização da azatioprina.

O fenômeno de apoptose ocorre no ENH e pôde ser documentado utilizando a imunomarcacão com caspase 3 em todos os casos, antes e também após trinta dias de tratamento com azatioprina. Não houve variaçãõ considerada significativa entre o número de células evidenciadas com caspase 3 antes e após o tratamento com azatioprina.

A melhora no estado clínico dos pacientes foi observada em seis dos sete pacientes estudados após 30 dias de tratamento com azatioprina. A medicação precisou ser suspensa em um paciente em virtude de piora clínica. Os resultados coneguidos após

60 dias de tratamento incluem remissão completa do quadro de ENH e controle significativo da reação em mais da metade dos casos estudados

Não houve correlação considerada significativa entre o número de células evidenciadas com caspase 3 antes e após o tratamento com azatioprina e a melhora clínica apresentada pelos pacientes.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS *et al.* Immunologic tolerance. In: ABBAS,A.K.; LICHTMAN, A.H.; PROBER, J.S.; **Cellular and molecular immunology** 4th ed.New York.:W.B.Saunders company, 2000. p. 208-231.

ABEL, L., *et al.* Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **J. Infect. Dis.** **177**:133-145. 1998.

ADAMS, L. B., C. K. JOB, J. L. KRAHENBUHL. Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* infection in mice. **Infect. Immun.** **68**:5462-5465. 2000.

ADAMS, L. B., *et al.* The study of *Mycobacterium leprae* infection in interferon- γ gene-disrupted mice as a model to explore the immunopathologic spectrum of leprosy. **J. Infect. Dis.** **185**:S1-S8. 2002.

ADAMS, L. B., *et al.* L-Arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*.**J. Immunol.** **147**:1642-1646. 1991.

ADRAIN, C., CREAGH, E. M., AND MARTIN, S. J. Caspase Cascades in **Apoptosis. Caspases-their role in cell death and cell survival.** Ed. Marek Los and Henning Walczak. Molecular Biology Intelligence Unit 24. New York: New York, 2002. 41-51.

ALCAIS, A., *et al.* Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J. Infect. Dis.** **181**:302-308. 2000.

ALNEMRI, E. S., *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell** **87**:171. 1996.

ANDERSSON, A. K., *et al.* Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions.**Infect. Immun.** **73**:3725-3733.2005.

ARNOLDI, J., J. GERDES, H.-D. FLAD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **Am. J. Pathol.** **137**:749-753. 1990.

ASEFFA, A., M. A. DIETRICH, E. J. SHANNON. Effect of thalidomide on apoptosis of lymphocytes and neutrophils. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** **19**:313-326.1997.

ATKINSON, S. E., *et al.* Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** **72**:27-34. 2004.

AZULAY& AZULAY. **Dermatologia.** 3 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2004. p. 225.

- BARNES, P. F., *et al.* Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infect. Immun.** 60:1441-1446.1992.
- BARNETSON, R. S. *et al.* Cell mediated and humoral immunity in "reversal reactions." **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 44:267-274.1976.
- BOCHUD, P. Y., T. R. HAWN, A. ADEREM. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **J. Immunol.** 170:3451-3454.2003.
- BRIGHTBILL, H. D., *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science** 285:732-736. 1994.
- BRITTON, W. J., D. N. LOCKWOOD. Leprosy. **Lancet** 363:1209-1219.2004.
- BRITTON, W. J., L. HELLQVIST, A. BASTEN, R. L. RAISON. Mycobacterium leprae antigens involved in human immune responses. I. Identification of four antigens by monoclonal antibodies. **J. Immunol.** 135:4171-4177.1985.
- BROWNE, S. G., L. M. HOGERZEIL. "B 663" in the treatment of leprosy. Preliminary report of a pilot trial. **Lepr. Rev.** 33:6-10.1962.
- BURDICK, A. A., C. C. RAMIREZ. The role of mycophenolate mofetil in the treatment of leprosy reactions. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Infect.** 73:127-128.2005.
- BUSCHMAN, E., E. SKAMENE. Linkage of leprosy susceptibility to Parkinson's disease genes. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 72:169-170.2004.
- CHAN, E. S., B. N. CRONSTEIN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Res.** 4:266-273.2002.
- CHATTERJEE, D., A. D. ROBERTS, K. LOWELL, P. J. BRENNAN, I. M. ORMe. Structural basis for the capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. **Infect. Immun.** 60:1249-1253.1992.
- CHIN-A-LIEN, R. A., W. R. FABER, B. NAAFS. Cyclosporin A treatment in reversal reaction. **Trop. Geogr. Med.** 46:123-124.1994.
- CHIPLUNKAR, S., G. DE LIBERO, S. H. KAUFMANN. 1986. *Mycobacterium leprae*-specific Lyt-2⁺ T lymphocytes with cytolytic activity. **Infect. Immun.** 54:793-797.
- COLSTON, M. J., AND G. R. HILSON. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. **Nature** 262:736-741. 1976.
- COUPPIE, P., *et al.* Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV and leprosy. **Arch. Dermatol.** 140:997-1000.2004.
- CREAGH, E. M., H. CONROY, AND S. J. MARTIN. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev.** 193:10-21.2003.

CREE, I. A., S. NURBHAI, G. MILNE, AND J. S. BECK. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. **J. Clin. Pathol.** 40:1314-1319.1987.

CSIPO, I., *et al.*. Effect of Fas+ and Fas- target cells on the ability of NK cells to repeatedly fragment DNA and trigger lysis via the Fas lytic pathway. **Apoptosis** 3(1998): 105-114.1998.

