

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

MAYARA ABUD MENDES

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA PELA
TALIDOMIDA EM BIÓPSIAS DE LESÕES DE PELE DE PACIENTES COM ERITEMA
NODOSO HANSÊNICO**

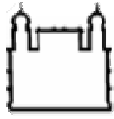
Orientadora:

Dra. Euzenir Nunes Sarno

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ

Rio de Janeiro

Março / 2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

MAYARA ABUD MENDES

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA PELA
TALIDOMIDA EM BIÓPSIAS DE LESÕES DE PELE DE PACIENTES COM ERITEMA
NODOSO HANSÊNICO**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária.

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

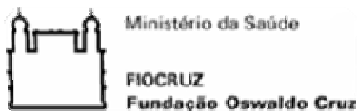
M538 Mendes, Mayara Abud

Avaliação da modulação da expressão gênica e proteica pela talidomida em biópsias de lesões de pele de pacientes com eritema nodoso hansênico / Mayara Abud Mendes. – Rio de Janeiro, 2015. xix, 98 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 79-98

1. Hanseníase. 2. Eritema nodoso hansênico. 3. Talidomida. 4. Microarranjo. I. Título.

CDD 616.998



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

MAYARA ABUD MENDES

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA PELA
TALIDOMIDA EM BIÓPSIAS DE LESÕES DE PELE DE PACIENTES COM ERITEMA
NODOSO HANSÊNICO**

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

Aprovada em: __ / 03 /2015.

BANCA EXAMINADORA:

Membros Efetivos:

Dra. Verônica Schmitz Pereira – Instituto Oswaldo Cruz – RJ (Presidente da Banca e Revisora)

Dra. Constança Britto – Instituto Oswaldo Cruz – RJ

Dra. Sandra Durães – Universidade Federal Fluminense – RJ

Membros Suplentes:

Prof. Dra. Anna Maria Salles – Instituto Oswaldo Cruz – RJ

Prof. Dra. Danuza Esquenazi – Instituto Oswaldo Cruz – RJ

Rio de Janeiro, Março de 2015.

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

Ao meu avô Raphael (in memoriam), como gratidão por cada um dos muitos momentos maravilhosos, dos quais tive o prazer de vivenciar ao seu lado.

Agradecimentos

À Deus, por mais essa bênção e pela alegria de viver em Tua presença.

À Doutora Euzenir Sarno, minha querida orientadora, por proporcionar-me muito mais do que conhecimento científico e acadêmico ao longo desses 2 anos de mestrado. Obrigada por todo auxílio e incentivo para que esse trabalho se tornasse realidade. Meu apreço e admiração pela sua dedicação e genialidade.

Aos co-orientadores Dr. Daniel Serra e Dra. Elizabeth Sampaio, por todo suporte teórico durante as nossas reuniões científicas e por me fazerem pensar ciência de forma mais dinâmica.

As queridas colaboradoras: Dra. Roberta Olmo, Dra. Thaís Amadeu, Dra. Priscila Andrade, Helen Ferreira e Andreia Moraes pelas horas de trabalho dedicadas ao progresso desta dissertação. Obrigada pela gentileza, generosidade e respeito que sempre tiveram por mim e por esse trabalho.

As técnicas Andressa Gomes e Eliana Barbosa, por todo suporte laboratorial e psicológico também. Vocês foram incríveis comigo!

A toda querida equipe do laboratório de Hanseníase, pelo convívio engrandecedor, afeto, aprendizado e suporte em cada uma das muitas vezes as quais precisei de algum auxílio: Andrea de Souza, Dra. Ariane Leite, Augusto Silva, Dra. Alice Miranda, Adelaide Amorim, Bernardo Pascarelli, Bruno Jorge, Cristiane Domingues, Cristiane Barboza, Daniel Chaves, Dra. Danuza Esquenazi, Edson Araripe, Eduardo Freire, Iana Pessoa, Jean Pierre, Jéssica Duarte, Jéssica Paixão, Jorgenilce Salles, Luciana Nahar, Mariana Martins, Mayara Barbosa, Michele Muzy, Dra. Patricia Pignataro, Pedro Henrique Lopes, Dr. Rafael Petito, Rhana Prata, Samuel Barauna, Simone Campos, Dr. Sergio Antunes, Tamiris Lameira, Vania Valentim. Aprendi muito, direta ou indiretamente, com cada um de vocês!!!

Ao Dr. José Augusto e toda equipe do Ambulatório Souza Araújo – ASA; além do Laboratório de Hanseníase sob orientação do Doutor Milton Ozório, sempre muito receptivos, solícitos e animados.

Ao meu grande amigo, Thiago Pinto, pelo suporte incondicional e ensinamentos compartilhados durante esses 2 anos. Que presente especial a nossa amizade!

A minha querida mãe por ser o meu pilar mais forte, e pela felicidade e emoção com a qual sempre celebra a minha vitória como se fosse a sua. Paizinho, Nevasca, Léo, família, muito obrigada por se referirem a mim sempre com muito carinho e orgulho, mesmo sem compreender 100% o que eu faço até hoje. Seus lindos!

A todos os meus fiéis amigos pela torcida incondicional, incentivo ímpar e por se fazerem presentes neste período, mesmo quando não era possível estarmos juntos fisicamente.

Aos membros da banca, pela gentileza e carinho com a qual aceitaram prontamente o convite para avaliar nosso trabalho: Dra. Verônica Schmitz, Dra. Constança Britto, Dra. Sandra Durães, Dra. Anna Maria Salles e Dra. Danuza Esquenazi.

Aos docentes e toda equipe do Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária pela generosidade em partilhar seus conhecimentos, e aos meus queridíssimos amigos da turma de mestrado BP 2013 (agora mestres também!). Nós conseguimos!!!!!!

E por fim e não menos importante, as agências de fomento pelo suporte financeiro e a cada um dos pacientes que compuseram nosso grupo de estudo, permitindo com que o mesmo pudesse ser realizado.

