



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA Th17 EM PACIENTES
PORTADORES DE HANSENÍASE**

ISABELLA DA MOTTA PASSOS

MANAUS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**

ISABELLA DA MOTTA PASSOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA Th17 EM PACIENTES
PORTADORES DE HANSENÍASE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

**Orientadora: Prof^ª Doutora Lúcia de Paula
Coorientadora: Prof^ª Doutora Adriana Malheiro**

MANAUS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA**

ISABELLA DA MOTTA PASSOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA Th17 EM PACIENTES PORTADORES
DE HANSENÍASE**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública
realizada em/...../.....

Banca examinadora

Presidente: Nome: Prof^a Doutora Lúcia de Paula

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Assinatura:

Examinador (a): Nome:.....

Instituição:

Assinatura:

Examinador (a): Nome:.....

Instituição:

Assinatura:

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

P289a Passos, Isabella da Motta
Avaliação da resposta Th17 em pacientes portadores de hanseníase /
Isabella da Motta Passos. - Manaus, AM : UFAM, 2011.
28 f.: il. color.; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Mestre em Imunologia). Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof. Dra. Lúcia de Paula.

1. Hanseníase 2. Citocinas I. Paula, Lúcia de (Orient.) II. Título

CDU (2007): 616-002.73(043.3)

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao meu pai, Luiz Fernando, que foi a pessoa que me convidou a conhecer o mundo científico, desde o primeiro período da graduação e que me acompanha até hoje.

A minha querida família, Leny, Luiz, Victor, Ana, André, Letícia, pelo apoio e compreensão em minhas escolhas e por todo empenho e dedicação que me permitiram chegar até aqui.

Agradecimentos

À **Deus**, por me conceder forças durante essa caminhada.

À minha orientadora, **Dra Lúcia de Paula**, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pelas valiosas lições de vida.

Aos pacientes, pela importante e inestimável participação neste projeto e pela colaboração com o desenvolvimento da pesquisa no Amazonas.

À **Dra Adriana Malheiro, Dr. Felipe Naveca e Dra. Cristina Cardoso** pelas preciosas sugestões e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, **Maísa, George, Matilde, Jesineide, André, Daniel e Cynthia**, pela amizade e colaboração em diferentes etapas do projeto e por todos os momentos bons e ruins passados juntos.

À **Direção da Fundação Alfredo da Matta**, por abrir espaço à pesquisa e pela contribuição para minha vida profissional.

À **equipe médica do Alfredo da Matta**, pela ajuda no recrutamento dos pacientes, em especial à **Dra Maria da Graça Cunha**, por me passado experiência junto a ela no ambulatório e pela ajuda valiosa no meu projeto.

À **equipe de enfermagem do Alfredo da Matta**, em especial a **Marlice e Cilene**, na abordagem e recrutamento dos pacientes.

Aos **residentes de dermatologia** pela ajuda na coleta da biópsia.

Ao **Dr. José Cabral Junior** e a enfermeira **Patrícia Amorin**, pela incrível disponibilidade em ajudar na coleta dos indivíduos controles.

Aos mestres **Cleverson Matioli e Kiyoshi Fukutani** pela inestimável ajuda com os dados de qPCR.

À **Pós-graduação** pela formação intelectual e pessoal oferecidas aos alunos.

Aos **colegas de pós-graduação**, em especial a **Fernanda, Juliana e Liziara**, pela amizade, companheirismo e por todos os momentos ímpares passados juntos.

A **todos os meus amigos**, pelo apóio, incentivo e compreensão durante esses árduos dois anos de mestrado.

À **CAPES e FAPEAM**, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, foram importantes para a realização deste trabalho.

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, de amplo espectro clínico, que afeta principalmente a pele e os nervos. Apenas 5% dos indivíduos infectados irão desenvolver a doença. Os pacientes apresentam diversas formas clínicas associadas diretamente com a resposta imune, onde indivíduos do polo tuberculoide apresentam vigorosa resposta mediada por células, com perfil predominante de citocinas Th1, resultando na contenção bacilar e indivíduos do polo virchowiano apresentam resposta imune humoral, com produção de citocinas Th2, que ocasionam a dispersão bacilar. Embora estejam descritas as respostas Th1 e Th2 na hanseníase, vários aspectos da imunologia desta doença precisam ainda ser elucidados. A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina capaz de produzir inflamação, indizindo quimicinas (CXCL8) e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSG), com aumento subsequente de neutrófilos para o local na infecção. Tem papel importante no desenvolvimento patológico das doenças autoimunes e na infecção por patógenos extracelulares, quando produzidas pelos linfócitos T *helper*. Nas infecções intracelulares, como é caso das micobacterioses, a IL-17 atua na defesa nos primeiros momentos da infecção, sendo produzida pelas células do sistema inato, como os linfócitos T $\delta\gamma$. Este tipo de resposta imunológica ainda não havia sido estudada na hanseníase e com intuito de investigar o padrão de resposta IL-17 em pacientes com hanseníase foi realizada coleta de sangue periférico para avaliação da produção das citocinas IL-17, IL-23 e IL-6 no soro pela técnica de ELISA. Também foi avaliada a expressão dos genes para IL-17, IL-23 e IL-6 em biópsias de lesão cutânea pela reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR). Este estudo teve como objetivo avaliar as citocinas relacionadas à resposta IL-17 e comparar o padrão de resposta observado entre os pacientes dos pólos tuberculoide, virchowiano e indivíduos controles. Os resultados mostraram ausência de detecção de IL-17 e IL-23 no sangue periférico tanto nos pacientes quanto nos controles, porém IL-6 estava aumentada nos pacientes virchowianos. Quando avaliados a expressão dessas citocinas na biópsia lesão dos pacientes de hanseníase, todas as formas clínicas apresentaram baixa expressão de IL-17, IL-23 e IL-6 em comparação aos controles. Além disso, foi demonstrada correlação negativa da expressão de IL-17 e IL-23 com o índice baciloscópico. Esta ausência de IL-17 em pacientes pode ser uma característica constitutiva genética da hanseníase ou um evento circunstancial induzido pela presença local do patógeno, como um mecanismo de escape.

Palavras Chaves: Hanseníase, citocinas, Th17

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, with a broad clinical spectrum, which affects the skin and nerves. Only 5% of infected individuals will develop the disease. Patients present with various clinical forms directly associated with the immune response, where individuals that have the tuberculoid pole, presents a vigorous cell-mediated response, with predominant Th1 cytokines profile, resulting in bacillary containment and individuals that have the lepromatous pole, presents humoral immune response with production of Th2 cytokines, which cause bacillary spread. Although they are described Th1 and Th2 responses in leprosy, various aspects of immunology of this disease have yet to be elucidated. Interleukin 17 (IL-17) is a cytokine capable of producing inflammation, inducing quimicinas (CXCL8) and colony-stimulating factor granulocyte (G-CSF), with subsequent increase of neutrophils to the infection site. Plays an important role in the pathological development of autoimmune diseases and infection by extracellular pathogens, when produced by T helper lymphocytes. In intracellular infections, as is the case of mycobacteria, IL-17 acts in the defense early in the infection, being produced by cells of the innate system, such as lymphocytes T $\delta\gamma$. This type of immune response has not been studied in leprosy and the aim to investigate the response pattern of IL-17 in leprosy patients was collected from peripheral blood to evaluate the levels of IL-17, IL-23 and IL-6 in serum by ELISA. We also analyzed the expression of genes for IL-17, IL-23 and IL-6 in biopsies of skin lesions by polymerase chain reaction quantitative (qPCR). This study aimed to evaluate the IL-17 and related cytokines response and compare the pattern of response observed among patients of the tuberculoid pole, lepromatous and healthy subjects. The results showed no detection of IL-17 and IL-23 in peripheral blood in as many patients as in controls, but IL-6 was increased in lepromatous patients. When evaluated the expression of these cytokines in biopsy lesions of leprosy patients, all clinical forms showed low expression of IL-17, IL23 and IL-6 compared to healthy subjects. Moreover, negative correlation was demonstrated expression of IL-17 and IL-23 with the bacterial index. This absence of IL-17 in patients may be a constitutive feature of leprosy genetic or circumstantial event induced by a local presence of the pathogen, as an escape mechanism.

KeyWords: Leprosy, cytokines, Th17

Lista de Abreviaturas

- APC** – Célula apresentadora de antígenos
- BB** -Boderline-Boderline
- cDNA**- Ácido desoxirribonucleico complementar
- CR**- Receptor de complemento
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- FoxP3** – *Forkhead Box P3*
- G-CSF** - Fator estimulante de colônia granulocítica
- GWAS** – Estudo genômico de associação amplo
- HB** - Hanseníase boderline
- HLA** -Antígeno leucocitário humano
- HT** - Hanseníase tuberculoide
- HL** - Hanseníase lepromatosa
- IFN- γ** -Interferon gama
- IL** - Interleucina
- LAM** - Lipoarabinomanose
- LL** - Hanseníase lepromatosa
- MamLAM** - Manosilato lipoarabinomanose
- MB** - Multibacilar
- mRNA** - Ácido ribonucleico mensageiro
- NOD** - Domínio de oligomerização de nucleotídeos
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- PB** - Paucibacilar
- PBS** – Tampão salina fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PCR - Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

PGL -I - Glicolípídeo fenólico – I

PPD - Derivado proteico purificado

PQT – Poliquimioterapia

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA - Ácido ribonucleico

ROR γ t - receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinoico

RT- Transcrição reversa

Taq – Enzima polimerase de *Thermus aquaticus*

TGF- β - Fator de crescimento transformador

Th- Linfócito T *helper*

Treg – Linfócito T regulador

T $\gamma\delta$ - Linfócito T gamma-delta

TLR - Receptor semelhante ao Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TT - Hanseníase tuberculoide

VDR – Receptor de vitamina D

μ L - microlitro

μ m - micrômetro

Sumário

ARTIGO DE REVISÃO	13
Resposta imune na hanseníase: muito além de Th1 e Th2.....	13
Resumo.....	13
Abstract	13
Introdução	13
Aspectos imunológicos.....	15
Considerações Finais.....	23
Referências	25
ARTIGO ORIGINAL	30
Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy	30
Abstract	30
Introduction	31
Methods	32
Results	34
Discussion	39
Acknowledgments	41
References	42
ANEXOS.....	45

ARTIGO DE REVISÃO

Resposta imune na hanseníase: muito além de Th1 e Th2

Immune Response in Leprosy: Th1, Th2 and beyond

Isabella da Motta-Passos¹ e Lúcia de Paula^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

2 Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus, Brazil

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa complexa causada pelo *Mycobacterium leprae* e influenciada por aspectos genéticos do hospedeiro. Apenas 5% dos indivíduos infectados irão desenvolver a doença. Os pacientes apresentam diversas formas clínicas associadas diretamente com a resposta imune. No entanto, o início infecção é primordial para o estabelecimento ou não da doença. Neste aspecto, o sistema imune inato tem papel fundamental na retenção da dispersão bacilar, porém o *M. leprae* possui diversos mecanismos de escape, que levam a sobrevivência deste patógeno no organismo. O entendimento da resposta imunológica na hanseníase, tanto de caráter inato como adaptativo, ainda não está totalmente elucidado e é importante para esclarecer os mecanismos entre o hospedeiro e a micobactéria e oferecer, futuramente, novos caminhos que auxiliem na prevenção, no diagnóstico e no tratamento desta doença.

Abstract

Leprosy is a complex infectious disease caused *Mycobacterium leprae* and influenced by the genetics of the host. Only 5% of infected individuals will develop the disease. Patients present different clinical forms directly associated with the immune response. However, early infection is paramount to the establishment of the disease or not. In this respect, the innate immune system plays a fundamental role in the retention of bacterial spread, but the *M. leprae* has several escape mechanisms, leading to survival of this pathogen in the body. Understanding the immune response in leprosy, both innate and adaptive, is still not fully elucidated and it is important to clarify the mechanisms between the host and mycobacteria and offer in the future, new ways to assist in prevention, diagnosis and treatment of this disease.

Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, sendo descrita desde 4000 a.c, nos papiros do Egito antigo¹. Até meados de 1800 pensava-se que era uma doença hereditária, devido ao acometimento de pessoas dentro de uma mesma família. Por volta de 1860, o médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, suspeitou que a doença fosse de origem infecciosa e não somente devido às condições hereditárias. Para comprovar essa hipótese, Hansen passou a isolar os doentes na enfermaria do hospital onde trabalhava ou em lugares

afastados da cidade e observou um declínio do número de casos entre familiares, sugerindo que seria uma doença de caráter contagioso². A partir de então, Hansen começou a trabalhar examinando os nódulos de pacientes hansênicos e em 1874 ele descreveu:

“... em todo tubérculo lepromatoso retirado de um paciente vivo... um corpúsculo, que se assemelha muito a uma bactéria, vivendo dentro das células; não em todas, mas em muitas delas...”¹

Estava descrito pela primeira vez, o que mais tarde seria chamado de *Mycobacterium leprae* ou bacilo de Hansen.

Na hanseníase as características clínicas do paciente estão diretamente relacionadas com a sua imunidade. A forma clínica tuberculoide (TT) reflete uma resposta imune celular com contenção do bacilo, caracterizada pela formação de granulomas epitelioides. Clinicamente apresenta-se como máculas hipopigmentadas ou placas eritematosas, assimetricamente distribuídas pelo corpo, podendo ou não ocorrer dano neural^{3,4}. Inversamente, a hanseníase virchowiana ou lepromatosa (LL ou LL) apresenta uma resposta imune predominantemente humoral, sendo observada infiltração generalizada pelo tegumento, onde podem ser encontrados nódulos e tubérculos, além do comprometimento de múltiplos troncos nervosos^{3,4}. Dentro do espectro clínico da doença, a hanseníase borderline é a forma clínica que caminha entre os pólos tuberculoide e lepromatoso e pode ser dividida em três subtipos: borderline tuberculoide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL)⁵.

A dicotomia Th1/Th2 está bem descrita na hanseníase, como veremos a seguir, porém ela não contempla todos os aspectos observados nessa doença complexa, existindo ainda questões a serem respondidas que não se satisfazem com essa dicotomia: i) a susceptibilidade observada em 5% da população exposta ao bacilo, que provavelmente estaria relacionada a polimorfismos genéticos associados à imunidade inata nas mucosas ou à resposta celular na pele; ii) a ocorrência das formas clínicas não polares ou borderline; iii) a ocorrência dos estados reacionais, caracterizados pela exacerbação da resposta inflamatória frente aos antígenos do *M. leprae*; iv) a influência de outros tipos de resposta imune adaptativas, como as células T regulatórias e outros tipos resposta T auxiliares.

Além das questões citadas acima, uma incansável busca tem sido realizada à procura de um marcador imunológico que auxilie na identificação de indivíduos na fase subclínica ou na fase inicial da doença quando baciloscopia é negativa. Nesta revisão serão abordados os

aspectos da imunologia inata e adaptativa na hanseníase, enfatizando os mecanismos de evasão do bacilo.

Aspectos imunológicos

Desde a época de Hansen já se tinha noção de que o aparecimento da hanseníase se deve a fatores genéticos (aparecimento da infecção entre familiares) e ambientais (condições socioeconômicas desfavoráveis). Posteriormente, com o desenvolvimento das técnicas imunológicas ficou claro que a imunidade do indivíduo também tinha um papel importante na caracterização das formas clínicas dos pacientes de hanseníase⁴.

Em 2001, Cole e colaboradores, sequenciaram o genoma do *M. leprae* e observaram um grande número de genes deletados e inativados (perda por mutação ou pseudogenes), demonstrando que o *M. leprae* pouco evoluiu ao longo dos anos, ficando restrito a poucas vias metabólicas e ambientes específicos para seu crescimento^{6,7}. Posteriormente, outro estudo comparou a variabilidade genética de quatro cepas do *M. leprae* originadas do Brasil, América do Norte, Índia e da Tailândia e relataram que elas eram 99,995% idênticas⁸. Esses resultados são consistentes com a hipótese que *M. leprae* se originou de um único clone, não havendo diferença entre as cepas, portanto não sendo responsáveis pelas diversas formas clínicas da doença⁹.

Rotberg, em 1938, especulava a presença de um “Fator N” ou fator natural, que seria responsável pela resistência contra o bacilo, presente em 90 a 95% dos indivíduos adultos. As pessoas não portadoras do “Fator N” seriam anérgicas e desenvolveriam a forma lepromatosa após infecção¹⁰. Ainda hoje, não se sabe ao certo a que se devem as várias apresentações clínicas da hanseníase, mas estas são atribuída aos fatores genéticos do hospedeiro, como polimorfismos de receptores e de citocinas, assim como coinfeção por helmintos, que estimulariam a indução de resposta Th2 frente ao bacilo e as condições socioeconômicas, que afetariam a transmissibilidade do bacilo¹¹⁻¹³. No entanto, se levarmos em consideração que o sistema imune possui vias redundantes, é provável que a infecção se estabeleça devido um conjunto de fatores ausentes na resposta ao bacilo e não a um fator determinado somente.

Resposta imune inata

O bacilo de Hansen, que possui rota de entrada pelo trato respiratório e excepcionalmente por lesão em pele, é recebido por macrófagos e células dendríticas, que possuem capacidade de fagocitar e apresentar seus antígenos^{14,15}. Nesta etapa inicial do contato que, provavelmente, será determinado se o indivíduo eliminará completamente o bacilo ou desenvolverá a doença. Existem trabalhos demonstrando que o *M. leprae* é capaz de modular a resposta imune no início da infecção atuando em diversos mecanismos imunes, incluindo alterações com os receptores de reconhecimento do patógenos e escape das vias microbicidas.

Citocinas da resposta inata

As citocinas são proteínas secretadas pelas células que participam da resposta imune e levam ao estado de alerta para outras células. Elas estão presentes desde o momento da entrada do patógeno no hospedeiro e regulam funções vitais para eliminação da infecção ou persistência do patógeno.

Um estudo realizado por Sinsimer e colaboradores demonstrou que nas primeiras horas de interação entre os monócitos de indivíduos saudáveis e o *M. leprae* ocorre a produção de níveis muito baixos ou até mesmo ausentes das interleucinas IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- α)¹⁶.

Outra via importante, que parece estar ausente na imunidade inicial a essa micobactéria é associada à presença de citocina IL-17. Esta citocina é capaz de produzir inflamação, induzindo quimiocinas (CXCL8) e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), com migração subsequente de neutrófilos para o local na infecção¹⁷. A IL-17 teria caráter inato e atuaria na região de mucosa inibindo a disseminação bacteriana, assim como observado em outras infecções intracelulares¹⁸⁻²⁰. Foi recentemente demonstrado que em indivíduos com hanseníase crônica há baixíssimos níveis de IL-17 e citocinas relacionadas, sugerindo um efeito imunomodulador por parte do *M. leprae* ou uma deficiência genética do hospedeiro (Motta-Passos: submetidos para publicação).

Juntos esses dados sugerem que no primeiro momento a reação dos monócito/macrófagos é inata e não depende da polarização Th1 ou Th2.

Receptores de reconhecimento do patógeno

Para que ocorra a produção de citocinas é necessário primeiro que o patógeno seja reconhecido pelas células do sistema imune inato. O *M. leprae* é reconhecido por diversos receptores presentes nas células de defesa. Os mais descritos são os receptores do tipo TLR (*Toll like receptors*). Existem diversos tipos de receptores TLR em humanos que reconhecem estruturas de diferentes partes de patógenos. Krutzik e colaboradores²¹ estimularam células do sangue periférico de pacientes e controles com *M. leprae* e observaram a expressão de vários integrantes da família TLR, TLR1 ao TLR10, constatando o aumento da expressão de TLR1 e TLR2 nos pacientes (Figura 1A). O mesmo trabalho demonstrou que as células dendríticas e macrófagos de pacientes com hanseníase TT apresentavam significativamente mais TLR1 e TLR2 em suas superfícies quando comparados aos pacientes LL. Os TLR1 e TLR2 podem formar heterodímeros que ativam a via vitamina D dependente e a transcrição de genes de citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (IFN- γ), quando estimulados pelo antígeno triacil-lipoproteína (19-kDa e 33-kDa) e a lipoproteínas MMP-II (major membrane protein-II) do *M. leprae*²¹⁻²⁴. No entanto, tem sido descrito que IL-4 produzida durante a infecção diminui a expressão dos TLR2 nos monócitos²⁵ e a IL-10 suprime a produção de IL-12^{26,27}.

Diversos estudos detectaram polimorfismos nos genes dos receptores TLR1 e TLR2. Malhotra e colaboradores associaram polimorfismo na proteína Arg677Trp do gene TLR2 ao pólo lepromatoso da hanseníase, em indivíduos nascidos na Korea²⁸. Posteriormente, observou-se que esses pacientes com este polimorfismo apresentam deficiência na ativação do fator de transcrição NF- κ B, diminuindo a produção de citocinas IL-12, IL-2, TNF- α e IFN- γ , porém aumentando a produção de IL-10, citocina inibitória da resposta celular²⁹. Outro estudo demonstrou polimorfismo em três SNPs também do gene TLR2 associado aos pacientes que apresentavam reação reversa na Etiópia³⁰. Além disso, o polimorfismo no gene TLR1 (T1805G) em pacientes de hanseníase no Nepal demonstrou relação com distúrbio regulatório da resposta imune inata, de modo a diminuir a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF em células mononucleares do sangue periférico quando estimuladas com *M. leprae*³¹.

Outros integrantes da família TLR também são descritos na imunidade contra *M. leprae*. O TLR6 e TLR2 são expressos na membrana de diversas células do sistema inato e também são capazes de formar heterodímeros para o reconhecimento de lipopeptídeos bacterianos. Na hanseníase o TLR6/TLR2 induzem a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados pelo *M. leprae* (Figura 1B). Estes constituem sítios intracelulares para

a síntese de eicosanoides (PGE₂), que por sua vez, são capazes de imunomodular negativamente o aparecimento da resposta Th1³². Outros estudos confirmam que produção de PGE₂ em pacientes LL suprime a resposta Th1³³.

O receptor envolvido no reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, o TLR4, está associado a identificação principalmente de bactérias gram-negativas. O *M. leprae* não possui LPS na sua membrana, mesmo assim, foi observado diminuição de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-6) em culturas de monócitos quando expostas ao *M. leprae* e LPS juntos em relação à exposição somente ao LPS³⁴, sugerindo interferência na função do TLR4. Além disso, o mesmo grupo observou que polimorfismo de 2 SNPs (G896A e C1196T) no gene TLR4 está associado à proteção contra a hanseníase na população da Etiópia³⁴.

Os estudos relacionados com receptores de reconhecimento de patógenos no ambiente intracelular na hanseníase são escassos. O TLR9 é um representante desses receptores intracelulares que se liga a motivos CpG DNA não metilados bacterianos e virais. Este receptor é descrito no reconhecimento e geração de resposta imune inata em infecções por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium*³⁵⁻³⁷, sugerindo um papel importante também na infecção pelo *M. leprae*. Já os receptores NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) presentes em macrófagos, monócitos e células dendríticas, reconhecem derivados de peptídeoglicanos (muramyl dipeptide), porém sua relação com a hanseníase se restringe a estudos genéticos e ainda não foi descrita sua expressão entre as formas clínicas na hanseníase. Foi observado recentemente que polimorfismo no receptor NOD2 na população chinesa é associado à susceptibilidade a forma multibacilar³⁸ e na população do Nepal é associada à susceptibilidade à hanseníase *per se* e a estados reacionais³⁹.

Os macrófagos têm papel fundamental na defesa do hospedeiro contra essa micobactéria. Eles expressam CD209 que é uma lectina do tipo C, também conhecida como DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) que possui um domínio de reconhecimento de carboidratos e é capaz de se unir à parede do *M. leprae* através do lipoglicano ManLAM (*mannosylated lipoarabinomannan*). Esse reconhecimento induz posterior fagocitose de micobactérias^{40,41} (Figura 1E) No entanto, a expressão de CD209 no local da lesão é observada de forma similar em todas as formas da hanseníase²². Outra lectina tipo C, CD206 ou receptor de manose, presente em macrófagos maduros, se liga à lipoarabinomanose (LAM) presente na parede micobacteriana, não sendo capaz de induzir inflamação através de TNF- α ^{42,43}.