DUNCAN, M. E., J. M. PEARSON, D. S. RIDLEY, R. MELSOM, G. BJUNE. Pregnancy and leprosy: the consequences of alterations of cell-mediated and humoral immunity during pregnancy and lactation. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 50:425-435.1982.

EIGLMEIER, K., *et al.*. The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. **Lepr. Rev.** 72:387-398. 2001.

ENARI, M., H. SAKAHIRA, H. YOKOYAMA, K. OKAWA, A. IWAMATSU, AND S. NAGATA. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature** 391:43-50.1998.

FERREIRA, F. R., L. Z. GOULART, H. D. SILVA, I. M. B. GOULART. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. **Int. J. Lepr. Other Mycobact.** 72:457-467.2004.

FINK, L.S., COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.**, 73: 1907-1916.2005.

FLAD, H. D., J. ARNOLDI, A. OHLERT, J. KAZDA, J. GERDES. Cytokine production and proliferative capacity of infiltrating cells in various forms of leprosy. **Trop. Med. Parasitol.** 41:307-309.1990.

FOSS, N. T., E. B. DE OLIVEIRA, C. L. SILVA. Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 61:218-226.1993.

FRANKEL, R. I., R. T. MITA, R. KIM, F. J. DANN. Resolution of type 1 reaction in multibacillary Hansen's disease as a result of treatment with cyclosporine. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 60:8-12.1992.

FSIHI, H., S. T. COLE. The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *polA* locus associated with genomic variability. **Mol. Microbiol.** 16:909-919.1995.

GARCIA, V. E., *et al.* IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. **J. Immunol.** 162:6114-6121.1999.

GIMENEZ, M. F., I. GIGLI, F. A. TAUSK. Differential expression of Langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. **Br. J. Dermatol.** 121:19-26.1989.

- GRUENHEID, S., P. GROS. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. **Curr. Opin. Microbiol.** 3:43-48.2000.
- HAANEN, J. B., *et al.* Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. **J. Exp. Med.** 174:583-592.1991.
- HAANPAA, M., D. N. LOCKWOOD, A. HIETAHARJU. Neuropathic pain in leprosy. **Lepr. Rev.** 75:7-18.2004.
- HAGGE, D. A., N. A. RAY, J. L. KRAHENBUHL, L. B. ADAMS. An in vitro model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of *Mycobacterium leprae* from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. **J. Immunol.** 172:7771-7779.2004.
- HAGGE, D., S. O. ROBINSON, D. SCOLLARD, G. MCCORMICK, D. L. WILLIAMS. 2002. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. **J. Infect. Dis.** 186:1283-1296.
- HAGUE, A., AND PARASKEVA, C. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. **Nature Cell Death and Differentiation** 3 September 2004: 1-7.
- HANCOCK, G. E., A. MOLLOY, B. K. AB, R. KIESSLING, M. BECX-BLEUMINK, Z. A. COHN, G. KAPLAN. In vivo administration of low-dose human interleukin-2 induces lymphokine-activated killer cells for enhanced cytolysis in vitro. **Cell. Immunol.** 132:277-284.1991.
- HARTSKEERL, R. A., M. Y. DE WIT, P. R. KLATSER. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J. Gen. Microbiol.** 135:2357-2364.1989.
- HASHIMOTO, K., Y. MAEDA, H. KIMURA, K. SUZUKI, A. MASUDA, M. MATSUOKA, M. MAKINO. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. **Infect. Immun.** 70:5167-5176.2002.
- HEDGECOCK, E. M., J. E. SULSTON, J. N. THOMSON, 1983 Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science** 220: 1277-1279
- HEINE, H., E. LIEN. 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 130:180-192.
- HORI, S., S. SAKAGUCHI. 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. **Microbes Infect.** 6:745-751.
- HUMPHRES, R. C., R. H. GELBER, J. L. KRAHENBUHL. 1982. Suppressed natural killer cell activity during episodes of erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.** 49:500-508.

HUNGER, R. E., P. A. SIELING, M. T. OCHOA, M. SUGAYA, A. E. BURDICK, T. H. REA, P. J. BRENNAN, J. T. BELISLE, A. BLAUVELT, S. A. PORCELLI, R. L. MODLIN. 2004. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. **J. Clin. Investig.** 113:701-708.

JACOBSON, M. D., M. WEIL and M. C. RAFF, 1997 Programmed cell death in animal development. **Cell** 88: 347–354

KALEAB, B., T. OTTENOFF, P. CONVERSE, E. HALAPI, G. TADESSE, M. ROTTENBERG, R. KIESSLING. 1990. Mycobacterial-induced cytotoxic T cells as well as nonspecific killer cells derived from healthy individuals and leprosy patients. **Eur. J. Immunol.** 20:2651-2659.

KANG, T. J., C. E. YEUM, B. C. KIM, E. Y. YOU, G. T. CHAE. 2004. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunol.** 112:674-680.

KANG, T. J., G. T. CHAE. 2001. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 31:53-58.

KANG, T. J., S. B. LEE, G. T. CHAE. 2002 . A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine** 20:56-62.

KAPLAN, G., G. WALSH, L. S. GUIDO, P. MEYN, R. A. BURKHARDT, R. M. ABALOS, J. BARKER, P. A. FRINDT, T. T. FAJARDO, R. CELONA, Z. A. COHN. 1992 . Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. **J. Exp. Med.** 175:1717-1728.

KAPLAN, G., N. K. MATHUR, C. K. JOB, I. NATH, Z. A. COHN. 1989. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:8073-8077.