Muitíssimo obrigada a todos vocês! ♥

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xi
Lista de figuras	xvi
Lista de tabelas	xviii
Resumo	xix
Abstract	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Hanseníase	1
1.1.1 – Aspectos históricos.....	1
1.1.2 – Epidemiologia	3
1.1.3 – Agente etiológico	7
1.1.4 – Transmissão	9
1.1.5 – Diagnóstico.....	11
1.1.6 – Classificação	13
1.1.7 – Tratamento.....	17
1.1.8 – Medidas preventivas.....	19
1.1.9 – Episódios reacionais	20
1.1.9.1 – A reação do tipo 2 - Eritema Nodoso Hansênico.....	23
1.10 – Talidomida.....	26
1.1.10.1 – Mecanismos de ação da Talidomida	28
1.1.10.2 – A Talidomida e o Eritema Nodoso Hansênico.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	36

3.1 – Objetivo geral	36
3.2 – Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1– Infraestrutura física / Tecnologia	37
4.2 – Biossegurança e permissão ética	37
4.3 – População estudada	37
4.4 – Obtenção e processamento das amostras biológicas	38
4.5 – Expressão gênica global	38
4.6 – Análise dos dados do microarranjo	39
4.7 – Análise de vias de sinalização e enriquecimento dos dados do microarranjo	40
4.8 – Seleção dos genes utilizados no estudo	42
4.9 – Extração de RNA total	44
4.9.1 – Quantificação e pureza do RNA	44
4.9.2 – Análise da integridade do RNA.....	45
4.10 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	45
4.10.1 – Síntese de cDNA	45
4.10.2 – RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR)	46
4.10.3 – Análise dos dados obtidos a partir de RT-PCR em tempo real	46
4.11 – Extração de proteínas pelo método de TRIzol [®]	47
4.11.1 – Quantificação de proteínas.....	47
4.12 – <i>Western Blotting</i> - corrida, transferências e incubações.....	47
4.13 – Imunohistoquímica	49
4.14 – Análises estatísticas	51

5. RESULTADOS	52
5.1 – Análise de vias de sinalização e enriquecimento dos dados do microarranjo.....	52
5.2 – Seleção dos genes utilizados no estudo	54
5.3– Talidomida reduz alterações na histopatologia do ENH após 7 dias de tratamento	56
5.4 –Validação por RT - PCR de genes modulados negativamente, selecionados a partir do microarranjo, após 7 dias de tratamento com Talidomida	58
5.5 – Talidomida modula a expressão proteica de moléculas expressas nas lesões de ENH após 7 dias de tratamento	60
5.6 – Talidomida promove a redução de moléculas envolvidas na imunopatogênese do ENH após 7 dias	62
5.7– O uso de Talidomida reduz a expressão de TNC após 7 dias de tratamento.....	64
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

(A)	Razão da absorbância
ADAM 12	Desintegrina e metaloproteinase de domínio 12
AEC	3-amino-9-etilcarbazol
Ag	Antígeno
ASA	Ambulatório Souza Araújo
ANOVA	Análise de variância
AQP9	Aquaporina – 9
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	“Borderline borderline”
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCL2	Célula B de linfoma 2/ proteína oncogênica
BIRC3	Repetição IAP de baculovírus contendo a proteína 3
BL	“Borderline” lepromatoso
BSA	Albumina sérica bovina
BT	“Borderline” tuberculóide
CASP1	Caspase 1
CYR61	Proteína rica em cisteína 61
CCR2	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 2
Cdna	Ácido nucleico complementar
CD-	Grupamento de modificação
CLEC5A	Domínio do tipo Lectina-C membro A da superfamília 5
COL12A1	Colágeno tipo 12 - alfa 1
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
C _T	Limiar do ciclo
CYR61	Indutor angiogênico rico em cisteína – 61
DAVID	Banco de dados para anotação, visualização e descoberta integrada
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxiribonuclease
DECH	Doença enxerto contra hospedeiro
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENH	Eritema nodoso hansênico
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
FCGR-	Receptor de porção Fc da imunoglobulina G
FDA	Food and Drug Administration
FERMT2	Família fermitina membro 2
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
G	Força-G
GALNT2	Polipeptídeo N- acetilgalactosaminiltransferase – 2
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GO	Ontologia gênica
GBP5	Proteína ligadora de guanilato – 5
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
IL-	Interleucina
ITGB1	Integrina beta – 1
JAK3	Janus quinase – 3
KEGG	Enciclopédia de genes e genoma de Kioto
LAMB1	Laminina subunidade beta – 1
LILRB2	Receptores de leucócitos tipo imunoglobulina, sub família B, membro 2
LL	Lepromatoso lepromatoso
Log	Logaritmo
LPS	Lipopolissacarídeo
MAMPS	Padrão molecular associado a micróbios
MB	Multibacilar
MEC	Matriz extracelular

ML-Flow	Sorologia rápida para hanseníase
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação
MMP1	Metaloproteinase de matriz 1
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico
Mrna	Ácido ribonucléico mensageiro
MS	Ministério da Saúde
MWCO	Peso molecular de corte
NALP1	Proteína rica em repetições de leucina – 1
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NLRP3	Receptores do tipo NOD contendo domínio pirina
NIH	National Institutes of Health
NRP1	Neuropilina – 1
Oligo-dT	Oligonucleotídeo iniciador de timidinas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PCDH17	Protocaderina – 17
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-I	Glicolípido fenólico I
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Prevenção de incapacidades
PLSCR1	Fosfolípido scramblase 1
PLXNC1	Plexina C – 1
PMN	Polimorfonuclear
PNL	Forma neural pura
PNPDS	Programa Nacional de Pós Doutorado em Saúde
PQT	Poliquimioterapia
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PTPRC	Proteína tirosina fosfatase receptor do tipo C
PTX3	Pentraxina 3
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo (em tempo real)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RLEP	Elemento repetitivo de <i>M. leprae</i>
RGS1	Regulador 1 de sinalização da proteína g
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RR	Reação reversa
RSAD2	Radical s adenosil metionina – 2
RT	Transcrição reversa
S100A7	Proteína ligadora de cálcio (psoriasina)
SERPINE1	Serpin inibidor de peptidase – 1
SSA1	Soro amilóide 1
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLC11A1	Proteína Carreadora de Solutos da família 11, membro 1
SOCS3	Supressor de sinalização de citocina 3
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS/T	Tampão salino de Tris com Tween 10
TCR	Receptor de célula T
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
Th	Linfócitos T auxiliares (T helper)
THBD	Trombomodulina
THBS1	Trombospondina – 1
TLR	Receptores do tipo Toll
TNC	Tenascina C
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TT	Tuberculóide tuberculóide
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VCAM	Molécula de adesão celular e vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
WB	Western blotting
WHO	Organização Mundial de Saúde

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Entalhe em madeira, de artista não identificado, demonstrando cristão socorrendo um leproso	2
Figura 1.2 – Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012, referentes ao ano anterior.....	4
Figura 1.3 – Distribuição de novos casos reportados em 115 países, nas regiões da OMS, no ano de 2012.....	5
Figura 1.4 – Padrão de endemia da hanseníase no Brasil baseado nos indicadores epidemiológicos do Ministério da Saúde, 2012	6
Figura 1.5 – Representação das formas clínicas da hanseníase, baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966.....	15
Figura 1.6 – Medicação utilizada no tratamento da hanseníase	18
Figura 1.7 – Lesões de pele de paciente com eritema nodoso.....	24
Figura 1.8 – Estrutura dos enantiômeros da Talidomida.....	27
Figura 4.7 – Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de genes reduzidos em lesões após tratamento com Talidomida e genes aumentados durante o ENH	42
Figura 4.8 – Esquema representativo da seleção dos genes através dos dados gerados pelo microarranjo, previamente obtido	43
Figura 5.2 – Aspectos macro e microscópicos das lesões cutâneas de paciente com ENH antes e 7 dias após tratamento com Talidomida, respectivamente	55
Figura 5.3 – Fotomicrografias das lesões cutâneas de pacientes com ENH no momento do diagnóstico e 7 dias após tratamento com Talidomida.....	57
Figura 5.4 – Modulação da expressão gênica de TNF, THBS1, CYR61, PTX3, TNC, CD16a, VCAM-1, Caspase 1, MMP1, ADAM-12 e SOCS3 por RT-PCR em tempo real semi-quantitativo, de lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH, no momento do diagnóstico e 7 dias após o tratamento com Talidomida, respectivamente.....	59
Figura 5.5 – Western blotting demonstrativo do efeito do tratamento com Talidomida sobre a expressão proteica de TNF, TNC, CD16a, V-CAM, MMP-1, PTX3, Caspase-1 em	

lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH, no momento do diagnóstico e 7 dias após o tratamento com Talidomida, respectivamente.....	61
Figura 5.6 – Expressão de marcadores celulares nas lesões de pele de pacientes com ENH antes e após tratamento com Talidomida, respectivamente	63
Figura 5.7 – Expressão de Tenascina-C (TNC) em lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH antes (A e B) e após 7 dias de tratamento com Talidomida	65

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Vacinação de BCG nos contatos intradomiciliares de hanseníase	20
Tabela 2 – Processos biológicos identificados como negativamente modulados a partir da análise da expressão gênica global em lesões de ENH regredidas após uma semana de tratamento com Talidomida.....	40
Tabela 3 – Seleção de genes utilizados no estudo e seus critérios combinados.	43
Tabela 4 – Quadro clínico representativo de 10 pacientes com ENH no momento do diagnóstico e 7 dias após tratamento com Talidomida.....	53

RESUMO

MENDES, Mayara Abud. Avaliação da modulação da expressão gênica e proteica pela Talidomida em biópsias de lesões de pele de pacientes com Eritema Nodoso Hansênico. Rio de Janeiro, Março de 2015. 118 Folhas. Dissertação (Mestrado). Laboratório de Hanseníase - Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, Brasil.

Introdução: O Eritema Nodoso Hansênico (ENH) consiste no estado de emergência mais importante da hanseníase e representa a principal causa de internações, acometendo a pele e muitos outros órgãos. A presença de infiltrados contendo células polimorfonucleares é frequentemente comum para este tipo de reação e está relacionada com o aumento da inflamação. Uma das características com o ENH é a resposta clínica ao tratamento com Talidomida (Tal), acompanhada por uma significativa redução no número de neutrófilos nas lesões e redução de citocinas pró-inflamatórias. **Objetivo:** Identificar o perfil de expressão gênica das lesões ENH, antes e após o tratamento com a Talidomida, em busca de um melhor entendimento dos mecanismos imunopatogênicos e quais alvos moleculares são modulados pela Talidomida. **Materiais e Métodos:** Biópsias da lesão de pele foram obtidas de quatro pacientes no momento do diagnóstico do ENH e 7 dias após tratamento com Tal e submetidas a análise de microarranjo. A partir desses resultados, os alvos moleculares foram selecionados para a validação, em novas biópsias de lesão de pele obtidas de dez novos pacientes, por RT-PCR em tempo real, *western blotting* (WB) e imunohistoquímica (IH). **Resultados:** Dentre os processos biológicos identificados na análise do microarranjo, os de maior significância estatística foram o de resposta imune e ferimentos. Para validação por RT-PCR em tempo real foram selecionados genes correlacionados a imunopatologia do ENH. A análise da expressão gênica mostrou um redução dos níveis de RNAm de *TNC*; *VCAM1*; *THBS1*; *ADAM12*; *MMP1*; *Cyr61*; *CASP1*; *CD16* nas lesões ENH tratadas com Talidomida em comparação com o grupo ENH. As análises por WB e IH das lesões ENH revelaram que a expressão proteica da TNC, PTX3 e CD16a foram globalmente reduzidas nas lesões após o tratamento com Tal. **Conclusão:** Em resumo, nossos dados sugerem relevância clínica dos alvos moleculares (TNC, PTX3 e CD16a) na patogênese da injúria tecidual da hanseníase estudados no contexto da Talidomida, uma droga eficaz para o tratamento do ENH e responsável pela redução significativa do infiltrado neutrofílico. Dessa forma, nossos estudos indicam que a Talidomida pode modular negativamente a injúria através da diminuição da expressão de TNC que é altamente expressa durante os processos de cicatrização de feridas e inflamação; PTX3, um importante marcador de inflamação vascular; e CD16a expresso em neutrófilos e que reconhecem imunocomplexos. **Comitê de ética:** Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ. **Apoio financeiro:** FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq e CAPES. **Palavras-chaves:** Hanseníase, Eritema Nodoso Hansênico, Talidomida, Microarranjo.

ABSTRACT

MENDES, Mayara Abud. Evaluation of the modulation of gene and protein expression by Thalidomide in biopsies of skin lesions of patients with Erythema nodosum leprosum. Rio de Janeiro, March 2015. 118 pages. Dissertation (Master's degree). Leprosy Laboratory - Oswaldo Cruz Institute - Oswaldo Cruz Foundation - Rio de Janeiro, Brazil.

Introduction: Erythema nodosum leprosum (ENL) is the most important critical state of leprosy and is the leading cause of hospitalization, affecting the skin and many other organs. The presence of infiltrates containing polymorphonuclear cells is frequently common for this type of reaction and is related to increased inflammation. One of ENL's characteristics is the clinical response to treatment with Thalidomide (Thal), accompanied by a significant reduction in the number of neutrophils in lesions and pro-inflammatory cytokines. **Objective:** To identify the gene expression profile of ENL lesions before and after treatment with Thalidomide in search of a better understanding of immunopathogenic mechanisms and molecular targets which are modulated by Thalidomide. **Materials and Methods:** Biopsies of skin lesion were obtained of four patients at the time of being diagnosed with ENL and 7 days after treatment with Thalidomide, and subjected to microarray. From these results, the molecular targets were selected for validation in new biopsies of skin lesion obtained from ten new patients, by real time RT-PCR, western blotting (WB) and immunohistochemistry (IH). **Results:** Among the biological processes identified in the analysis of microarray, those with the highest statistical significance were the immune response and injury response. Genes correlated with immunopathology of ENL were selected for validation by real time RT-PCR. The analysis of gene expression showed reduction in levels of mRNA of TNC; VCAM1; THBS1; ADAM12; MMP1; Cyr61; CASP1; CD16 in ENL lesions treated with Thalidomide in comparison with the ENL group. The IH and WB analysis of ENL lesions revealed that the protein expressions of TNC, PTX3 and CD16a were globally reduced in tissue lesions after treatment with Thal. **Conclusion:** In summary, our data suggests clinical relevance of molecular targets (TNC PTX3 and CD16a) in the pathogenesis of tissue injury of leprosy studied in the context of Thalidomide, an effective drug for the treatment of ENL and responsible for a significant reduction in the neutrophil infiltration. Thus, our studies indicate that Thalidomide can modulate negatively to injury by decreasing the TNC expression that is highly expressed during the healing of wounds and inflammation; PTX3, an important marker of vascular inflammation; and CD16a expressed in neutrophils and recognizing immunocomplexes.