Portanto, os receptores de reconhecimentos do *M. leprae* podem ter uma disfunção genética primária, relacionada a polimorfismos, ou sofrerem interferência de mecanismos de escape próprio do *M. leprae*, até o momento em processo de investigação. Supõem-se que esses fatores teriam importância na patogenia da hanseníase por influenciar na supressão da resposta inata de ativação e alertas das células no início da infecção.

Sistema complemento

O sistema complemento também atua na imunidade contra o *M. leprae*. Tyagi e colaboradores⁴⁴ realizaram estudos com pacientes de hanseníase e observaram que o sistema complemento pode ser ativado por imunocomplexos isolados do soro desses pacientes. Além disso, o bacilo íntegro é capaz de induzir a opsonização por fragmentos de C3 e ser reconhecido por receptores de complemento CR1 e CR3 presentes em células dendríticas e macrófagos, levando à fagocitose (Figura 1C)⁴⁵. Posteriormente, estudos mostraram que C3 e anticorpos IgM ligam-se ao glicolípido-fenólico I (PGL-1) e promovem a ativação da via clássica e alternativa do complemento, assim como induzem fagocitose (Figura 1D)⁴⁶. GOMES e colaboradores⁴⁷ demonstraram aumento da capacidade hemolítica do soro pela ativação do complemento em pacientes LL, indicada pelo consumo das frações C3 e C4 no soro desses pacientes. Além disso, Callegaro-Filho⁴⁸ observou que C3 ativado coestimula células T através da proteína reguladora do complemento, CD46, um processo conhecido por participar na diferenciação de células T reguladoras por meio da indução de IL-10, uma citocina antiinflamatória. Estas observações sugerem outro mecanismo de evasão da resposta imune, em que o *M. leprae*, pode subverter a imunidade natural para provocar uma resposta adaptativa que favorece a sobrevivência bacilar.

Mecanismos microbicidas relacionados ao *M. leprae*

Após essa etapa de fagocitose, o *M. leprae* é processado no citoplasma da célula. Estudos demonstraram que os pacientes de hanseníase apresentam vias fagocíticas diferenciadas. Os pacientes LL expressam mais genes relacionados à via de oxigênio reativo ou via do óxido nítrico, enquanto os pacientes TT induzem genes relacionados à via vitamina D dependente, que por sua vez, produzem peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina⁴⁹. No entanto, recentemente foi descrito que os pacientes de hanseníase como um todo, apresentavam produção diminuída de catelicidina em relação aos controles, o que poderia corresponder a um mecanismo de escape desta micobactéria ou estar relacionada à diminuição da exposição solar e hipovitaminose D⁵⁰. Além disso, vários estudos reportam polimorfismos

no receptor de vitamina D⁵¹⁻⁵⁴. Entretanto, alguns resultados conflitantes devem-se, provavelmente às diferenças nas metodologias empregadas, conforme ressaltado por Cardoso em recente revisão¹².

Sumarizando, percebe-se que seria vantajoso para o *M. leprae* ser reconhecido e fagocitado por macrófagos e células dendríticas, pois ele conseguiria escapar dos mecanismos microbicidas, por meios ainda não elucidados, e permanecer no meio intracelular longe das respostas imunes humorais.

Moléculas apresentadoras de antígenos do *M. leprae*

Quando o *M. leprae* não consegue se evadir da via fagocítica ele pode ser apresentado para os linfócitos T por dois mecanismos distintos. O primeiro seria através da apresentação clássica, via HLA (*Human Leukocyte Antigene*), onde esta molécula polimórfica seleciona e apresenta peptídeos antigênicos aos linfócitos T. Diversos autores descrevem peptídeos que são capazes de se ligar a fenda do HLA classe I (HLA-A, -B e -C) e/ou classe II (HLA-DR, -DP e DQ) e são apresentados por macrófagos ou células dendríticas aos linfócitos T, sendo potenciais candidatos para servir como ferramentas de diagnóstico imunológico⁵⁵⁻⁵⁸. Muitos desses peptídeos são capazes de induzir a produção de IFN- γ e ativar resposta celular, mas têm a desvantagem de apresentar reação cruzada com outras micobactérias ou de não conseguir induzir resposta celular em todas as formas clínicas da doença (geralmente induz em pacientes TT, mas não em LL)⁵⁹⁻⁶¹. Além disso, foi descrito aumento de expressão de HLA classe II DR em pacientes de hanseníase tratados com poliquimioterapia em relação aos pacientes não tratados⁶². Esses dados sugerem estimulação das células apresentadoras de antígenos com a liberação excessiva de antígenos de bacilos mortos durante a terapia ou supressão ativa do HLA pelo *M. leprae*.

O advento da Biologia Molecular possibilitou estudos relacionados aos polimorfismos genéticos das moléculas de HLA, onde tem sido demonstrada a importância do HLA-DR-DQ, cujos genes revelaram maior associação com a hanseníase no estudo de Genomewide Association (GWA)³⁸. O HLA-*DRB1**04 é descrito como gene protetor para a hanseníase⁶³⁻⁶⁶, enquanto o HLA-*DR2* e HLA-*DRB1**15 possuem forte associação com a susceptibilidade à doença *per se* ou a uma das formas clínicas, em diversas populações^{63,67-70}.

O segundo mecanismo de apresentação de *M. leprae* ao sistema imune do hospedeiro ocorre através das moléculas CD1, as quais apresentam antígenos com características glicolipídicas para ativar os linfócitos T. Componentes da parede micobacteriana como o ácido micólico e LAM são descritos como potenciais antígenos para essa via de

apresentação⁷¹⁻⁷³. Na hanseníase, pacientes TT apresentam maior expressão da molécula CD1 no local da lesão, em comparação aos pacientes LL^{74,75}. Sieling e colaboradores⁷⁶ cultivaram PBMC de pacientes junto aos antígenos lipídicos do *M. leprae* e *M. tuberculosis* e observaram que os pacientes LL não respondem a esse estímulo, enquanto os pacientes TT respondem somente aos antígenos lipídicos do *M. tuberculosis*.

Provavelmente, a ineficácia da apresentação dos antígenos do *M. leprae*, tanto pela via HLA quanto pela via CD1, resultaria no atraso da ativação da imunidade adaptativa e consequentemente na ativação dos macrófagos infectados acarretando dispersão bacilar nesses pacientes.

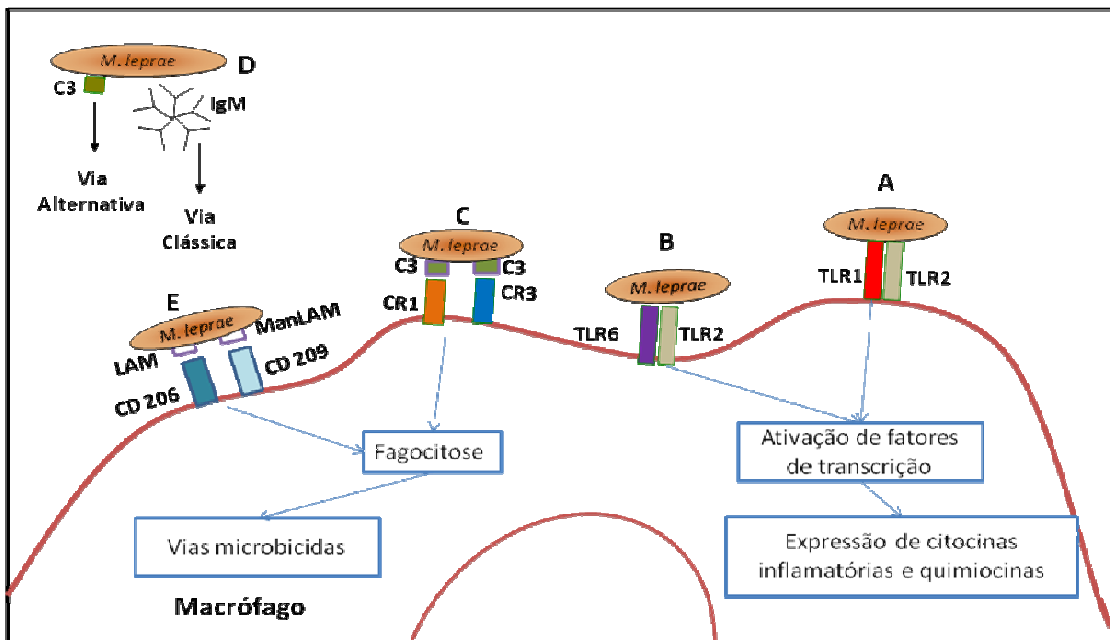


Figura 1 - Esquema representativo da resposta imune inata na hanseníase. **A)** Macrófagos são capazes de reconhecer *M. leprae* através dos TLR1 e TLR2 e como consequência produzem citocinas do padrão Th1. **B)** Os TLR2 e TLR6 também reconhecem o *M. leprae* estão envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, que por sua vez, induzem a síntese de eicosanoides **C)** A proteína C3 do complemento é capaz de se ligar ao *M. leprae* e em seguida ser reconhecida pelos receptores do complemento CR1 e CR3, induzindo a fagocitose. **D)** Além disso, a proteína C3 desencadeia a via alternativa do complemento. A via clássica é iniciada quando os anticorpos IgG ou IgM (IgM anti-PGLI, por exemplo) se ligam à superfície da micobactéria. **E)** Os receptores CD209 e CD206 são capazes de se ligar aos lipoglicanos ManLAM e LAM, respectivamente, presentes na parede do *M. leprae* e induzir a fagocitose a ativando as vias microbicidas de eliminação do patógeno.

Resposta imune adaptativa

Quando o patógeno consegue se evadir da resposta imune inata e permanecer no hospedeiro, o sistema imune lança mão da resposta adaptativa, que viria para reforçar, de modo mais específico, a batalha contra este patógeno. A hanseníase é uma das poucas doenças onde o mesmo patógeno, no caso o *M. leprae*, consegue estimular nos pacientes diferentes tipos de resposta adaptativa. Porém, ainda não se descobriu qual o determinante, seja ele de caráter genético e/ou imunomodulador, que discrimine qual via do sistema adaptativo o indivíduo infectado irá seguir.

Dicotomia Th1/Th2

A persistência do *M. leprae* no interior dos macrófagos estimula primeiramente uma resposta de contenção do bacilo no microambiente da infecção, que é caracterizada pela formação de células epitelioides, células gigantes e conseqüentemente, formação do granuloma, representando assim uma reação de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia, observada em paciente TT. Diferentemente, pacientes LL não conseguem gerar uma reação imune celular adequada para destruir o *M. leprae*, devido à anergia específica das células T, ou seja, os linfócitos T CD4⁺ nestes pacientes seriam irresponsivos para o *M. leprae*, fazendo com que o bacilo prolifere, conseqüentemente aumentando a carga bacilar⁷⁷.

Dessa maneira, o pólo tuberculoide é caracterizado pela forte resposta celular, com formação do granuloma. Estudos imunoistológicos revelaram que os linfócitos CD4⁺ estão em justaposição com macrófagos no centro do granuloma e os linfócitos CD8⁺ restritos à periferia. A proporção de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ encontrada nas lesões de pacientes TT é de 1,9/1⁷⁸. Em contraste, no pólo lepromatoso ocorre formação de infiltrado difuso, composto por histiócitos e macrófagos de aparência espumosa, também conhecida como células de Virchow⁷⁹⁻⁸⁰. Além disso, observa-se uma inversão desses subtipos celulares de linfócitos T, onde a presença dos linfócitos CD8⁺ é predominante, com proporção de CD4⁺/CD8⁺: 0,6/1 (Figura 2)⁸¹.

Essa diferença entre subtipos de linfócitos T é direcionada pelas citocinas produzidas no local da lesão. Estudos que avaliaram a expressão de citocinas na formas TT mostraram a predominância das citocinas IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ , caracterizando esse pólo com resposta celular do tipo Th1. Na forma LL observou-se a presença de resposta humoral, com produção de citocinas do padrão Th2, tais como, IL-4, IL-5 e IL-10 (Figura 2)^{82,83}.

Além disso, é observada a presença predominante de anticorpos em pacientes LL, caracterizando-os com uma resposta predominante humoral. TOUW e colaboradores⁸⁴,

demonstraram a presença de altos níveis de anticorpos IgM e IgG contra o bacilo íntegro em pacientes lepromatosos. Outros estudos identificaram um anticorpo IgM contra PGL-I, componente de parede celular do *M. leprae*, podendo ser encontrado em tecidos, no sangue e na urina de doentes multibacilares⁸⁵⁻⁸⁷.