KAPLAN, G., R. KIESSLING, S. TEKLEMARIAM, G. HANCOCK, G. SHEFTEL, C. K. JOB, P. CONVERSE, T. H. OTTENHOFF, M. BECX-BLEUMINK, M. DIETZ, Z. A. COHN. 1989. The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin 2. **J. Exp. Med.** 169:893-907.

KAR, B. R., R. BABU. 2004. Methotrexate in resistant ENL. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 72:480-482.

KARIN, M. 1998. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? **Cell** 93:487-490.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIMURA, H., Y. MAEDA, F. TAKESHITA, L. E. TAKAOKA, M. MATSUOKA, M. MAKINO. 2004. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand. J. Immunol.* 60:278-286.

KIRKALDY, A. A., A. C. MUSONDA, S. KHANOLKHAR-YOUNG, S. SUNEETHA, D. N. LOCKWOOD. 2003. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 134:447-453

KOPPEL, E. A., I. S. LUDWIG, M. S. HERNANDEZ, T. L. LOWARY, R. R. GADIKOTA, A. B. TUZIKOV, C. M. VANDENBROUCKE-GRAULS, Y. VAN KOOYK, B. J. APPELMELK, T. B. GEIJTENBEEK. 2004 . Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. *Immunobiology* 209:117-127

KRAHENBUHL, J. L., L. B. ADAMS. 2000. Exploitation of gene knockout mice models to study the pathogenesis of leprosy. *Lepr. Rev.* 71:S170-S175.

KRUTZIK, S. R., M. T. OCHOA, P. A. SIELING, S. UEMATSU, Y. W. NG, A. LEGASPI, P. T. LIU, S. T. COLE, P. J. GODOWSKI, Y. MAEDA, E. N. SARNO, M. V. NORGARD, P. J. BRENNAN, S. AKIRA, T. H. REA, R. L. MODLIN. 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 9:525-532.

KUMAR, B., S. DOGRA, I. KAUR. 2004. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 72:125-133.

LITTLE, D., S. KHANOLKHAR-YOUNG, COULTHART.A, S. SUNEETHA, D. N. J. LOCKWOOD. 2001. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect. Immun.* 69:3413-3417.

LIU, X., H. ZOU, C. SLAUGHTER, AND X. WANG. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184

LOCKSHIN, R. A., AND Z. ZAKERI. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:545-550

LOCKSHIN, R. A., AND Z. ZAKERI. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2405-2419.

LOCKWOOD, D. N. 1996. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. *Lepr. Rev.* 67:253-259. [

LOCKWOOD, D. N., H. H. SINHA. 1999. Pregnancy and leprosy: a comprehensive literature review. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 67:6-12.

LOCKWOOD, D. N., S. SUNEETHA. 2005. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bull. W. H. O.** 83:230-235.

LOS, M., S. WESSELBORG, AND K. SCHULZE-OSTHOFF. 1999. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. **Immunity** 10:629-639

MAEDA, Y., M. GIDOH, N. ISHII, C. MUKAI, M. MAKINO. 2003. Assessment of cell mediated immunogenicity of Mycobacterium leprae-derived antigens. **Cell. Immunol.** 222:69-77.

MAHAJAN, V. K., N. L. SHARMA, R. C. SHARMA, A. SHARMA. 2003. Pulse dexamethasone, oral steroids and azathioprine in the management of erythema nodosum leprosum. **Lepr. Rev.** 74:171-174

MALTZMAN, J.S., KORETZKY, G.A.2003. Azathioprine: old drug, new actions. **J Clin Invest.** 111:1122-1124

MANANDHAR, R., N. SHRESTHA, C. R. BUTLIN, P. W. ROCHE.2002 . High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. **Clin. Exp. Immunol.** 128:333-338.

MARLOWE, S. N., R. A. HAWKSWORTH, C. R. BUTLIN, P. G. NICHOLLS, D. N. LOCKWOOD.2004 . Clinical outcomes in a randomized controlled study comparing azathioprine and prednisolone versus prednisolone alone in the treatment of severe leprosy type 1 reactions in Nepal. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 98: 602-609.

MARQUES, M. A., V. L. ANTONIO, E. N. SARNO, P. J. BRENNAN, M. C. PESSOLANI.2001 . Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. **J. Med. Microbiol.** 50:23-28.

MASCARELL, L., P. TRUFFA-BACHI. 2003. New aspects of cyclosporin a mode of action: from gene silencing to gene up-regulation. **Mini Rev. Med. Chem.** 3:205-214.

MEHRA, V., B. R. BLOOM, A. C. BAJARDI, C. L. GRISSO, P. A. SIELING, D. ALLAND, J. CONVIT, X. D. FAN, S. W. HUNTER, P. J. BRENNAN, ET AL.1992 . A major T cell antigen of Mycobacterium leprae is a 10-kD heat-shock cognate protein. **J. Exp. Med.** 175:275-284.

MEIER, A., L. HEIFETS, R. J. WALLACE, JR., Y. ZHANG, B. A. BROWN, P. SANDER, AND E. C. MILLER, R. A., J. Y. SHEN, T. H. REA, J. P. HARNISCH. 1987. Treatment of chronic erythema nodosum leprosum with cyclosporine A produces clinical and immunohistologic remission. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 55:441-449.

METZSTEIN, M. M., G. M. STANFIELD and H. R. HORVITZ, 1998 Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. **Trends Genet.** 14: 410-416.