Ethical committee: Committee of Ethics of Research of FIOCRUZ. **Funding support:** FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq and CAPES. **Key words:** Leprosy, Erythema Nodosum Leprosum, Thalidomide, Microarray.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase

1.1.1. Aspectos históricos

A hanseníase é considerada por muitos autores como uma das enfermidades mais antigas conhecidas pela humanidade, e é amplamente conhecida pela designação de lepra. A terminologia *lepra* teve origem em traduções bíblicas do hebraico para o grego, a partir da palavra hebraica *tsaraath*. Porém, este termo foi utilizado para designar diferentes doenças dermatológicas de origens variáveis (Trautman, 1984). No Brasil, em 1976, o termo *lepra* foi substituído por *hanseníase*, em homenagem a Gerhard Hansen, que descreveu o patógeno causador da doença. Essa substituição foi devido à conotação pejorativa do termo anterior, numa tentativa de amenizar o forte estigma social remetido à palavra. Entretanto, somente em 1995, com a lei federal 1.010 / 95, foi terminantemente proibida a utilização do termo lepra (Trautman, 1984).

Os textos antigos descrevem a existência da hanseníase em países como China, Índia e Egito, em cerca de 600 a. C.; além disso, restos de esqueletos que evidenciam características da doença foram encontrados no Egito (Browne, 1985). A suposta origem da doença é atribuída ao subcontinente indiano, tendo sido introduzida, posteriormente, na Europa através dos soldados gregos que regressavam da campanha indiana de Alexandre, o Grande (Browne, 1985). Da Grécia, acredita-se que a doença tenha se espalhado pelo entorno da bacia do Mediterrâneo, tendo sido os romanos, os responsáveis por sua introdução na parte ocidental da Europa. Entretanto, pouco se sabe a respeito de sua presença na África sub-saariana, exceto que a doença estava presente anteriormente a era colonial. Da Índia, acredita-se que a hanseníase tenha se espalhado para a China e, em seguida, para o Japão, atingindo Ilhas do Pacífico como a Nova Caledônia, tão recentemente quanto o século XIX.

Em 2005, Monot *et al.* forneceram evidências de um esquema evolutivo geral para o *M. leprae* e, com base na interpretação dos dados de genômica comparativa, foi demonstrado que todos os casos existentes de hanseníase são atribuíveis a um único clone cuja disseminação mundial pode ser refeita a partir da análise de polimorfismos de nucleotídeo único muito raros. Dessa forma, a doença parece ter se originado na África Oriental ou próximo do Oriente e se disseminou através de sucessivas migrações

humanas. Acredita-se, ainda, que europeus ou norte-africanos foram responsáveis pela introdução da doença na África Ocidental e nas Américas nos últimos 500 anos (Monot *et al.*, 2005).

Os indivíduos que tinham a doença eram enviados aos leprosários ou excluídos da sociedade, pois a enfermidade era vinculada a símbolos negativos como pecado, castigo divino ou impureza, já que era confundida com doenças venéreas. Por medo de contágio pela moléstia – para a qual não havia cura na época – os enfermos eram proibidos de entrar em igrejas e tinham que usar vestimentas especiais e carregar sinetas que alertassem sobre sua presença (figura 1.1) (Fiocruz, 2013).



Figura 1.1. Entalhe em madeira, de artista não identificado, demonstrando cristão socorrendo um leproso, Frankfurt, 1571. Atente-se para o “chocalho” preso ao cinto do doente (Medicine Man – The forgotten Museum of Henry Wellcome, 2003).

Por falta de conhecimento específico, a hanseníase era muitas vezes confundida com outras doenças, principalmente doenças dermatológicas e venéreas, por isso o preconceito em relação ao seu portador; tendo em vista que sua transmissão pressupunha um contato corporal, muitas vezes de natureza sexual e, portanto, relacionado ao pecado (Andrade, 1996; Fiocruz, 2013).

Os primeiros casos de hanseníase no Brasil foram notificados em 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde, anos mais tarde, foi criado o primeiro lazareto, local

destinado a abrigar os doentes com lepra, que também eram chamados na época de lazarentos ou doentes de Lázaro. Alguns autores acreditam que a doença teve início em vários pontos do litoral, com os primeiros colonizadores portugueses e escravos africanos (Andrade, 1996; Eidt, 2004).

Por muito tempo, a hanseníase foi negligenciada e somente em 1920 foi criado o Departamento Nacional de Saúde Pública, por Carlos Chagas, que organizou uma atividade sanitária para o combate da doença (Andrade, 1996). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a hanseníase é uma das doenças negligenciadas de maior interesse no cenário brasileiro, e compõe, atualmente, uma das prioridades de ação do "Programa de Doenças Negligenciadas" do Ministério da Saúde, juntamente com a esquistossomose, dengue, doença de Chagas, leishmaniose, filariose linfática, oncocercose, infecções por helmintos transmitidos pelo solo, tracoma e raiva (Departamento De Ciência E Tecnologia, 2010).

A hanseníase está incluída no grupo de doenças infecciosas de notificação obrigatória devido à sua incidência / prevalência, cronicidade, relevância social e econômica, morbidade (relacionada à deficiência e deformidades), e também porque é uma doença transmissível (exclusiva entre seres humanos), passível de tratamento e de controle. Devido à inexistência de uma vacina específica, a sua prevenção depende da eficácia oportuna de ações de diagnóstico e tratamento (Penna *et al.*, 2011). A doença afeta principalmente pessoas em idade produtiva, causando altos custos econômicos, tanto diretos (relacionados à tratamento e reabilitação) e indiretos (relacionados à perda de potenciais anos de vida, além dos estigmas sociais ainda associados com a doença) (Penna *et al.*, 2011).

1.1.2. Epidemiologia

A resolução da 44^a Assembléia Mundial de Saúde (1991), definiu como eliminação da hanseníase a prevalência de registro abaixo de 1 caso para 10.000 habitantes, meta programática que deveria ter sido alcançada pelos países endêmicos até 2000 (Noordeen, 1995).

Apesar de curável, a hanseníase continua a ser um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. O registro global da doença relatado pela OMS, no início de 2012, foi de 232.876 novos casos detectados. Neste mesmo ano, na

Índia foram relatados 134.752 novos casos, seguido do Brasil com 33.303 e Indonésia com 18.994 casos (Worobec, 2012; OMS, 2012).

O número de novos casos notificados é importante, pois indica a presença de infecção na comunidade. Enquanto 16 países relataram índices ≥ 1000 novos casos, vários outros têm reportado poucos, ou nenhum caso ao longo dos últimos anos. Entre esses países, Índia, Nepal, Nigéria, Costa do Marfim, Filipinas, Sudão do Sul, Sri Lanka e República Unida da Tanzânia relataram mais novos casos em 2012 do que no ano anterior. Os novos casos relatados a partir desses 16 países são responsáveis por 95 % do total de novos casos notificados em todo o mundo (WHO, 2013).