Resposta T regulatória

Recentemente foi descrito um terceiro tipo de resposta adaptativa na hanseníase, gerada por linfócitos T reguladores ou Treg. Essas células constituem cerca de 5 a 10% das linfócitos CD4⁺ no sangue periférico, sendo caracterizada pela expressão de CD25^{alta} e pelo fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead box P3*) descritas tanto no sangue periférico como no local da lesão. No sangue periférico as células Treg encontram-se elevadas em pacientes TT e diminuídas em pacientes LL e em estado reacional ENL (Figura 2)⁸⁸. No tecido, a imunistoquímica revelou a presença de FoxP3 positivo em 95% dos casos de hanseníase estudados, sendo a sua distribuição não relacionada à área granulomatosa. Entre as formas clínicas da doença, não houve diferença estatística da presença de FoxP3, mas esta novamente encontra-se diminuída em pacientes em estado reacional ENL⁸⁹. Apesar da resposta Treg já ser descrita na literatura desde década de 90, somente agora ela começou a ser estudada na hanseníase e ainda faz-se necessário um aprofundamento neste aspecto para delinear o seu verdadeiro papel na patogênese da doença.

Considerações Finais

O *M. leprae* afeta milhares de pessoas no mundo, desde 4000 a.c. e apesar do longo tempo de sua existência, este micro-organismo não evoluiu. Entretanto, isso não comprometeu a sua persistência até os dias atuais, representando um grande problema de saúde pública ainda nos dias atuais. Não se sabe ao certo o que acontece nos primeiros momentos da infecção entre o sistema imune inato e esta micobactéria que culmine no estabelecimento da doença.

A imunidade inata esteve durante muito tempo em segundo plano nas discussões de mecanismos de infecção em diversas doenças. No entanto, observa-se que a resposta adaptativa clássica (Th1 e Th2) não consegue explicar diversos aspectos da clínica e epidemiologia de várias doenças. Na hanseníase, a dicotomia Th1 e Th2 descreve muitas características evidenciadas na doença crônica, porém os mecanismos iniciais da patogênese

dessa infecção ainda estão sendo elucidados. Novos alvos estão aparecendo com a valorização da resposta imune nos primeiros momentos da infecção, como exemplificados nesta revisão.

Quando em contato com um indivíduo susceptível (provavelmente por deficiências genéticas), esta micobactéria consegue burlar o sistema imune inato e estabelecer a infecção. Vários mecanismos de evasão descritos estão relacionados ao *M. leprae*, desde o fato dele ser um patógeno intracelular e escapar das diversas ações de reconhecimento e opsonização até o fato dele conseguir modular de forma negativa o sistema imune.

No entanto, mais estudos serão necessários para melhor compreensão da imunopatologia da hanseníase, com intuito de no futuro conseguir explicar as questões hoje não respondidas, assim como propor novos caminhos que auxiliem no diagnóstico (marcador sorológico da fase subclínica) e no tratamento dos pacientes.

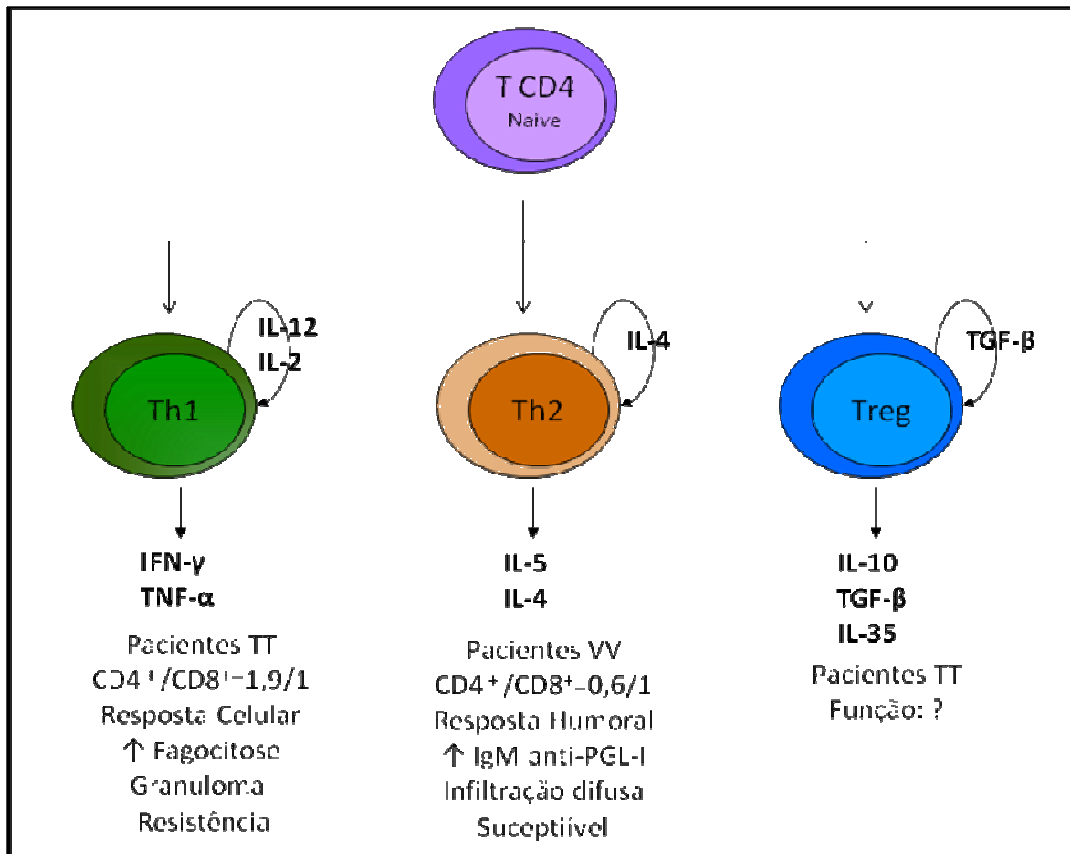


Figura 2: Esquema representativo da resposta imune adaptativa na hanseníase. Pacientes do pólo tuberculoide apresentam resposta protetora Th1, com formação de granuloma, assim como presença de Treg, sem discriminação da sua função. Pacientes do pólo lepromatoso apresentam resposta Th2, com produção de anticorpos IgM, aumento de linfócitos CD8⁺ e infiltração difusa no tecido.

Referências

1. Tan SY, Graham C, Armauer. Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy. Singapore Med J Singapore Med J 2008;49(7):520-1.
2. Irgens LM. The discovery of *Mycobacterium leprae*. A medical achievement in the light of evolving scientific methods. Am J Dermatopathol 1984;6(4):337-43.
3. Talhari S, Neves RO, Penna GO, Oliveira ML. Dermatologia Tropical: Hanseníase. 4ª ed. Manaus: Tropical; 2006. p.15-19.
4. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1966;34:255-73.
5. Venturini J, Soares CT, Belone Ade F, Barreto JA, Ura S, Lauris JR, et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. Lepr Rev 2011;82(1):25-35.
6. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001;409(6823):1007-11.
7. Eiglmeier K, Parkhill J, Honoré N, Garnier T, Tekaiia F, Telenti A, et al. The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev 2001;72(4):387-98.
8. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. Nat Genet 2009;41(12):1282-9.
9. Gulia A, Fried I, Massone C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. F1000 Med Rep 2010;2. pii: 30.
10. Machado, PRL. In: Dermatologia Tropical: Hanseníase. Sinésio Talhari; Renê Garrido Neves; Gérson Penna; Maria Leide de Oliveira. 4ª ed. Manaus: Tropical; 2006 p.111-120.
11. Diniz LM, Magalhães EF, Pereira FE, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Presence of intestinal helminths decreased T helper type 1 responses in tuberculoid leprosy patients and may increase the risk for multi-bacillary leprosy. Clin Exp Immunol 2010;161(1):142-50.
12. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. Future Microbiol 2011;6:533-49.
13. Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. PloS Negl Trop Dis 2011;5(3):e1013.
14. Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. Cell Immunol 2003;222(1):69-77.
15. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. Infect Immun 2002;70(9):5167-76.
16. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. Infect Immun 2010;78(1):293-300.
17. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity 2004;21(4):467-76
18. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD, et al. IL-17A produced by gamma delta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. J Immunol 2008;181(5):3456-63.
19. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. Immunity 2009;31(5):799-810.

20. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10(7):479-89.
21. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* 2003;9(5):525-32.
22. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 2005;11(6):653-60.
23. Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M. Identification of an immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 2005;73:2744–2750.
24. Shin DM, Yuk JM, Lee HM, Lee SH, Son JW. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell Microbiol* 2010;12(11):1648-65.
25. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defence mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285(5428):732-6.
26. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest* 1997;99(2):336-41.
27. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection: In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol* 1993;150(12):5501-10.
28. Malhotra D, Relhan V, Reddy BS, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet.* 2005;116(5):413-5..
29. Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunol* 2004;112(4):674-80.
30. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* 2008;197(2):253-61.
31. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2(5):e231.
32. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2010;87(3):371-84.
33. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* 1995;48(2):123-28.
34. Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(9):1055-65.
35. Carvalho NB, Oliveira FS, Durães FV, de Almeida LA, Flórido M, Prata LO, et al. Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to *Mycobacterium avium* infection but plays no role in induction of Th1 responses. *Infect Immun* 2011;79(4):1638-46.
36. von Meyenn F, Schaefer M, Weighardt H, Bauer S, Kirschning CJ, Wagner H, et al. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology* 2006;211(6-8):557-65.

37. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2005;202(12):1715-24.
38. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 2009;361(27):2609-18.
39. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis* 2010;201(9):1422-1435.
40. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, et al. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197(1):121-7.
41. Barreiro LB, Quach H, Krahenbuhl J, Khaliq S, Mohyuddin A, Mehdi SQ, et al. DC-SIGN interacts with *Mycobacterium leprae* but sequence variation in this lectin is not associated with leprosy in the Pakistani population. *Hum Immunol* 2006;67(1-2):102-7.
42. Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. *Infect Immun* 1993;61(10):4173-81.
43. Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, Brennan PJ, Orme IM. Structural basis for the capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1992;60(3):1249-53.
44. Tyagi P, Ramanathan VD, Girdhar BK, Katoch K, Bhatia AS, Sengupta U. Activation of complement by circulating immune complexes isolated from leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1990;58(1):31-8.
45. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J Clin Invest* 1990;85(4):1304-14.
46. Schlesinger LS; Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1031-8.
47. Gomes GI, Nahn EP Jr, Santos RK, Da Silva WD, Kipnis TL. The functional state of the complement system in leprosy. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78(4):605-10.
48. Callegaro-Filho D, Shrestha N, Burdick AE, Haslett PA. A potential role for complement in immune evasion by *Mycobacterium leprae*. *J Drugs Dermatol* 2010;9(11):1373-82.
49. Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* 2009;6(4):343-53.
50. Matzner M, Al Samie AR, Winkler HM, Nemeth J, Grasnek A, Indra A, et al. Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. *Acta Trop* 2011;117(1):56-9.
51. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 1999;179(1):187-91.
52. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71(3):330-40.
53. Goulart LR, Ferreira FR, Goulart IM: Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48(1):91-8.
54. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* 2010;71(10):992-8.