MIRA, M. T., A. ALCAIS, V. T. NGUYEN, M. O. MORAES, C. DI FLUMERI, H. T. VU, C. P. MAI, T. H. NGUYEN, N. B. NGUYEN, X. K. PHAM, E. N. SARNO, A. ALTER, A. MONTPETIT, M. E. MORAES, J. R. MORAES, C. DORE, C. J. GALLANT, P. LEPAGE, A. VERNER, E. VAN DE VOSSE, T. J. HUDSON, L. ABEL, E. SCHURR. 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature** 427:636-640.

MISMITTAL, A., R. S. MISHRA, I. NATH. 1989. Accessory cell heterogeneity in lepromatous leprosy: dendritic cells and not monocytes support T cell responses. **Clin. Exp. Immunol.** 76:233-239.]

MISRA, N., A. MURTAZA, B. WALKER, N. P. NARAYAN, R. S. MISRA, V. RAMESH, S. SINGH, M. J. COLSTON, I. NATH. 1995. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. **Immunology** 86:97-103.

MODLIN, R. L., F. M. HOFMAN, C. R. TAYLOR, AND T. H. REA. 1983. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.** 8:182-189.

MODLIN, R. L., J. F. GEBHARD, C. R. TAYLOR, AND T. H. REA. 1983. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.** 53:17-24.

MODLIN, R. L., J. MELANCON-KAPLAN, S. M. M. YOUNG, C. PIRMEZ, H. KINO, J. CONVIT, T. H. REA, B. R. BLOOM. 1988. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:1213-1217.

MODLIN, R., T. REA. 1994. Immunopathology of leprosy, p.225 -234. In R. C. Hastings and D. V. A. Oromolla (ed.), *Leprosy*. **Churchill Livingstone, New York, N.Y.**

MONOT, M., N. HONORE, T. GARNIER, R. ARAOZ, J. Y. COPPEE, C. LACROIX, S. SOW, J. S. SPENCER, R. W. TRUMAN, D. L. WILLIAMS, R. GELBER, M. VIRMOND, B. FLAGEUL, S. N. CHO, B. JI, A. PANIZ-MONDOLFI, J. CONVIT, S. YOUNG, P. E. FINE, V. RASOLOFO, P. J. BRENNAN, S. T. COLE. 2005. On the origin of leprosy. **Science** 308:1040-1042.

MORAES, M. O., E. N. SARNO, A. S. ALMEIDA, B. C. SARAIVA, J. A. NERY, R. C. MARTINS, E. P. SAMPAIO. 1999. Cytokine mRNA expression in **leprosy**: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scand. J. Immunol.** 50:541-549.

MORAES, M. O., E. N. SARNO, R. M. TELES, A. S. ALMEIDA, B. C. SARAIVA, J. A. NERY, E. P. SAMPAIO. 2000. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **J. Investig. Dermatol.** 115:935-941.

MORAES, M. O., N. C. DUPPRE, P. N. SUFFYS, A. R. SANTOS, A. S. ALMEIDA, J. A. NERY, E. P. SAMPAIO, E. N. SARNO. 2001 . Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. **Immunogenetics** 53:45-47.

MOREIRA, A. L., G. KAPLAN, L. G. VILLAHERMOSA, T. J. FAJARDO, R. M. ABALOS, R. V. CELLONA, M. V. BALAGON, E. V. TAN, G. P. WALSH. 1998. Comparison of pentoxifylline, thalidomide and prednisone in the treatment of ENL. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 66:61-65.

MOSCHELLA, S. L. 2004. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.** 51:417-426.

MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN, R. L. COFFMAN. 1986. Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** 146:2348-2357.

MUELLER, D. L. 2004. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. **Nat. Immunol.** 5:883-890.

MUTIS, T., E. M. KRAAKMAN, Y. E. CORNELISSE, J. B. HAANEN, H. SPITS, R. R. DE VRIES, T. H. OTTENHOFF. 1993. Analysis of cytokine production by Mycobacterium-reactive T cells. Failure to explain Mycobacterium leprae-specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. **J. Immunol.** 150:4641-4651.

NAAFS, B. 1996. Bangkok Workshop on Leprosy Research: treatment of reactions and nerve damage. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 64:S21-28.

NAAFS, B. 2003. Treatment duration of reversal reaction: a reappraisal. Back to the past. **Lepr. Rev.** 74:328-336.

NATH, I., N. VEMURI, A. L. REDDI, M. BHARADWAJ, P. BROOKS, M. J. COLSTON, R. S. MISRA, V. RAMESH. 2000 . Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. **Lepr. Rev.** 71(Suppl.):S130-137.

NATH, I., N. VEMURI, A. L. REDDI, S. JAIN, P. BROOKS, M. J. COLSTON, R. S. MISRA, V. RAMESH. 2000 . The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. **Immunol. Lett.** 75:69-76.

NERY, J. A., A. R. PERISSE, A. M. SALES, L. M. VIEIRA, R. V. SOUZA, E. P. SAMPAIO, E. N. SARNO. 2000. The use of pentoxifylline in the treatment of type 2 reactional episodes in leprosy. **Indian J. Lepr.** 72:457-467.

NG, V., G. ZANAZZI, R. TIMPL, J. TALTS, J. L. SALZER, P. J. BRENNAN, A. RAMBUKKANA. 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell** 103:511-529.