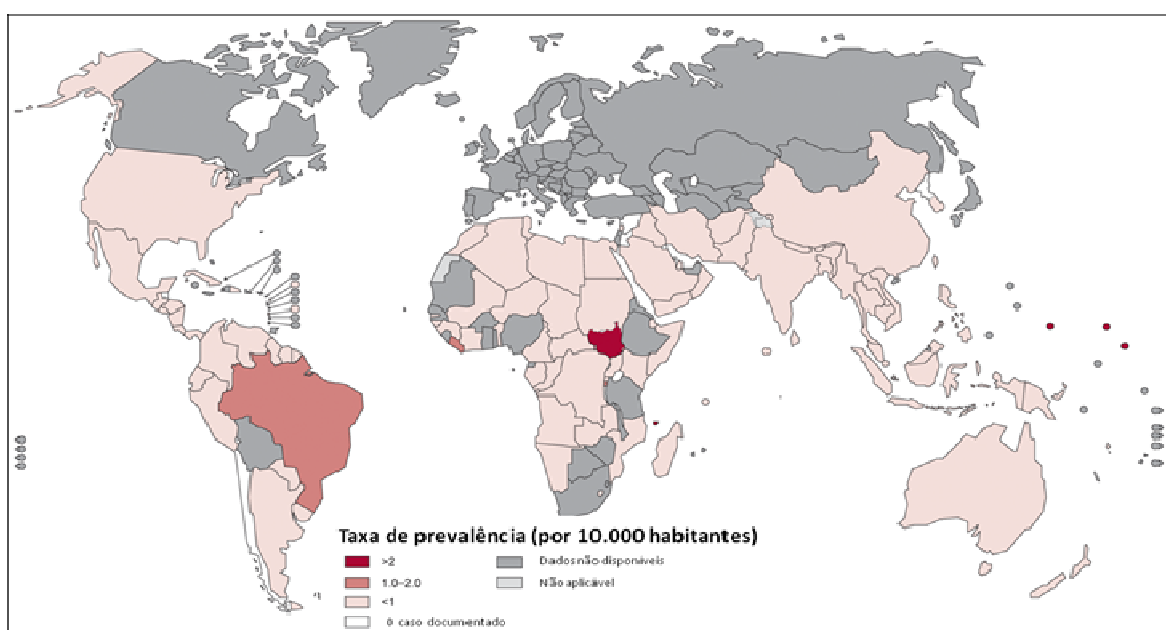


Figura 1.2. Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012, referentes ao ano anterior. As taxas de prevalência correspondem a cada 10.000 habitantes. Os países em destaque representam o Brasil (América do Sul) e o Sudão (África) (Adaptado de OMS, 2012).

Os 115 países que reportaram novos casos de hanseníase têm sido estratificados em cinco categorias (zero casos, 1-9 novos casos, 10-99 novos casos, 100-999 novos casos e ≥ 1000 novos casos), de acordo com o número relatado em 2012. A grande variação no número de casos relatados por esses países reflete a distribuição desigual da doença e implica uma necessidade de estratégias modificadas para cada categoria de países, a fim de melhorar a cobertura da população (WHO, 2013).

Com ênfase no diagnóstico precoce como principal ferramenta disponível para alcançar a meta estabelecida pela estratégia global de reforço, pode esperar-se que o

relato de novos casos aumente. Entre as regiões da OMS, este aumento é visto principalmente no Sudeste Asiático e Regiões africanas (WHO, 2013).

A distribuição dos novos casos detectados em 2012, em todas as regiões da OMS (figura 1.3), foi semelhante aos resultados dos anos anteriores. A região Sudeste da Ásia foi responsável por 71 % dos novos casos detectados em todo o mundo, com 16% das Américas, 9 % da África, 2 % das regiões do Mediterrâneo Oriental e 2 % das regiões do Pacífico Ocidental (WHO, 2013).

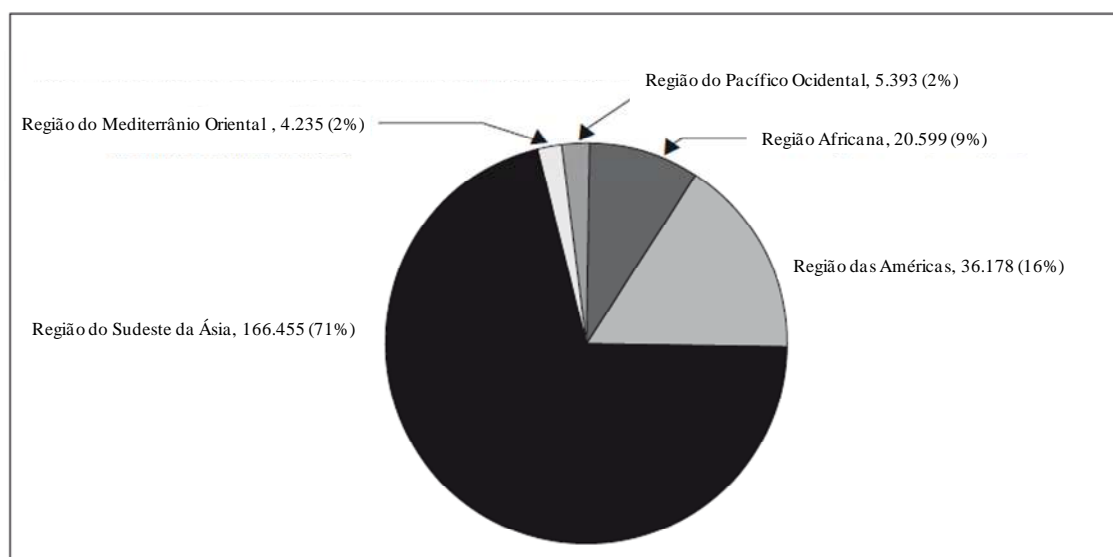


Figura 1.3. Distribuição de novos casos reportados em 115 países, nas regiões da OMS, no ano de 2012 (WHO, 2013).

O Brasil contribuiu com 16 % desses casos e representa mais de 90 % dos casos das Américas (WHO, 2012). Em 2012, dos 33.303 novos casos detectados, 2.446 foram em indivíduos menores de 15 anos e o coeficiente de prevalência foi de 1,51 para cada 10 mil habitantes (MS, 2013).

A distribuição da hanseníase em diferentes regiões do Brasil é heterogênea. Existem parâmetros muito elevados de endemicidades nas regiões Norte e Centro-Oeste, e em algumas capitais da região Nordeste. Por outro lado, vários estados, regiões metropolitanas e cidades do Sul e Sudeste do Brasil apresentam baixas taxas de prevalência e redução na detecção de novos casos anuais (figura 1.4) (MS, 2012). A distribuição espacial heterogênea dos casos implica a necessidade de adoção de políticas apropriadas às diferentes realidades do país.