55. Dockrell HM, Brahmabhatt S, Robertson BD, Britton S, Fruth U, Gebre N, et al. Diagnostic assays for leprosy based on T-cell epitopes. *Lepr Rev* 2000;71 Suppl:S55-8.
56. Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MA, Williams DL, Martins MV, et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol* 2005;175(12):7930-8.
57. Geluk A, van der Ploeg J, Teles RO, Franken KL, Prins C, Drijfhout JW, et al. Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(3):522-33.
58. Geluk A, van den Eeden SJ, Dijkman K, Wilson L, Kim HJ, Franken KL, et al. ML1419c Peptide Immunization Induces *Mycobacterium leprae*-Specific HLA-A*0201-Restricted CTL In Vivo with Potential To Kill Live Mycobacteria. *J Immunol* 2011;187(3):1393-402.
59. Geluk A, Ottenhoff TH. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Hum Immunol* 2006;67(6):439-45.
60. Thole JE, Janson AA, Cornelisse Y, Schreuder GM, Wieles B, Naafs B, et al. HLA-class II-associated control of antigen recognition by T cells in leprosy: a prominent role for the 30/31-kDa antigens. *J Immunol* 1999;162(11):6912-8.
61. Goulart IM, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res.* 2008;300(6):269-90.
62. Abdel Latif AM, Essa EA. Study of HLA-DR expression on skin lesions of leprosy before and during multiple drug therapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2002;70(2):104-10.
63. da Silva SA, Mazini PS, Reis PG, Sell AM, Tsuneto LT, Peixoto PR, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis* 2009;9:134
64. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 2007;8(4):320-4.
65. Hsieh NK, Chu CC, Lee NS, Lee HL, Lin M. Association of HLA-DRB1*0405 with resistance to multibacillary leprosy in Taiwanese. *Hum Immunol* 2010;71(7):712-6.
66. Motta PM, Cech N, Fontan C, Giménez MF, Lodeiro N, Marinic K, et al. Role of HLA-DR and HLA-DQ alleles in multibacillary leprosy and paucibacillary leprosy in the province of Chaco (Argentina). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(10):627-31.
67. Visentainer JE, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzl-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 1997;30(1):51-9.
68. Hegazy AA, Abdel-Hamid IA, Ahmed el-SF, Hammad SM, Hawas SA. Leprosy in a high-prevalence Egyptian village: epidemiology and risk factors. *Int J Dermatol* 2002;41(10):681-6.
69. Joko S, Numaga J, Kawashima H, Namisato M, Maeda H. Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000;68(1):49-56.
70. Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens.* 1993;42(3):133-7.
71. Layre E, Collmann A, Bastian M, Mariotti S, Czaplicki J, Prandi J, et al. Mycolic acids constitute a scaffold for mycobacterial lipid antigens stimulating CD1-restricted T cells. *Chem Biol* 2009;16(1):82-92.
72. Miranda A, Amadeu TP, Schueler G, Alvarenga FB, Duppré N, Ferreira H, et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology* 2007;51(5):649-56.

73. Simões Quaresma JA, de Oliveira MF, Ribeiro Guimarães AC, de Brito EB, de Brito RB, Pagliari C, CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. *Am J Dermatopathol* 2009;31(6):527-31.
74. Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 2004;113(5):701-8.
75. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol* 1999;162(3):1851-8.
76. Sieling PA, Torrelles JB, Stenger S, Chung W, Burdick AE, Rea TH, et al. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J Immunol* 2005;174(5):2637-44.
77. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(4):365-75.
78. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(4):1213-7.
79. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2010;22(1):48-54.
80. Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1970;38(4):389-403.
81. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol* 1983;8(2):182-9.
82. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* 1998;37(10):733-40.
83. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol* 1990;137(4):749-53.
84. Touw J, Langendijk EM, Stoner GL, Belehu A. Humoral immunity in leprosy: immunoglobulin G and M antibody responses to *Mycobacterium leprae* in relation to various disease patterns. *Infect Immun* 1982;36(3):885-92.
85. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* 1981;147(3):728-35.
86. Agis F, Schlich P, Cartel JL, Guidi C, Bach MA. Use of anti-*M. leprae* phenolic glycolipid-I antibody detection for early diagnosis and prognosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1988;56(4):527-35.
87. Brett SJ, Draper P, Payne SN, Rees RJ. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1983;52(2):271-9.
88. Attia EA, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, El-Shennawy D, et al. Circulating CD4⁺ CD25 high FoxP3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol* 2010;49(10):1152-8.
89. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini AP, et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol* 2010;32(3):251-6.

ARTIGO ORIGINAL

Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy

Interleukin 17 in leprosy

Isabella da Motta-Passos¹, Adriana Malheiro^{1,2}, Felipe Gomes Naveca³, Luiz Fernando de Souza Passos¹, Cristina Ribeiro de Barros Cardoso⁴, Maria da Graça Souza Cunha⁵, Maísa Pôrto dos Santos¹, George Allan Villarouco Silva¹, Liziara Silva Fraporti¹, Lúcia de Paula^{1,6}

1 Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

2 Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas, Manaus, Brazil

3 Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia, Manaus, Brazil

4 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

5 Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus, Brazil

6 Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

Corresponding author: lpaula.bio@hotmail.com

Abstract

Interleukin-17A (IL-17A) is a proinflammatory cytokine that plays an important role in fighting pathogens at mucosal interfaces, by summoning neutrophils and upregulating cytoplasmic antimicrobial peptides. So far, the presence of IL-17A in leprosy has not been demonstrated. The expression of IL-17A and related cytokines (IL-6 and IL-23p19) has been addressed through RNA extraction and cDNA quantitative amplification in macerated biopsies of active lesions of 48 leprosy patients and 20 fragments of normal skin of individuals. Blood levels of IL-17A, IL-23p19 and IL-6 were determined by ELISA. We found an abrogated mRNA IL-17A response in all biopsies of leprosy patients, as compared with controls. Circulating IL-17A and IL-23p19 were undetectable in both patients and controls, but IL-6 was higher in lepromatous patients. Although in low levels, IL-17A mRNA in lepromatous patients had an inverse linear correlation with bacillary burden. Low expression of IL-17A in patients may be

a constitutive genetic feature of leprosy patients or a circumstantial event induced by the local presence of the pathogen, as an escape mechanism.

Key words: IL-17A mRNA, immunity, inflammatory cytokines, Leprosy, *Mycobacterium leprae*, skin.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. It affects the skin, mucosa and peripheral nerves and can cause irreversible impairment of nerve function and consequent physical deformities [1]. Disease control is a major challenge for public health agencies. In 1982 the World Health Organization (WHO) has standardized the treatment of leprosy with the use of three drugs – the so-called multidrug therapy [2] and, since then, the number of leprosy cases has declined significantly worldwide. However, it still remains highly prevalent in many countries, with around 250.000 new cases reported yearly, remaining a continuous public health concern [3].

The most probable route for *M. leprae* transmission is by aerosol spread of nasal secretions and uptake through nasal or respiratory mucosa [4, 5]. In 5% of infected people the bacilli can evade immune defense mechanisms and bring out the disease [6, 7]. As *M. leprae* has a very fastidious growth, the first symptoms will appear 2 to 5 years after exposure and the clinical manifestations will be associated with individual immune response to the pathogen [8]. Tuberculoid (TT) patients develop a predominantly cell-mediated immune response in skin and nerves, with activation of macrophages, neutrophils and dendritic cells, with granuloma formation, configuring a type 1 (Th1) T helper immune response. A vigorous Th1 response is able to control – but not extinguishes – bacilli growth, which results in fewer lesions, but is associated with nerve damage. On the other hand, in lepromatous (LL) patients the disease spreads diffusely throughout the body. LL patient's immune response is predominantly humoral, with the involvement of B lymphocytes with IgM release, outlining a Th2 response, besides the activation of CD8⁺ T cells. These patients have lesions in multiple organs – tegument, nerves, eyes, testis – with macrophages replenished with bacilli [9-12]. A role for regulatory T cell (Treg) response has been described, with 95% of leprosy patients presenting FoxP3-positive cells in skin lesions, while in peripheral blood Treg are frequently high in TT patients and decreased in LL patients with reactional condition such as erythema nodosum leprosum [13, 14]. Although ingenious, this Th1-Th2 schema fails to consider other features of the T helper response, including Th17 cells and, most of all, the innate immune system. It

fails also to explain what happens to exposed people who clears the infection and never develops disease.

IL-17A is a proinflammatory cytokine linked with T helper cells (Th17) [15], but later recognized as a pivotal component of the innate immune system, associated with macrophages, dendritic cells, $\gamma\delta$ T cells and epithelial Panneth cells [16, 17]. Once activated by microorganisms through toll-like receptors (TLRs) and other pathogen recognition receptors (PRRs), these cells produce IL-17A which intermediates the release of chemokine CXCL8 and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with subsequent recruitment of neutrophils, with the aim of phagocytosing extracellular elements [18, 19]. This is a very early event in the inflammatory process, most associated with innate rather than late adaptive immune system. These attributes qualify innate IL-17A to fight mucosal and intracellular pathogens, as have been reported with *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, where IL-17A produced at an early stage of infection induces protection and is required for production of Th1 responses and host resistance [20, 21]. In mice infected with *M. tuberculosis* and *M. bovis* IL-17A is required for maintenance of the inflammatory response, recruitment of neutrophils and other cells and also helps in the process of granuloma formation [22, 23].

The participation of Th17 response has never been addressed in leprosy patients. In this study, the production of IL-17A is reported for the first time in the peripheral blood and skin lesions of leprosy patients. Our results show that IL-17A and IL-23p19 were barely detected in peripheral blood in patients and controls and that IL-17A, IL-23p19 and IL-6 have low RNA expression in biopsy specimens of patients compared to controls, suggesting that constitutive low IL-17A profile could be a marker of susceptibility for *M. leprae*, or that *M. leprae* suppresses IL-17A as an escape mechanism.

Methods

Patients and Controls

Forty-eight untreated leprosy patients (13 females and 35 males; mean age 35.9 ± 14.7) were included in this study. They were selected from the out-patient clinic of Alfredo da Matta Foundation, a reference center for dermatology, in Manaus, Amazonas, Brazil. Leprosy patients were grouped according to the clinical classification of Ridley and Jopling [8], based on clinical features, bacteriological index (BI) and histopathologic criteria, with 7 tuberculoid (TT), 15 borderline tuberculoid (BT), 7 borderline-borderline (BB), 12 borderline lepromatous

(BL) and 7 lepromatous (LL) patients. Also patients were classified as multibacillary – MB – (with bacterial index, BI>0 and more than 5 lesions), a group that included patients with LL, BL and BB, or as paucibacillary – PB – (with BI of 0 and 5 or fewer lesions) including patients with BT and TT leprosy. Twenty healthy individuals (18 females and 2 males; mean age 36.1 ± 7.5), submitted to esthetic plastic surgery were included as control group.

Blood samples were collected by venous puncture; the serum was separated and stored at -70°C until required for ELISA. Punch-biopsies (4 mm) were taken from patients and controls and stored at -70°C for later RNA extraction.

The study was approved by the ethical committee of *Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta* and an oral explanation about the study was made and subsequently written informed consent was obtained from each participant included.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The levels of cytokines in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits for IL-6 (Kit BD OptEIA – BD Bioscience, San Diego, CA, USA), IL-17A ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) and IL-23p19 (eBioscience, San Diego, California) in accordance with the manufacturer's instructions.

RNA preparation

Total RNA was isolated from the skin biopsies using a commercially available kit (NucleoSpin® RNAII, Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA), after mechanical homogenization. Samples were treated with DNase for 15 minutes, RNA was eluted in 50 μl of RNase-free water and stored at -70°C until use. The purity of the RNA was controlled by absorbance at A260/280.

cDNA synthesis

For reverse transcription-PCR, RNAs were converted into cDNAs using 450 ng of total RNA, 0.5 μg of oligo d(T) 15 primers, 200 U of Moloney Murine Leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase, RT buffer as supplied, 20 U of RNasin and 10 mM of each dNTP (all from Promega, Madison, USA). This mixture was then incubated at 42°C for 60 min.

Real-time RT-PCR

Levels of IL-17A, IL-23p19 and IL-6 expression were measured by quantitative real-time PCR, performed on Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). The qPCR was run under the subsequent conditions: Taq polymerase activation 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing and extension at 60°C for 60 s. A melt

curve analysis was performed after all runs to ensure single and specific amplicons product formation. The sequences of the primers were designed based on nucleotide sequences in the GenBank database as follows: β -actin sense 5' TGA CTC AGG ATT TAA AAA CTG GAA 3', antisense 5' GCC ACA TTG TGA ACT TTG GG 3'; IL-17A sense 5' ACA CTC CCC AAA GCA GTT AG 3', antisense 5' AAT GAG GCT GTC TTT GAA GG 3'; IL-23p19 sense 5' CAG ATT TGA GAA GAA GGC AAA AA 3', antisense 5' GCA GCA ACA GCA GCA TTA CA 3'; IL-6 sense 5' CAA ATT CGG TAC ATC CTC GA 3', antisense 5' TGC TGC TTT CAC ACA TGT TAC T 3'; TGF- β sense 5' TCT GCT GAG GCT CAA GTT AAA 3', antisense 5' ATC GCC AGG AAT TGT TGC 3'. The relative gene expression value ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was normalized to the amount of β -actin in the same cDNA by the ΔCt method. The ΔCt value was determined by subtracting the average β -actin Ct value from the average Ct value of every target gene. All analyses were conducted in duplicates.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Kruskal–Wallis test and Dunn's post test were used for multigroup analysis. Pearson test was used for correlation analysis. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All calculations were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Cytokines analysis in serum

Since we know that cytokine profile may exert a prominent role in leprosy outcome, cytokine levels in peripheral blood from leprosy patients and control individuals (C) were measured by ELISA and the results were grouped according to Ridley and Jopling's classification and operational classification (Fig. 1).