- NIGOU, J., C. ZELLE-RIESER, M. GILLERON, M. THURNHER, G. PUZO. 2001 . Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. **J. Immunol.** 166:7477-8485.
- NOGUEIRA, N., G. KAPLAN, E. LEVY, E. N. SARNO, P. KUSHNER, A. GRANELLI-PIPERNO, L. VIEIRA, V. COLOMER GOULD, W. LEVIS, R. STEINMAN, ET AL. 1983. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. **J. Exp. Med.** 158:2165-2170.
- NORMAN, G., G. JOSEPH, J. RICHARD. 2004. Relapses in multibacillary patients treated with multi-drug therapy until smear negativity: findings after twenty years. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 72:1-7.
- OCHOA, M. T., S. STENGER, P. A. SIELING, S. THOMA-USZYNSKI, S. SABET, S. CHO, A. M. KRENSKY, M. ROLLINGHOFF, E. NUNES SARNO, A. E. BURDICK, T. H. REA, R. L. MODLIN. 2001. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. **Nat. Med.** 7:174-179.
- OLIVEIRA, R. B., M. T. OCHOA, P. A. SIELING, T. H. REA, A. RAMBUKKANA, E. N. SARNO, R. L. MODLIN. 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect. Immun.** 71:1427-1433.
- OTTENHOFF, T. H., R. R. DE VRIES. 1987. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 55:521-534..
- PETRI, V., E. V. MENDES, B. BEIGUELMAN. 1985. Histology of the Mitsuda reaction of healthy adults with no known contacts with leprosy patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 53:540-545
- PRIGOZY, T. I., P. A. SIELING, D. CLEMENS, P. L. STEWART, S. M. BEHAR, S. A. PORCELLI, M. B. BRENNER, R. L. MODLIN, M. KRONENBERG. 1997 . The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. **Immunity** 6:187-197.
- QUISMORIO, F. P., JR., T. REA, S. CHANDOR, N. LEVAN, G. J. FRIOU. 1978. Lucio's phenomenon: an immune complex deposition syndrome in lepromatous leprosy. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 9:184-193.
- RAMASESH, N., L. B. ADAMS, S. G. FRANZBLAU, J. L. KRAHENBUHL. 1991. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.** 59:2864-2869.
- RAMBUKKANA, A., G. ZANAZZI, N. TAPINOS, J. L. SALZER. 2002 . Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science** 296:927-931.

REDDY, V. M., J. F. O'SULLIVAN, P. R. GANGADHARAM. 1999. Antimycobacterial activities of riminophenazines. **J. Antimicrob. Chemother.** 43:615-623.

RICHARDUS, J. H., P. G. NICHOLLS, R. P. CROFT, S. G. WITHINGTON, W. C. SMITH. 2004. Incidence of acute nerve function impairment and reactions in leprosy: a prospective cohort analysis after 5 years of follow-up. **Int. J. Epidemiol.** 33:337-343.

RIDLEY, D. S., K. B. RADIA. 1981. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 49:383-392.

RIDLEY, D. S., W. H. JOPLING. 1966. Classification of leprosy according to immunity—a five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 34:255-273.

RIENECK, K., M. DIAMANT, P. M. HAAHR, M. SCHONHARTING, K. BENDTZEN. 1993. In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. **Immunol. Lett.** 37:131-138.

ROJAS, R. E., S. O. DEMICHELIS, E. N. SARNO, A. SEGAL-EIRAS. 1997. IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10-kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 19:65-74.

ROSAT, J. P., E. P. GRANT, E. M. BECKMAN, C. C. DASCHER, P. A. SIELING, D. FREDERIQUE, R. L. MODLIN, S. A. PORCELLI, S. T. FURLONG, M. B. BRENNER. 1999. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ ab T-cell pool. **J. Immunol.** 162:366-371.

ROY, S., W. MCGUIRE, C. G. N. MASCIE-TAYLOR, S. HAZRA, A. V. S. HILL, D. KWIATKOWSKI. 1997. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J. Infect. Dis.** 176:530-532.

SAKAHIRA, H., M. ENARI, AND S. NAGATA. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature** 391:96-99.

SALGAME, P., J. S. ABRAMS, C. CLAYBERGER, H. GOLDSTEIN, J. CONVIT, R. L. MODLIN, B. R. BLOOM. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science** 254:279-282.

SAMPAIO, E. P., A. L. MOREIRA, E. N. SARNO, A. M. MALTA, G. KAPLAN. 1992. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. **J. Exp. Med.** 175:1729-1737.

SAMPAIO, E. P., E. N. SARNO, R. GALILLY, Z. A. CONH, G. KAPLAN. 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.** 173:699-703.

SAMPAIO, E. P., G. KAPLAN, A. MIRANDA, J. A. NERY, C. P. MIGUEL, S. M. VIANA, E. N. SARNO. 1993. The influence of thalidomide on the clinical and

immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J. Infect. Dis.** 168:408-414.

SAMPAIO, E. P., M. O. MORAES, J. A. NERY, A. R. SANTOS, H. C. MATOS, E. N. SARNO. 1998. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). **Clin. Exp. Immunol.** 111:300-308.

SANTOS, A. R., P. N. SUFFYS, P. R. VANDERBORGHT, M. O. MORAES, L. M. VIEIRA, P. H. CABELLO, A. M. BAKKER, H. J. MATOS, T. W. HUIZINGA, T. H. OTTENHOFF, E. P. SAMPAIO, E. N. SARNO. 2002. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J. Infect. Dis.** 186:1687-1691.

SANTOS, A. R., V. BALASSIANO, M. L. OLIVEIRA, M. A. PEREIRA, P. B. SANTOS, W. M. DEGRAVE, P. N. SUFFYS. 2001. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-LEPROSY therapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 96:1129-1133.