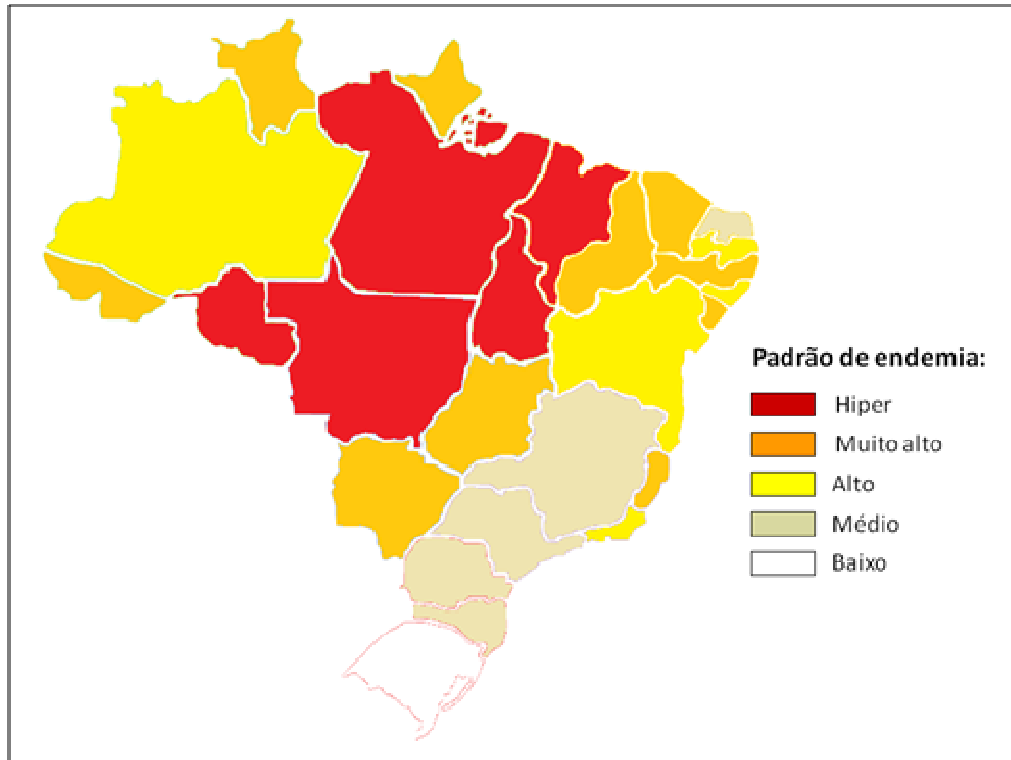


Figura 1.4. Padrão de endemia da hanseníase no Brasil baseado nos indicadores epidemiológicos do Ministério da Saúde, 2012 (MS, 2012). Parâmetros para a determinação do padrão de endemia: Hiper: acima de 40 casos / 100.000 habitantes; Muito alto: 20 a 39 casos / 100.000 habitantes; Alto: 10 a 19 casos / 100.000 habitantes; Médio: 2 a 9 casos / 100.000 habitantes; Baixo: menos de 2 casos / 100.000 habitantes.

No Brasil, uma redução gradual nas taxas de detecção de novos casos pode ser observada (WHO, 2012). No entanto, o diagnóstico de novos casos continua e deverá manter-se ao longo dos próximos anos, ou até mesmo décadas (Schreuder *et al.*, 2012). O impacto de fatores operacionais, as diferenças regionais de endemicidade, e até mesmo o próprio significado do coeficiente de detecção em relação à real incidência da doença são questões que permanecem em aberto (Noto e Nunzi, 2008).

Em 2012, no município do Rio de Janeiro, o coeficiente de prevalência foi de 0,81 por 10.000 habitantes, com detecção de 478 novos casos (7,56 / 100.000 habitantes). O coeficiente em menores de 15 anos foi de 2,77 por 100.000 habitantes e a incapacidade grau 2 ao diagnóstico ocorreu em 46 pacientes (10,2 %) (Secretaria estadual de saúde do Rio de Janeiro, 2012).

1.1.3. Agente Etiológico

A hanseníase possui como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, descrito pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873. Também conhecido como bacilo de Hansen, possui forma de bastonete, gram-positivo, com lados paralelos e extremidades arredondadas, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura, de crescimento lento (12 a 13 dias), parasita intracelular obrigatório, com predileção pelas células de Schwann nos nervos periféricos e macrófagos na pele, podendo também ser encontrado em células epiteliais (Ress, 1985).

Assim como outras micobactérias, é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois se cora em vermelho pela fucsina e é resistente à descoloração pela lavagem com solução álcool-ácida (método Ziehl-Nilsen). Em cortes histopatológicos, os bacilos podem se apresentar de forma isolada ou em aglomerados compactos, chamados de globias, nestas os bacilos se encontram fortemente ligados por material gelatinoso (Ress, 1985).

A parede celular micobacteriana possui características únicas, sendo impermeável a diversos compostos, uma característica responsável pela resistência a inúmeras drogas. O envoltório celular do *M. leprae* é formado, na porção mais interna, por uma membrana plasmática seguida de uma camada de peptidoglicanos covalentemente ligada a arabinogalactana. Os ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose da arabinogalactana. A camada mais externa é composta por lipopolissacarídeos livres, glicolipídeos e fosfolipídeos. A cápsula possui glicolipídeos, onde o mais abundante é o glicolipídeo fenólico I (PGL-I), presente somente em *M. leprae*, conferindo especificidade imunológica a esse patógeno (Hunter e Brennan, 1981).

A entrada do bacilo no nervo é mediada pela ligação do PGL1 com a laminina da célula de Schwann (Fitzpatrick, 2008). O PGL-1 constitui cerca de 2 % da massa total bacteriana e caracteriza-se por ser um antígeno específico do bacilo, podendo ser encontrado no sangue, tecido e urina dos pacientes (Foss, 1997).

Experimentações utilizando modelos *in vitro* - culturas de células nervosas infectadas com *M. leprae* - (Mukherjee e Antia, 1986) e *in vivo* - tatus inoculados intravenosamente com *M. leprae* - (Scollard, McCormick e Allen, 1999) confirmaram o tropismo desse patógeno por nervos periféricos, onde a interação do *M. leprae* com a célula de Schwann leva ao dano neural, desmielinização e perda da condutividade

axonal (Tapinos, Ohnishi e Rambukkana, 2006). Essa predileção do patógeno pelos nervos periféricos (Stoner, 1979; Shimoji *et al.*, 1999) poderia explicar as lesões observadas nos pacientes, assim como as deformações, perda de sensibilidade e atrofias, que caso não tratadas adequadamente, podem evoluir para incapacidades físicas permanentes.