Wide variation was observed in the plasma concentration of cytokines acting in Th1 and Th17 responses. IL-12p70 was detected in all patients and controls. Significant higher serum levels of this cytokine were found in BT and BL patients when comparing to controls (Fig. 1A). The same results were observed in PB and MB patients compared to controls (Fig. 1B). As expected, the mean of PB group (317.4) was higher than MB group (234.6). The serum levels of IFN- γ showed no significant difference between groups regardless the patients' or disease's classification (Fig. 1C and 1D). In Th17 analyses, the major cytokine IL-17A was undetectable in the serum of most patients and controls (Fig. 1E and 2F). IL-23p19 showed lower levels in tuberculoid group and controls compared to lepromatous patients, although no

statistically significance was observed (Fig. 1G and 1H). In contrast, IL-6 levels were higher in LL than in BT patients (Fig. 1I). When clinical forms were grouped these differences were not detected comparing MB, PB and controls although a clear tendency towards elevated IL-6 levels in MB patients was observed (Fig. 1F).

Within the five components of leprosy's spectrum, LL patients had significantly higher levels of IL-10 as compared to BT patients (Fig. 2A). The same was observed when LL patients were compared to controls (Fig. 2A). According to the polar distribution of the disease, PB and controls had significantly lower levels of IL-10 as compared to MB group (Fig. 2B).

Skin cytokine mRNA analyses

Expression of mRNA of IL-17A and related cytokines were lower in skin biopsies of 38 leprosy patients as compared to biopsies of 15 healthy controls (Fig. 3). These results were inversely correlated to bacteriological index (BI) in MB patients (Fig. 4).

The mRNA for cytokines IL-17A, IL-23p19 and IL-6 was detectable in all patients and controls, excepted in six patients in whom IL-6 was undetectable. Levels of IL-17A mRNA were significantly decreased in patients than in controls (Fig. 3A and 3B). In addition, expression of the Th17- maintenance and inducing cytokines IL-23p19 (Fig. 3C and 3D) and IL-6 (Fig. 3E and 3F) were also lower in patients as compared to controls. Comparison of gene expression between different clinical forms of leprosy and between leprosy poles revealed no statistically significant differences.

Correlation between cytokines expression and bacteriological index (BI)

The levels of mRNA of IL-17A, IL-23p19 and IL-6 were plotted against the bacteriological index (BI) in MB) patients. We found a negative linear correlation between BI of MB patients with IL-17A and IL-23p19 (Fig. 4A and 4B), but no correlation with IL-6 (Fig. 4C). Then, the results of lesion cytokines expression were, in general, inversely correlated to bacteriological index (BI) in MB patients.

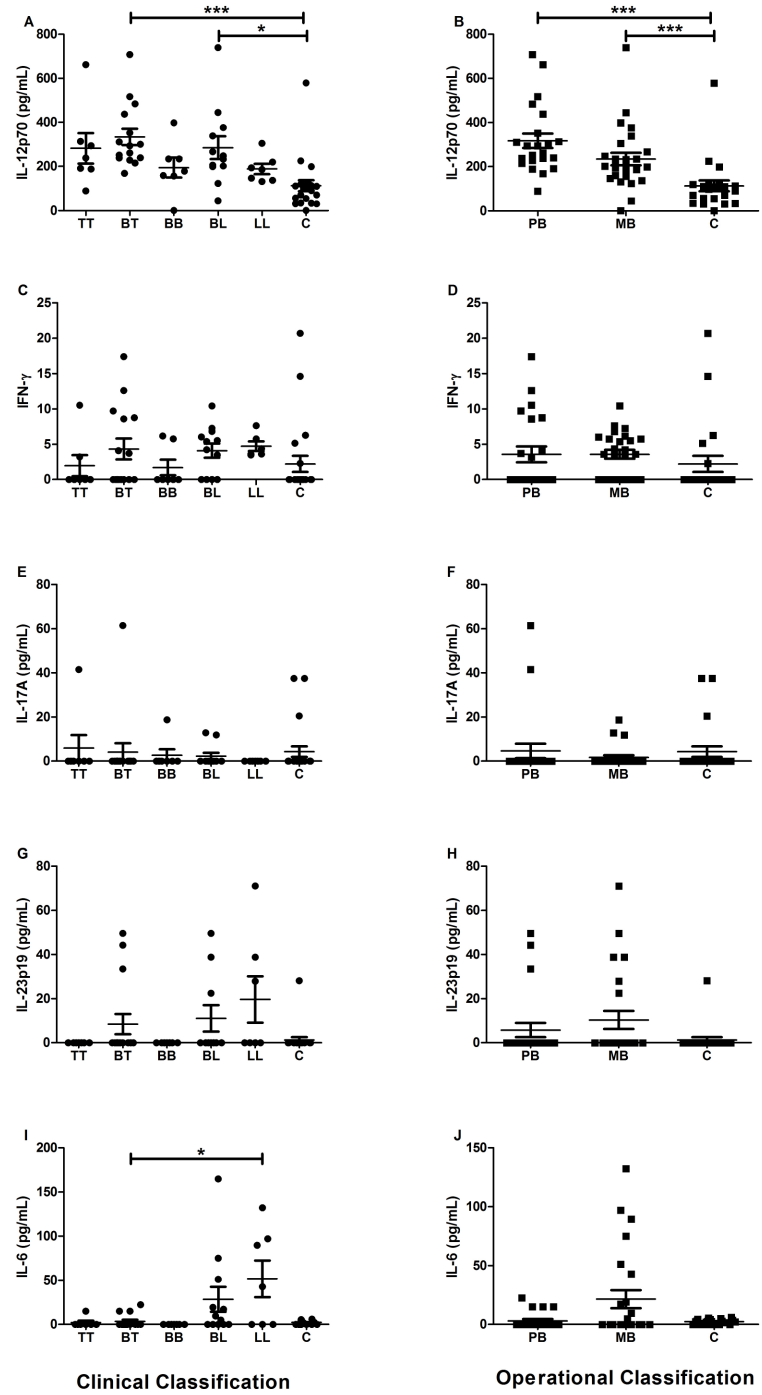


Figure 1: Th1 and Th17 cytokine levels in serum of leprosy patients and controls. Serum levels of inflammatory Th1 and Th17 cytokine in different clinical forms and operational classification of leprosy patients and controls: (A) and (B) interleukin-12p70, (C) and (D) Interferon (IFN- γ), (E) and (F) interleukin-17A, (G) and (H) interleukin-23p19, (I) and (J) interleukin-6. Cytokines were determined by ELISA, before patients began chemotherapy. The data show the mean \pm SEM. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05

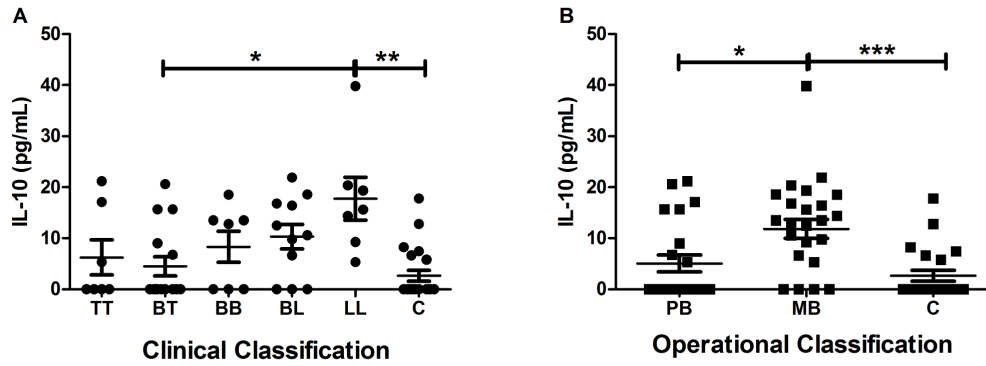


Figure 2: IL-10 production in serum of leprosy patients and controls. The regulatory cytokine IL-10 were measured in serum of in different clinical forms (A) and operational classification (B) of leprosy patients and controls. Cytokines were determined by ELISA, before patients began chemotherapy. The data show the mean \pm SEM. ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05

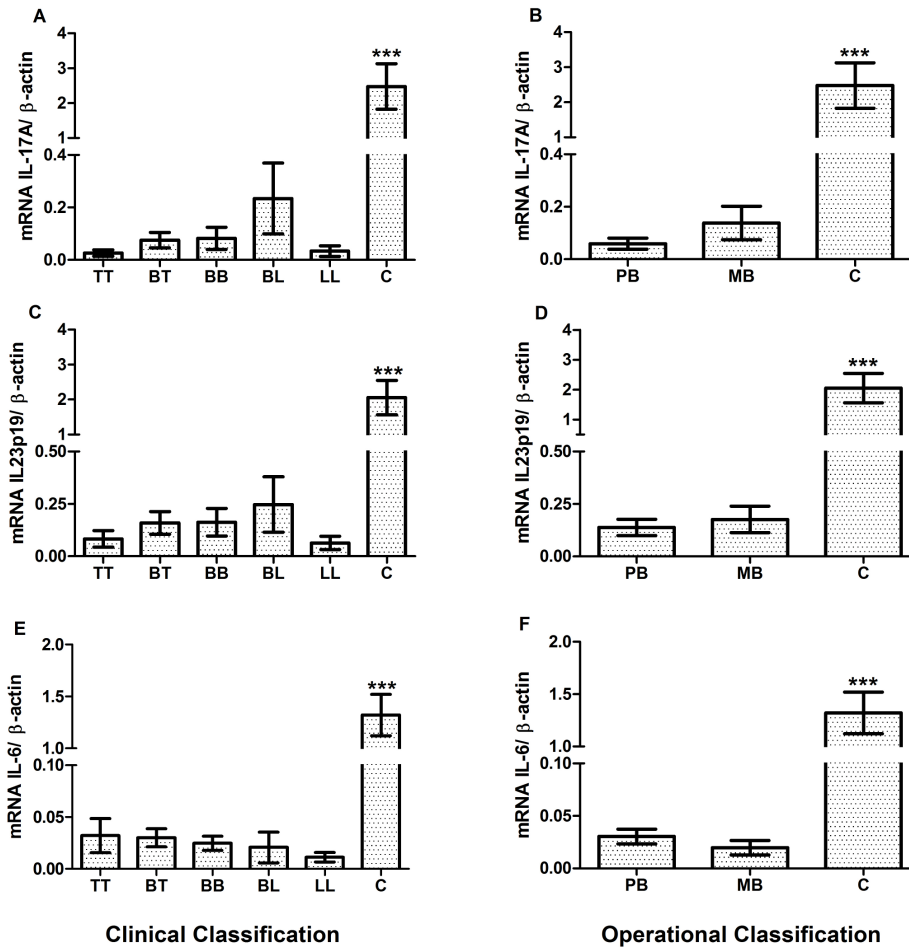


Figure 3: Quantitative messenger RNA expression (mRNA) in leprosy patients. Th17 related cytokines in different clinical forms and operational classification of leprosy patients and controls: (A) and (B) interleukin-17A; (C) and (D) IL-23p19; and (E) and (F) IL-6. Total RNA was extracted, and the levels of cytokine messages were measured quantitatively using a

real-time polymerase chain reaction SYBR-green system. The data (mean \pm SEM) are presented as the intensity of expression of the individual messenger RNAs, with normalization to β -actin, using the cycle threshold method. Controls were significantly different from patients in all analyses. ***P < 0.001