SANTOS, D. O., S. L. SANTOS, D. ESQUENAZI, J. A. NERY, M. DEFRUYT, K. LORRE, H. VAN HEUVERSWYN. 2001. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi** 70:15-24.

SARNO, E. N., G. E. GRAU, L. M. M. VIEIRA, J. A. NERY. 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1B during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.** 84:103-108.

SAUNDERS, J., 1966 Death in embryonic systems. **Science** 154: 604–612.

SCHLEIMER, R. P. 1993. An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 45(Suppl. 1):S3-S7; discussion, S43-S44.

SCHLESINGER, L. S., M. A. HORWITZ. 1991. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **J. Exp. Med.** 174:1031-1038.

SCHON, T., R. H. HERNANDEZ-PANDO, Y. NEGESSE, R. LEEKASSA, T. SUNDZVIST, S. BRITTON. 2001. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **Br. J. Dermatol.** 145:809-815.

SCOLLARD, D. M., L. B. ADAMS, T. P. GILLIS, J. L. KRAHENBUHL, R. W. TRUMAN, AND D. L. WILLIAMS. 2006. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.** 19:338-381

SERGEANTSON, S. 1983. HLA and susceptibility to leprosy. **Immunol. Rev.** 70:89-112.

SHANNON, E. J., F. SANDOVAL. 1995. Thalidomide increases the synthesis of IL-2 in cultures of human mononuclear cells stimulated with concanavalin-A, staphylococcal enterotoxin A, and purified protein derivative. **Immunopharmacology** 31:109-116.

SHANNON, E. J., R. O. MIRANDA, M. J. MORALES, R. C. HASTINGS. 1981. Inhibition of de novo IgM antibody synthesis by thalidomide as a relevant mechanism of action in leprosy. **Scand. J. Immunol.** 13:553-562.

SHANNON, E., F. SANDOVAL. 1996. Thalidomide can be either agonistic or antagonistic to LPS evoked synthesis of TNF-alpha by mononuclear cells. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 18:59-72.

SHEKIN, J. 1965. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. **Clin. Pharmacol. Ther.** 6:303-306.

SHETTY, V. P., M. W. UPLEKAR, N. H. ANTIA. 1996. Primary resistance to single and multiple drugs in leprosy—a mouse footpad study. **Lepr. Rev.** 67:280-286.

SHI, L., R. P. KRAUT, R. AEBERSOLD, A. H. GREENBERG. 1992. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. **J. Exp. Med.** 175:553-566.

SIBLEY, L. D., AND J. L. KRAHENBUHL. 1987. *Mycobacterium leprae*-burdened macrophages are refractory to activation by gamma interferon. **Infect. Immun.** 55:446-450.

SIBLEY, L. D., J. L. KRAHENBUHL. 1988. Defective activation of granuloma macrophages from *Mycobacterium leprae*-infected nude mice. **J. Leukoc. Biol.** 43:60-66.

SIBLEY, L. D., J. L. KRAHENBUHL. 1988. Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.** 56:1912-1919.]

SIDDIQUI, M. R., S. MEISNER, K. TOSH, K. BALAKRISHNAN, S. GHEI, S. E. FISHER, M. GOLDING, N. P. SHANKER NARAYAN, T. SITARAMAN, U. SENGUPTA, R. PITCHAPPAN, A. V. HILL. 2001. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nat. Genet.** 27:439-441.

SIELING, P. A., R. L. MODLIN. 1994. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunopharmacology** 191:378-387.

SIELING, P. A., D. CHATTERJEE, S. A. PORCELLI, T. I. PRIGOZY, R. J. MAZZACCARO, T. SORIANO, B. R. BLOOM, M. B. BRENNER, M. KRONENBERG, P. J. BRENNAN, R. L. MODLIN. 1995. CD-1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. **Science** 269:227-230.

SIELING, P. A., D. JULLIEN, M. DAHLEM, T. F. TEDDER, T. H. REA, R. L. MODLIN, S. A. PROCELLI. 1999. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. **J. Immunol.** 162:1851-1858.

- SIELING, P. A., X. H. WANG, M. K. GATELY, J. L. OLIVEROS, T. MCHUGH, P. F. BARNES, S. F. WOLF, L. GOLKAR, M. YAMAMURA, Y. YOGI.1994 . IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. **J. Immunol.** **153**:3639-3647.
- SPIERINGS, E., T. DE BOER, L. ZULIANELLO, T. H. OTTENHOFF.2000 . Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunol. Cell Biol.** **78**:349-355.
- SPIES, T., M. BRESNAHAN, S. BAHRAM, D. ARNOLD, G. BLANCK, E. MELLINS, D. PIOUS, R. DEMARS. 1990. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. **Nature** **348**:744-747.
- SREENIVASAN, P., R. S. MISRA, D. WILFRED, I. NATH.1998 . Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. **Immunology** **95**:529-536.
- STENGER, S., D. A. HANSON, R. TEITLEBAUM, P. DEWAN, K. R. NIAZI, C. J. FROELICH, T. GANZ, S. THOMA-USZYNSKI, A. MELIAN, C. BOGDAN, S. A. PORCELLI, B. R. BLOOM, A. M. KRENSKY, R. L. MODLIN.1998 . An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science** **282**:121-125.
- STENNER-LIEWEN, F., H. LIEWEN, J. M. ZAPATA, K. PAWLOWSKI, A. GODZIK, AND J. C. REED. 2002. CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. **J. Biol. Chem.** **277**:9633-9636.
- STRIETER, R. M., D. G. REMICK, P. A. WARD, R. N. SPENGLER, J. P. LYNCH III, J. LARRICK, S. L. KUNKEL. 1988. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **155**:1230-1236.
- SUGUMARAN, D. S. 1998. Leprosy reactions—complications of steroid therapy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** **66**:10-15.
- TAILLEUX, L., O. SCHWARTZ, J. L. HERRMANN, E. PIVERT, M. JACKSON, A. AMARA, L. LEGRES, D. DREHER, L. P. NICOD, J. C. GLUCKMAN, P. H. LAGRANGE, B. GICQUEL, O. NEYROLLES.2003 . DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. **J. Exp. Med.** **197**:121-127.
- TELES, R. M., M. O. MORAES, N. T. GERALDO, A. M. SALLES, E. N. SARNO, E. P. SAMPAIO. 2002. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. **Arch. Dermatol. Res.** **294**:355-362.
- TEO, S. K., K. E. RESZTAK, M. A. SCHEFFLER, K. A. KOOK, J. B. ZELDIS, D. I. STIRLING, S. D. THOMAS. 2002. Thalidomide in the treatment of leprosy. **Microbes Infect.** **4**:1193-1202.