Apesar do *M. leprae* ter sido o primeiro patógeno a ser identificado como agente etiológico de uma doença infecciosa, nunca foi possível o seu cultivo em meio de cultura axênica, explicável pela falta de algumas vias biossintéticas sugeridas pelo sequenciamento genômico (Cole *et al.*, 2001). Em 1960, Shepard desenvolveu uma técnica que possibilitou a inoculação de *M. leprae* na pata de camundongo, onde o bacilo apresentou crescimento localizado e limitado, o que possibilitou inúmeras pesquisas sobre o mesmo (Shepard, 1960). Além disso, já foram descritos modelos experimentais em tatu e em camundongos timectomizados e irradiados (Hastings, 1994; Talhari e Neves, 1997). Entretanto, a impossibilidade do cultivo bacteriano *in vitro*, aliado ao fato de que dentre todas as bactérias conhecidas, o *M. leprae* apresenta o maior tempo de duplicação, em torno de 21 dias, representam grandes barreiras na pesquisa de área básica (Martelli *et al.*, 2002).

A localização das lesões da hanseníase no corpo dos pacientes sugere que os bacilos tenham preferência por temperaturas menores do que 37° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos. O bacilo pode manter-se viável fora do organismo por até 10 dias em temperaturas de 4° C; e em secreção nasal, em temperatura de 20,6° C, por até 7 dias (Shepard, 1965).

O *M. leprae* foi uma das primeiras bactérias patogênicas que tiveram o genoma completamente seqüenciado (Cole *et al.*, 2001). Uma característica que diferencia o bacilo de Hansen de outras micobacterioses é sua constituição genômica, que é formada por 1604 genes com proteínas codificadas e 50 genes para moléculas de RNA estáveis (Cole *et al.*, 2001).

A comparação do genoma do *M. leprae* com o de outras micobactérias demonstra que esse patógeno passou por um processo de evolução reductiva, no qual determinados genes se tornam inativos, uma vez que certas funções não são mais necessárias em nichos altamente especializados, resultando em uma possível perda de mais de 2000 genes. Esse processo é documentado em outros parasitas intracelulares obrigatórios, como *Rickettsia* e *Chlamydia* spp., em organismos endossimbiontes (Stinear *et al.*, 2007), e em *M. ulcerans* (Andersson e Andersson, 1999; Stinear *et al.*,

2007), onde determinados genes se tornam inativos, uma vez que certas funções não são mais necessárias em nichos altamente especializados. Por conta dessa redução no genoma, o *M. leprae* tornou-se dependente dos produtos metabólicos contidos nas células do hospedeiro, sendo por isso, difícil o seu cultivo em meio artificial (Daffe e Draper, 1998).

1.1.4. Transmissão

Os mecanismos de transmissão da hanseníase ainda não são bem compreendidos. Estudos demonstram que os contatos de pacientes com hanseníase apresentam um risco maior de desenvolver a doença, em relação à população normal (Santos, Faria e Menezes, 2008). Acredita-se que sua transmissão seja através de pessoa a pessoa, devido à propagação de aerossol nasal ou gotículas do trato respiratório, sendo as vias aéreas superiores a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo (Talhari e Neves, 1997; Santos, Faria e Menezes, 2008).

Estudos demonstraram que os pacientes lepromatosos podem abrigar elevada carga bacteriana, até 7.000 milhões de bacilos em um grama de tecido, enquanto que nas demais formas da doença, a carga bacilar é conhecida por ser muito menor, da ordem de um milhão de bacilos no total (Talhari e Neves, 1997; Santos, Faria e Menezes, 2008).

O *M leprae* tem sido encontrado em números elevados (100 milhões de bacilos viáveis por dia) na mucosa nasal (Davey e Rees, 1974). Apesar da pele ter sido sugerida como uma possível via de transmissão, esta hipótese nunca foi comprovada. À medida que a viabilidade do bacilo fora do corpo estende-se ao longo de um período que varia de 36 horas a 9 dias, dessa forma, fomites podem desempenhar um papel na transmissão.

Nenhuma relação entre o bacilo e um vetor tem sido estabelecida, entretanto esta possibilidade não pode ser excluída. Como a hanseníase não é uma doença altamente contagiosa, algumas condições devem ser conhecidas antes que um hospedeiro possa estar infectado. Além disso, casos de hanseníase tuberculóide transmitida através de tatuagem têm sido relatados, principalmente na Índia (Ghorpade, 2009); bem como a transmissão vertical, de forma que, díades de mãe - filho devam ser acompanhadas (Duncan *et al.*, 1983).

Acrescenta-se, ainda, a presença de relatos de contaminação por fluidos corporais, tais como leite, sêmen, suor e secreções vaginais, mas estes não possuem significância epidemiológica na disseminação da infecção (Talhari e Neves, 1997; Van Beers, De Wit e Klaster, 1996).

Recentemente um estudo buscou detectar material genético do patógeno em raspados bucais de pacientes hansenianos e contatos dos mesmos na tentativa de determinar o envolvimento da mucosa oral na transmissão da doença. Interessantemente, quando os pacientes foram estratificados segundo a fonte de coleta da amostra (raspados nasal, bucal, ou ambos) aqueles considerados paucibacilares apresentaram uma maior frequência de DNA de *M. leprae* em *swabs* bucais, enquanto aqueles considerados multibacilares a detecção do DNA do bacilo foi mais frequente em *swabs* nasais. Essa foi a primeira evidência que a mucosa oral, principalmente em indivíduos paucibacilares, pode ter uma importante implicação para a transmissão do bacilo. Entre os contatos domiciliares analisados no estudo, aproximadamente 7 % apresentaram positividade para a detecção do DNA de *M. leprae*. Isso reforça a evidência que contatos domiciliares podem ser carreadores do bacilo e representar uma segunda fonte ativa de transmissão, contribuindo para a disseminação da hanseníase (Martinez *et al.*, 2010).

O *M. leprae* possui alta infectividade e baixa patogenicidade. Acredita-se que mais de 95 % dos indivíduos que habitam áreas endêmicas sejam resistentes à infecção pela micobactéria e não apresentem sintomas clinicamente detectáveis (Godal *et al.*, 1972). Considera-se o homem como o principal hospedeiro e reservatório do bacilo, apesar do relato de animais selvagens naturalmente infectados (tatus, macacos e chimpanzés). Os pacientes portadores de formas multibacilares são considerados a principal fonte de infecção, não obstante o papel dos paucibacilares na cadeia de transmissão já ter sido demonstrado; sendo importante ressaltar que, para se adquirir a doença é necessário contato próximo e prolongado (OMS, 2012). Entretanto, a existência de portadores sadios tem sido relatada pelos estudos de DNA utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR); embora, o papel desses indivíduos na transmissão e o seu risco de adoecimento não estejam definidos (Visschedijk *et al.*, 2000).

Apesar do *M. leprae* ser um patógeno intracelular obrigatório, alguns estudos buscaram identificar a presença do patógeno em reservatórios “não-humanos”; como, por exemplo, amostras ambientais (Desikan, 1977; Desikan e Sreevatsa, 1995).