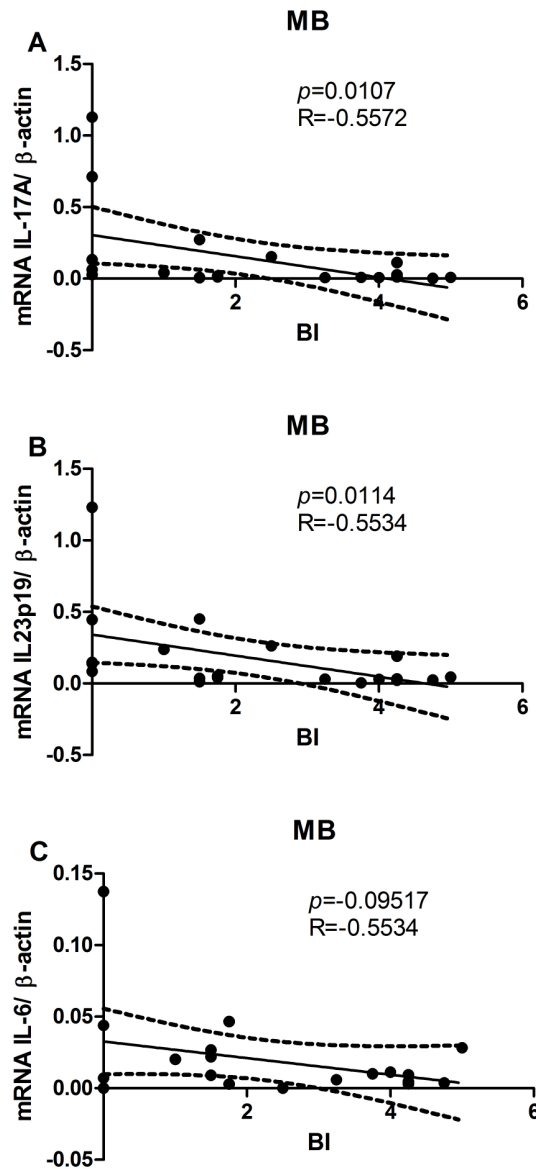


Figure 4: Correlation between mRNA of IL-17A, IL-23p19 and IL-6 and bacteriological index (BI) in MB patients. Correlation coefficient (r) was calculated by the Spearman's test. The mRNA level represents relative gene expression value ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) normalized to the amount of β -actin.

Discussion

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which can induce a spectrum of immune responses and clinical phenotypes. Leprosy develops in only 5% of exposed individual 2 to 5 years after the infection and is influenced by the genetic background of the host and environmental factors like nutritional status, socioeconomic conditions and exposure rates to *M. leprae* or other mycobacteria [24, 25]. Tuberculoid patients mount a robust Th1 response, with contention of bacterial burden through granuloma formation but with eventual neural damage. On the other hand, lepromatous patients, unable to refrain *M. leprae* replication, display foamy macrophages replenished with bacilli, summoning Th2 cytokines as a last device to fight disease [10, 26]. Other inflammatory cytokines such as IL-17A, IL-23p19 and IL-21, related to inflammation and pathogen surveillance, have not been studied in leprosy until now.

Herein, we demonstrate that the expression of IL-17A mRNA is strongly decreased in skin biopsies of leprosy patients, both tuberculoid and lepromatous, as compared to healthy volunteers submitted to plastic surgery. In addition, IL-23p19, a cytokine involved in the maintenance of IL-17A production, and IL-6 that is involved in IL-17A induction, were also weakly expressed in patients' biopsies, when compared to controls, suggesting that the lack of IL-6 and IL-23p19 may compromise the production of IL-17A [27, 28]. In the blood of patients and controls, IL-17A and IL-23p19 were barely detected, suggesting that the production and action of these cytokines are limited to tissues. However, IL-6 was increased in the serum of LL patients as compared to BT patients, suggesting systemic inflammation and macrophage activation [29, 30]. In addition, leprosy patients showed significantly higher serum levels of IL-12p70 compared with healthy controls, whereas the median of PB group was higher than MB group. Our results confirm that IL-12 is a predominant cytokine in TT leprosy, which is in agreement with the view that the TT pole is a Th1 response. We also detected significantly higher levels of IL-10 in LL patients, which is in concordance with reports pointing to the participation of IL-10 in the generation of T cell tolerance in this pole [31]. In addition, the elevated levels of this cytokine may be counteracting the effects of higher IL-6 in LL patients.

Initially, IL-17A was recognized as a T helper cytokine enhancing neutrophil chemotaxis through production of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and chemokines such as CXCL8 (IL-8), supporting an adaptive role against extracellular pathogens [19, 32]. However,

invading pathogens at mucosal surfaces must be attacked rather immediately, supposing an earlier intervention of the innate immune system. This was indeed demonstrated in epithelial tissues, including Panneth cells, and cells of the innate immune system, as reviewed by Khader (2010) [33] and Cua (2010) [16]. IL-17A has been also associated with killing of intracellular pathogens, through the production of microbicidal proteins, as β -defensins, S100 proteins and REG3 γ [34, 35]. This can be observed during *Listeria monocytogenes* infection, when the presence of IL-17A and IL-23p19 reduces bacterial burden in liver and contributes to granuloma formation [20]. In animal models of *Francisella tularensis* and *Chlamydia muridarum* infection, knocking out IL-17A increases disease susceptibility due to impaired generation of Th1 immunity [21, 36]. In *Mycobacterium bovis* infected mice, IL-17A and IL-23p19 mRNA was detected in the first day after infection and decreased in the seventh day [22]. In addition, knocking out IL-17A impaired IFN- γ production and granuloma formation, suggesting a link to Th1 response [22, 23]. Interestingly, the main source of IL-17A in these studies was $\gamma\delta$ T cells. Furthermore, when peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients infected with *M. tuberculosis* are stimulated with purified protein derivative (PPD), the IL-17A response is abrogated, as compared to healthy controls [37, 38]. Susceptibility to *M. avium-intracellulare* complex was also associated with low IL-17A responses [39].

Taken together, all these evidences of a major protective function of IL-17A against intracellular pathogens, and mycobacteria in particular, suggest a similar role in leprosy, and support our findings of low IL-17A mRNA expression throughout the clinical spectrum of leprosy patients. Hypothetically, people with a good IL-17A innate response would promptly eliminate bacilli still in the nasal mucosa. Otherwise, people with a genetically impaired IL-17A response would allow early bacilli proliferation [40] and blood dissemination to Schwann cells and peripheral macrophages, whereupon a Th1 response would be required. Another interpretation to our data points to a direct inhibition of dendritic cells by *M. leprae*, an escape mechanism that could downregulate innate responses such as IL-17A [41, 42]. Yet another explanation relates to the equilibrium of T helper responses in a full polarized scenario, either Th1 (tuberculoid) or Th2 (lepromatous), which favors appearance of regulatory T cells [43, 44], and the presence of IL-10 or IFN- γ would act to decrease the IL-17A production. Studying IL-17A mRNA level in lesion-free skin samples from leprosy patients, and *in vitro* tests of IL-17A generation in macrophages, dendritic cells or $\gamma\delta$ T cells of leprosy patients would help to distinguish a constitutive impairment of IL-17A production versus a local impairment induced by the circumstantial presence *M. leprae*. Furthermore,

besides mRNA expression, it would be informative to investigate the proteomics of IL-17A and allied cytokines at skin lesions. Worth noting, we observed a significant inverse correlation between bacterial burden and IL-17A levels in multibacillary patients – the higher the bacterial burden, the lower the IL-17A level. Both interpretations fit this finding: bacilli are high because IL-17A is constitutively low; or IL-17A is low because bacilli are circumstantially high.

However attractive the hypothesis of a constitutive impairment of IL-17A, neither *IL-17A* gene nor its locus at 6p12 appeared in early candidate gene studies, review by Cardoso [45], and in a Chinese genome-wide association study (GWAS) [46]. Notwithstanding, a number of genes with putative function in innate immune responses have been reported in these works, genome-wide and others. No matter what the primary polymorphism(s) should be, one could admit, but yet to prove, a final common pathway compromising IL-17A production within innate cells, allowing *M. leprae* proliferation whenever it reaches the nasal mucosa or elsewhere. Curiously, many of these genes are also incriminated in Crohn's disease, where impaired IL-17A production by gut epithelia could favor invasiveness of commensal microbiota, prompting chronic inflammation and continued inflammatory disease [47, 48].

Should these observations and inferences be further developed and confirmed the hypotheses mentioned above, they would allow important acquisitions for clinical medicine and public health, such as an *in vitro* assay for the generation of IL-17A after challenge with *M. leprae* antigens, as a tool to measure the risk of intradomiciliary exposed contacts, and the risk of people travelling to endemic areas.

In summary, we investigated for the first time IL-17A and IL-23p19 expression in skin lesions of leprosy patients. Our results showed that mRNA of IL-17A, IL-23p19 and IL-6 have low expression in the patients' skin biopsies compared to healthy controls, suggesting that these cytokines are not involved in the late stage of the immune response against *M. leprae*. In addition, we also observed significant inverse correlation between bacteriological index and IL-17A levels in multibacillary patients. Thus, patients with decreased IL-17 cannot contain bacilli growth and disease worsening in skin lesions.

Acknowledgments

We thank the staff of the *Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta*, especially Megumi Sadahiro for the encouragement, collaboration and research assistance. We thank Dra. Paula Rebello, Dra Silmara Pennini, Dra Rossilene Cruz and Dra Evenilda Oliveira for their assistance with patients recruitment, as well as Patrícia Amorim and Dr. José Maria Cabral for the healthy control skin biopsy collection. We also thank Marlice

Nunes and Cilene Costa for the attention with the patients. We thank Cleverson Matiulli and Kiyoshi Fukutani for the help in analysis of qPCR data.

Financial support: This work was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the State of Amazonas Research Foundation (FAPEAM), through DCR Program Motta-Passos I, Santos MP and Silva GAV received FAPEAM fellowships. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest: The authors have declared that no conflict of interests exists.

References

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, *et al.* The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol* 2006; 19(2): 338-81.
2. WHO, World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO, Geneva, Technical Report Series 1982; n.675.
3. WHO, World Health Organization. Leprosy update, 2011. *Weekly Epidemiological Record*, 2011; n.36, 86: 398-400.
4. Klatser PR, Van Beers S, Madjid B, Day B, De Wit My. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2947-51.
5. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(3): 518-21.
6. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; 363: 1209-19.
7. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(1): 48-54.
8. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; 34: 255-73.
9. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol* 1990; 137: 749-53.
10. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, *et al.* 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*. *Immunol* 1995; 86(1): 97-103.
11. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* 1998; 37(10): 733-40.
12. Jadhav R, Suneetha L, Kamble R, Shinde V, Devi K, *et al.* Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(3): e977.
13. Attia EA, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, *et al.* Circulating CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol* 2010; 49(10): 1152-8.
14. Massone C, Nunzi E, Ribeiro Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, *et al.* T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in Hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol* 2010; 32(3): 251-6.
15. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995; 155(12): 5483-6.
16. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7): 479-89.
17. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. Gamma delta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 2008; 20(3): 353-7.

18. Teixeira-Coelho M, Cruz A, Carmona J, Sousa C, Ramos-Pereira D. TLR2 deficiency by compromising p19 (IL-23) expression limits Th 17 cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunol* 2011; 23(2): 89-96.
19. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-76.
20. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, et al. IL-17A produced by gamma delta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J Immunol* 2008; 181(5): 3456-63.
21. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009; 31(5): 799-810.
22. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, et al. IL-17-Mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin infection. *J Immunol* 2007; 178: 3786-96.
23. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, et al. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 2010; 184(8): 4414-22.
24. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006; 77(3): 189-202.
25. Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JA, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(3): e1013.
26. Ochoa MT, Valderrama L, Ochoa A, Zea A, Escobar CE. Lepromatous and tuberculoid leprosy: clinical presentation and cytokine responses. *Int J Dermatol* 1996; 35(11): 786-90.
27. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8(9): 967-74.
28. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunol* 2007; 8: 369-77.
29. Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, et al. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev* 2007; 78(3): 223-30.
30. Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 75.
31. Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* 2000; 51(4): 419-28.
32. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunol* 2009; 126: 177-85.
33. Khader SA, Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence* 2010; 1(5): 423-7.
34. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, et al. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000; 1(2): 113-8.
35. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203(10): 2271-9.
36. Bai H, Cheng J, Gao X, Joyee AG, Fan Y, et al. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *J Immunol* 2009; 183(9): 5886-95.
37. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4⁺ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* 2008; 180(3): 1962-70.

38. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol* 2009; 39(3): 723-9.
39. Lim A, Allison C, Price P, Waterer G. Susceptibility to pulmonary disease due to *Mycobacterium avium*-intracellulare complex may reflect low IL-17 and high IL-10 responses rather than Th1 deficiency. *Clin Immunol* 2010; 137(2): 296-302.
40. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol* 2010; 30(4): 539-45.
41. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol* 2007; 178(1): 338-44.
42. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun* 2010; 78(1): 293-300.
43. Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Suppression of interleukin-17 by type I interferons: a contributing factor in virus-induced immunosuppression? *Eur Cytokine Netw* 2009; 20(1): 1-6.
44. Lim A, Allison C, Price P, Waterer G. Susceptibility to pulmonary disease due to *Mycobacterium avium*-intracellulare complex may reflect low IL-17 and high IL-10 responses rather than Th1 deficiency. *Clin Immunol* 2010; 137(2): 296-302.
45. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 2011; 6: 533-49.
46. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, *et al.* Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 2009; 361(27): 2609-18.
47. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, *et al.* Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterol* 2003; 125(1): 47-57.
48. Schurr E, Gros P. A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease? *N Engl J Med* 2009; 361(27): 2666-8.

ANEXOS

Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta para realização do “Projeto DCR”.



Governo do Estado do Amazonas
Secretaria de Estado da Saúde
FUNDAÇÃO “ALFREDO DA MATTA”
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO Nº 019/2008

I. IDENTIFICAÇÃO

Protocolo CEP-FUAM: FR – 198924 Nº CAAE-0009.0.266.000-08
Título do Projeto: “Avaliação do perfil imunológico e de polimorfismos genéticos em pacientes portadores de hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta”
Pesquisadora Responsável: Lúcia de Paula
Local de Origem (instituição vinculada): Fundação Alfredo da Matta
Local de Realização (instituição sediadora): Fundação Alfredo da Matta
Data de Apresentação ao CEP-FUAM: 12/06/2008 Data da Reunião: 04/07/2008
Grupo/Área Temática: Grupo II Área do Conhecimento: Medicina

II. OBJETIVOS DO PROJETO

Objetivo geral:

Avaliar o perfil de resposta imune e polimorfismos nos genes IL12B, IL12RB1 e IL23 em amostras de pacientes com hanseníase, atendidos na Fundação Alfredo da Matta em associação ao quadro clínico durante o tratamento quimioterápico.

Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil de resposta imune (RI) celular circulante através de marcadores de superfície por citometria de fluxo;
2. Analisar a produção de citocinas em biópsia de lesão através de PCR;
3. Analisar a produção de citocinas no soro através de ELISA;
4. Analisar polimorfismos para IL12B, IL12RB1, IFN-g e IL23R nos leucócitos através de PCR;
5. Correlacionar os resultados do projeto com os dados clínicos dos pacientes

III. RESUMO DO PROJETO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* com amplo espectro clínico e histopatológico, afetando predominantemente pele, mucosas e nervos periféricos. A doença apresenta grande diversidade de formas clínicas relacionadas com padrões imunológicos distintos. A resposta imune Th1 tem um papel fundamental na hanseníase, uma vez que protege o indivíduo limitando a disseminação do bacilo. Contudo, há diversos aspectos a serem esclarecidos, tais como a resposta imune exacerbada, na qual está diretamente envolvida na patologia do nervo e pele. Contudo, o padrão de resposta imune Th2 também pode ser observado, sendo que os indivíduos acometidos exibem altos títulos de anticorpos contra antígenos de *M. leprae*, sem conferir proteção significativa, pois há disseminação bacilar. O perfil de resposta imune Th1 e Th2 tem sido amplamente estudado em diversas doenças, e recentemente outro perfil de resposta imune o Th17, envolvido principalmente nas respostas inflamatórias, tem sido descrito em doenças auto-imunes e em doenças infecciosas por *Klebsiella* e *Candida*, contudo na hanseníase o estudo da importância da resposta Th17 ainda não tem sido relatado. Neste sentido, o projeto visa avaliar o perfil imunológico e genético dos pacientes com hanseníase caracterizando: os fenótipos celulares, o papel das citocinas envolvidas na resposta Th1, Th2 e Th17, bem como, o polimorfismo de genes relacionados à resposta imune que podem estar associados à suscetibilidade a doença. A realização deste projeto, certamente, fornecerá a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na imunopatogenia da hanseníase.

IV. ANÁLISE DOS ELEMENTOS METODOLÓGICOS

Av Codajás, nº. 24 - Cochoeirinha Cep.: 69065-130 - Fone: 3663-4747/Fax: 3663-3155
E-Mail: cep@fuam.am.gov.br



Governo do Estado do Amazonas
Secretaria de Estado da Saúde
FUNDAÇÃO "ALFREDO DA MATTA"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



(Resolução CNS 196/96 e complementares)

Estrutura do protocolo: Adequado.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado.

Retorno de benefícios para o sujeito e / ou comunidade: Adequado.

Informação adequada quanto ao financiamento: Adequado.

Orçamento: Valor total do projeto: R\$ 170.025,60

Cronograma de execução: Adequado.

Recursos humanos envolvidos e orçamento: Adequados.

**V. COMENTÁRIOS DO RELATOR REFERENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E
COMPLEMENTARES:**

O presente protocolo de pesquisa apresenta clareza e objetividade, os quais atende as normas constantes na Resolução CNS 196/96.

VI. Parecer

Aprovado.

Manaus, 02 de outubro de 2008.


ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ
Coordenadora do CEP

Anexo II – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta para realização do projeto de dissertação.



**FUNDAÇÃO
ALFREDO DA MATTA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



PARECER CONSUBSTANCIADO Nº. 011/2009

Registro no CEP: 005/2009

FR: 256275

CAAE: 0005.0.266.115-09

1 IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: “Avaliação da Resposta Th17 em pacientes portadores de Hanseníase”

Pesquisador Responsável: Isabella da Motta Passos

Instituição onde será realizada a pesquisa: Fundação Alfredo da Matta

GRUPO: III

Data de Apresentação ao CEP: 16.04.2009

Data da Reunião: 24.09.2009

2 OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar a resposta Th17 em amostras de pacientes com Hanseníase atendida na Fundação Alfredo da Matta em associação ao seu quadro clínico

Específicos:

- Avaliar a produção de citocinas Th17 no soro através de ELISA;
- Avaliar a expressão de RNAm para as citocinas Th17 em biópsias de lesão através de PCR;
- Avaliar a produção de citocinas Th17 no interior das células de biópsias de lesão através da imunohistoquímica;
- Correlacionar os resultados do projeto com os dados clínicos dos pacientes

3 SUMÁRIO:

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente as pele e os nervos. A linhagem de células T helper 17 é caracterizada pela produção de interleucina 17 (IL – 17). Com intuito de investigar o padrão de resposta Th17 em pacientes com hanseníase será realizada coleta de sangue periférico para avaliação da produção de citocinas TGF-, IL-6, IL-17 e IL-23 no soro pela técnica de ELISA. Também será avaliada a expressão dos genes para IFN-, TNF-, IL-4, IL-17 e IL-23 em biópsias de lesão pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e será avaliada a produção de citocinas intracelulares em biópsias de lesão através de imunohistoquímico para IL-17, TGF-, IL-6 e IL-23 através de anticorpos monoclonais direcionados contra estas citocinas. O estudo tem como objetivo identificar se os pacientes com hanseníase apresentam a resposta Th17 e, em caso positivo, comparar esses padrões entre os pacientes dos pólos Tuberculoide e Lepromatoso.

4 COMENTÁRIOS DO RELATOR REFERENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES.

4.1 Estrutura do protocolo

Tipo de estudo: estudo prospectivo observacional, de casos e controle, de corte transversal, com componente analítico.

Tamanho da amostra:

Grupo de 20 pacientes, incluindo 5 pacientes TT, 5 pacientes BT, 5 pacientes BL e 5 pacientes LL

Grupo Controle: constituído de pessoas sadias, sem evidências clínicas atuais ou pretéritas de sinais ou sintomas de hanseníase, sem relação de parentesco entre si e sem relação com pacientes de hanseníase

Coleta de Amostras:

- serão coletados 10 ml de sangue periférico em tubo sem anticoagulante dos pacientes com confirmação ou suspeitos de caso de Hanseníase.
- As amostras de biopsia – coleta de lesão dois local por paciente.

Avaliação de citocinas intracelulares na lesão: serão analisadas amostras 5 pacientes TT, 5 pacientes BT, 5 pacientes BL e 5 pacientes LL

4.2 Retorno de benefícios para o sujeito e / ou comunidade:

O presente estudo poderá trazer informações adicionais sobre o comportamento imunológico na hanseníase.

4.3 Informação adequada quanto ao financiamento: Informado. Projeto de Desenvolvimento Científico Regional sob a responsabilidade da Dra. Lúcia de Paula

4.4 Lista de centros (para estudos multicêntrico) – Fundação Alfredo da Matta/ HEMOAM/ Universidade Federal do Amazonas - UFAM

4.5 Cronograma de execução : Adequar

4.6 Recursos humanos envolvidos e orçamento: Informado

5 PARECER DO CEP: APROVADO

Manaus, 28 de setembro de 2009


ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ

CORRDENADORA CEP-FUAM

Anexo III – Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) destinado aos pacientes com hanseníase.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação da resposta imunológica em pacientes com hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra a hanseníase durante o tratamento com medicamentos e quando desenvolve reação da doença.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 10 mL de sangue e biópsia da lesão (quando presente). Serão feitos testes para verificar a presença da bactéria, a confirmação do diagnóstico da infecção e como o organismo está respondendo contra a bactéria. Alguns destes testes serão realizados na Fundação Alfredo da Matta e outros na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha e a biópsia, sendo que esta última já seria realizada como rotina.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento da hanseníase, podendo auxiliar futuramente no tratamento da doença.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à hanseníase, podendo entrar em contato com as doutoras Maria da Graça Souza Cunha e Lúcia de Paula (Fundação Alfredo da Matta :Tel: 92-9985-5161/ 92-8831-9301). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica da Fundação Alfredo da Matta.

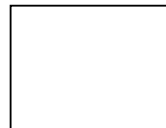
VOLUNTARIEDADE: A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento na Fundação Alfredo da Matta.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico e biópsia da lesão) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores. Neste caso, estão previstos estudos para avaliação de como o corpo se defende nos casos em que existe mais de um tipo de doença envolvida e deverá ser submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos com um projeto específico.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.



Manaus, ___/___/____

(Impressão dactiloscópica)

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura do pesquisador

Nome do pesquisador

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ___/___/____ pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente

Assinatura da Testemunha

Nome da testemunha

Importante: Deverá ser feito em duas (02) vias, ficando uma com o sujeito da pesquisa.

Anexo IV - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) destinado aos indivíduos do grupo controle da pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO CONTROLES

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação da resposta imunológica em pacientes com hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra a hanseníase.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 10 mL de sangue e será realizada uma biópsia da pele. Serão feitos testes para verificar como o organismo encontra-se quando não há doença estabelecida. Alguns destes testes serão realizados na Fundação Alfredo da Matta e outros na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha para coleta de sangue e para a anestesia da biópsia.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento da hanseníase, podendo auxiliar futuramente no tratamento da doença.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à hanseníase, podendo entrar em contato com as doutoras Maria da Graça Souza Cunha e Lúcia de Paula (Fundação Alfredo da Matta :Tel: 92-9985-5161/ 92-8831-9301). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica da Fundação Alfredo da Matta.

VOLUNTARIEDADE: A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe qualquer atividade de sua rotina.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico e biópsia da lesão) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores. Neste caso, estão previstos estudos para avaliação de como o corpo se defende nos casos em que existe mais de um tipo de doença envolvida e deverá ser submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos com um projeto específico.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.



Manaus, ___/___/_____

(Impressão dactiloscópica)

Assinatura do controle

Nome do controle

Assinatura do pesquisador

Nome do pesquisador

Este formulário foi lido para _____ (nome do controle) em ___/___/_____ pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da Testemunha

Nome da testemunha

Importante: Deverá ser feito em duas (02) vias, ficando uma com o sujeito da pesquisa.