TIEDE I, FRITZ G, STRAND S, POPPE D, DVORSKY R, STRAND D, LEHR HA, WIRTZ S, BECKER C, ATREYA R, ET AL. 2003. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD43 T lymphocytes. **J Clin Invest.** 111:1133–1145

TRAMONTANA, J. M., U. UTAIPAT, A. MOLLOY, P. AKARASEWI, M. BURROUGHS, S. MAKONKAWKEYOON, B. JOHNSON, J. D. KLAUSNER, W. ROM, G. KAPLAN. 1995. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. **Mol. Med.** 1:384-397.

TRUMAN, R., A. B. FONTES, A. B. DE MIRANDA, P. SUFFYS, T. GILLIS. 2004. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. **J. Clin. Microbiol.** 42:2558-2565.

TUNG, K. S., E. UMLAND, P. MATZNER, K. NELSON, V. SCHAUF, L. RUBIN, D. WAGNER, D. SCOLLARD, P. VITHAYASAI, V. VITHAYASAI, ET AL. 1987 . Soluble serum interleukin 2 receptor levels in leprosy patients. **Clin. Exp. Immunol.** 69:10-15.

UNDERHILL, D. M., A. OZINSKU, K. D. SMITH, A. ADEREM. 1999 . Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signals in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:14459-14463.

UYEMURA, K., J. F. DIXON, L. WONG, T. H. REA, R. L. MODLIN. 1986. Effect of cyclosporine A in erythema nodosum leprosum. **J. Immunol.** 137:3620-3623.

VAN GOMPEL, A., E. VAN DEN ENDEN, J. VAN DEN ENDE. 1994 . Cyclosporin A is not very effective in erythema nodosum leprosum (ENL). **Trop. Geogr. Med.** 46:331.

VERHAGEN, C. E., E. A. WIERENGA, A. A. BUFFING, M. A. CHAND, W. R. FABER, P. K. DAS. 1997. Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T cell reactivity in lesional skin: a follow-study. **J. Immunol.** 159:4474-4483.

VERMA, K.K. P., SRIVASTAVA, P., MINZ, A., VERMA, K. **Role of azathioprine in preventing recurrences in a patient of recurrent erythema nodosum leprosum.** Leprosy Review, 77: 225–229, 2006

VERMA, K.K., MANCHANDA, Y. **Long-term safety and toxicity of azathioprine in patients with air-borne contact dermatitis.** Indian Journal of Dermatology and Venereological Leprosy, 67: 75–77, 2001.

WATTS, C. 2004. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. **Nat. Immunol.** 5:685-692.

WEINBERG, J. B. 1998. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. **Mol. Med.** 4:557-591

WEMAMBU, S. N., J. L. TURK, M. F. WATERS, R. J. REES. 1969. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. **Lancet** :933-935.

WILKINSON, R. J., D. N. LOCKWOOD. 2005. Antigenic trigger for type 1 reaction in leprosy. **J. Infect.** 50:242-243.

WILLIAMS, D. L., M. TORRERO, P. R. WHEELER, R. W. TRUMAN, M. YODER, N. MORRISON, W. R. BISHAI, T. P. GILLIS. 2004. Biological implications of Mycobacterium leprae gene expression during infection. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 8:58-72.

WORLD HEALTH ORGANIZATION STUDY GROUP. 1982. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organization, Geneva, Switzerland.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2004. Leprosy elimination project. Status report 2002-2003. **World Health Organization, Geneva, Switzerland.**

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

YAMAMURA, M., X. H. WANG, J. D. OHMEN, K. UYEMURA, T. H. REA, B. R. BLOOM, AND R. L. MODLIN. 1992. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **J. Immunol.** 149:1470-1475.

ZAHEER, S. A., K. R. BEENA, H. K. KAR, A. K. SHARMA, R. S. MISRA, A. MUKHERJEE, R. MUKHERJEE, H. KAUR, R. M. PANDEY, R. WALIA, ET AL. 1995. Addition of immunotherapy with Mycobacterium w vaccine to multi-drug therapy benefits multibacillary leprosy patients. **Vaccine** 13:1102-1110.

ZAHEER, S. A., R. MUKHERJEE, B. RAMKUMAR, R. S. MISRA, A. K. SHARMA, H. K. KAR, H. KAUR, S. NAIR, A. MUKHERJEE, AND G. P. TALWAR. 1993. Combined multidrug and Mycobacterium w vaccine therapy in patients with multibacillary leprosy. **J. Infect. Dis.** 167:401-

Apêndice I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Apoptose de linfócitos T e evolução clínica do ENH: ensaio com azatioprina

Qual o objetivo principal da pesquisa?

Desenvolver estudo científico envolvendo pacientes com HANSENÍASE EM REAÇÃO TIPO II GRAVE.

Como será realizada a pesquisa?

Por meio de coleta de dados de prontuário médico de maneira sigilosa para tabulação informatizada por meio do programa BIOSTAT e posterior análise de dados, avaliações clínicas e coleta de material para exames laboratoriais.

Como os dados e o materiais biológicos (pele ou sangue) dos pacientes serão utilizados?

Em nenhuma hipótese o material coletado será divulgado abertamente, cedido, vendido ou disposto de maneira que possa gerar dano, constrangimento ou prejuízo físico, material, moral ou emocional aos pacientes.

A pesquisa tem intere

Os procedimentos diagnósticos e ou laboratoriais oferecem riscos?

Os procedimentos diagnósticos tem riscos mínimos e estão relacionados a exames que pacientes fora da pesquisa realizam de forma rotineira(coleta de exames de sangue e ou biópsia de pele).

Os pacientes serão submetidos a avaliações com ênfase no exame dermatológico e neurológico, não sendo expostos a nenhuma técnica ou modalidade propedêutica nova ou laboratorial experimental, não aprovada ou não estabelecida por meio de testes prévios, que possa gerar dano, constrangimento ou prejuízo físico, material, moral ou emocional aos pacientes.

Que benefícios esta pesquisa oferece?

Pacientes terão benefício de assistência médica multidisciplinar e o fornecimento da poliquimioterapia para tratamento da hanseníase e das reações hansênicas.

O estudo traz o benefício também de poder contribuir para com a comunidade científica com informações novas sobre o assunto estudado

Sou obrigado a participar da pesquisa?

A participação na pesquisa é opcional.O paciente tem total liberdade de optar por participar ou não da pesquisa, sair da pesquisa a qualquer momento ou solicitar troca de médico assistente sem qualquer tipo de ônus, constrangimento ou de prejuízo para o seguimento e tratamento do mesmo

PESQUISADOR R

CONSENTIMENTO

EU, _____DECLARO QUE LI CONJUNTAMENTE COM O PESQUISADOR RESPONSÁVEL PELA PESQUISA OS TERMOS DO CONSENTIMENTO DESCRITO ACIMA E QUE ME SINTO PERFEITAMENTE ESCLARECIDO SOBRE O CONTEÚDO DA PESQUISA, ASSIM COMO DE SEUS BENEFÍCIOS E RISCOS.DECLARO QUE DE MINHA LIVRE VONTADE ACEITO PARTICIPAR COOPERANDO COM AS INFORMAÇÕES E SOLICITAÇÕES A MIM REALIZADAS.

ASSINATURA DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL E DATA

Apêndice II



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

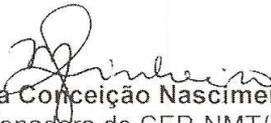
1. Protocolo: N°169/2005-CEP/NMT
2. Projeto de Pesquisa: ESTUDO DA EFICÁCIA DE FÁRMACOS IMUNOSSUPRESSORES NO MANEJO E TRATAMENTO DE REAÇÕES HANSÊNICAS GRAVES.
3. Pesquisador Responsável: Juarez Antonio Simões Quaresma.
4. Instituição / Unidade: NMT/UFPA.
5. Data de Entrada: 1º/12/2005.
6. Data do Parecer: 15/12/2005.

PARECER

Considerando: - a urgência em iniciar o estudo referente a proposta em tela; - que o protocolo apresentado, atende as exigências da resolução 196/96/CNS/MS, decidimos aprová-lo "ad referendum" e , apresentá-lo à próxima reunião prevista para 15/12/2005.

Parecer: APROVADO

Belém, 10 de dezembro de 2005.


Profª Mª da Conceição Nascimento Pinheiro
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.

Apêndice III

PROJETO REAÇÃO HANSÊNICA/AZATIOPRINA

Identificação

Nome:

Idade: ____ anos Sexo: _____

Ocupação: _____

Endereço: _____ Telefone:

Procedência: _____

História da doença

Data do diagnóstico: ____/____/____

Forma clínica Inicial: _____ Reclassificação:

BAAR: _____ Tratamento: _____

Histopatologia: _____

Episódio reacional anterior? _____ Quantos? _____ Tipo:

 Tipo I lesões cutâneas neurite isolada lesões cutâneas e nervosas

Descrição: _____

Dia 0: Data: ____/____/____

Hemograma: Hemácias: _____ Htc: _____ Hgb: _____ Leucócitos:

Tipo II

ENH isolado ENH e manifestações sistêmicas

Manifestações sistêmicas isoladas eritema polimorfo

reação de Lúcio

Descrição: _____

Histopatológico da lesão reacional:

Dia 15: ____/____/____

Hemograma: Hemácias: _____ Htc: _____ Hgb: _____

Leucócitos: _____

TGO: ____ TGP: ____ Uréia: ____ Creatinina: ____ VHS: ____ PCR:

Dia 60: ____/____/____

Hemograma: Hemácias: _____ Htc: _____ Hgb: _____

Leucócitos: _____

TGO: ____ TGP: ____ Uréia: ____ Creatinina: ____ VHS: ____ PCR:

Níveis séricos de TNF- α : _____

Histopatológico da lesão reacional:

1ª Avaliação (15 dias):

2ª Avaliação (30 dias):

3ª Avaliação (60 dias):

4ª Avaliação (90 dias):