Matsuoka e colaboradores relataram a presença de DNA de *M. leprae* em amostras de água de locais com altos índices de prevalência de hanseníase na Indonésia (Matsuoka *et al.*, 1999). Outro estudo, também utilizando uma abordagem molecular, identificou material genético do patógeno em amostras de solo em áreas endêmicas na Índia (Lavania *et al.*, 2008). Entretanto, ainda se faz necessário melhores estudos para compreender a relevância do ambiente e de outros reservatórios na dinâmica de transmissão da doença.

Embora a hanseníase hoje se mantenha nos países mais pobres e nos estratos referentes a populações menos favorecidas, não se sabe ao certo o peso de variáveis como moradia, estado nutricional, infecções concomitantes (por exemplo: HIV e malária), e infecções prévias por outras micobactérias. O papel de fatores genéticos tem sido avaliado há muito tempo; a distribuição da doença em conglomerados, famílias ou comunidades com antecedentes genéticos comuns sugere esta possibilidade (Van Beers, De Wit e Klatser, 1996; Visschedijk *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2011).

A interrupção da transmissão da doença está relacionada com inúmeros fatores: ambientais, sócio econômicos, resposta imune e predisposição genética de cada indivíduo, representando um grande desafio para os programas de controle da doença (OMS, 2012).

1.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é realizado por meio da identificação de sinais e sintomatologia, análise da história epidemiológica e condições de vida do paciente, exame dermatoneurológico para identificar lesões ou áreas de pele com alterações de sensibilidade e / ou comprometimento de nervos periféricos (sensitivo, motor e / ou autonômicos) (MS, 2010).

Pela Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde, a hanseníase é definida pela presença de um ou mais dos seguintes parâmetros: lesão (ões) de pele com alteração da sensibilidade; acometimento de nervo (s) com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e / ou motoras e / ou autonômicas ou baciloscopia positiva (MS, 2010; OMS, 2012).

Em certos casos se faz necessário o uso de ferramentas complementares, como exames baciloscópicos e histopatológicos, para auxiliar a confirmação do diagnóstico e

classificação clínica da doença. O exame baciloscópico de esfregaços cutâneos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e / ou lesões suspeitas) deve ser realizado em todos os pacientes com suspeita clínica da hanseníase. A baciloscopia apresenta alta especificidade e baixa sensibilidade. Além disso, possui fácil execução e baixo custo, embora necessite de laboratório e profissionais habilitados para a sua execução. Esse exame consiste na contagem de bacilos em microscópio óptico após a coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Nilsen (Cocito e Delville, 1985). Nas formas paucibacilares, e em alguns pacientes multibacilares, o exame apresenta resultados negativos, entretanto resultados positivos classificam o caso como multibacilar, independente do número de lesões apresentadas pelo paciente (MS, 2010b).

Para os exames histopatológicos são utilizadas biópsias cutâneas da área da lesão ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos. Nesse caso, os bacilos presentes nas biópsias podem ser detectados através da coloração pelo método de Wade (Cocito e Delville, 1985). Esse tipo de exame é utilizado no diagnóstico, na classificação das formas clínicas e para caracterizar os estados reacionais. Devido às dificuldades operacionais para o seu uso, pois necessita de apoio da anatomia patológica, passou a ser considerada como uma classificação destinada a centros especializados e trabalhos de pesquisa (Fleury, 2005).

O PGL-1, um glicolípido presente em abundância na parede do *M. leprae*, é um antígeno específico do patógeno, e constitui 2 % da massa total bacteriana, podendo ser facilmente encontrado nos tecidos infectados, sangue circulante e urina de pacientes multibacilares, sendo responsável por desencadear uma resposta imune humoral precoce (Cho *et al.*, 1983; Hunter e Brennan, 1981).

Devido a essa especificidade imunológica, foi possível desenvolver imunoenaios, principalmente utilizando a técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), capazes de detectar anticorpos contra o antígeno PGL-I, no qual os níveis de produção do IgM anti-PGL-1 indicam exposição ao *M. leprae* e correlaciona-se com a baciloscopia (Laferte *et al.*, 1991). A detecção de anti-PGL-1 também pode ser realizada através de testes de aglutinação com partículas de gelatina (MLPA), *dipstick* e através do teste fluxo lateral.

O teste de fluxo lateral é um teste rápido realizado em 10 minutos e que possui correlação com a técnica de ELISA, demonstrando alta sensibilidade na classificação de pacientes com a forma severa da doença (97,4 %) e alta especificidade em comparação com grupos controle (90,2 %) (Bührer-Sékula *et al.*, 2003). Dessa forma, a detecção de

anticorpos anti-PGL1 pode contribuir para a avaliação do nível de exposição dos contatos com maior risco de desencadear a doença, auxiliar na classificação dos pacientes e no monitoramento da eficácia do tratamento, em virtude do seu declínio durante e após o tratamento, contudo nem todos os pacientes portadores da doença apresentam títulos anti - PGL1 (Moura *et al.*, 2008; Büher – Sékula *et al.*, 2008).

Um dos maiores avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase foi o desenvolvimento de ensaios moleculares para a detecção do bacilo, principalmente baseados na técnica de PCR. A alta especificidade e sensibilidade dessa técnica permite sua utilização a partir de uma variedade de amostras clínicas, tais como linfa, sangue, secreção nasal, esfregaços cutâneos e biópsias de pele e nervos (Goulart, 2007).

Alguns estudos apontam uma sensibilidade de 90 % para pacientes multibacilares e 30 % em paucibacilares (Goulart, 2007). A identificação molecular do *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Para isso, diferentes genes-alvo do patógeno têm sido utilizados e comparados, tais como o elemento repetitivo *RLEP*, *Ag85B* e o *16S* RNA ribossomal (Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2011).

Com isso, a detecção molecular do bacilo é uma valiosa ferramenta para auxiliar casos de difícil diagnóstico, como por exemplo, a forma neural pura (PNL) da doença, uma vez que esta se manifesta sem a presença de lesões na pele. Outra aplicação importante da técnica de PCR é a determinação da viabilidade do *M. leprae* em amostras biológicas (Martinez *et al.*, 2009).

1.1.6. Classificação

Por conta de seu amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, a compreensão da hanseníase se tornaria difícil sem o auxílio de um sistema de classificação.

As classificações mais usadas no Brasil são as de Madri (Conferência de Madri, 1953) e de Ridley e Jopling (1966). Em 1953, durante a Conferência de Madri, foi sugerida uma nova classificação que dividia a hanseníase em dois grupos estáveis e antagônicos: tuberculóide e lepromatoso (virchowiano) e dois grupos instáveis: indeterminado e borderline (dimorfo), que caminhariam para um dos pólos, na evolução natural da doença (Basombrio *et al.*, 1953).

Em 1966, a classificação proposta por Ridley e Jopling, sem alterar fundamentalmente a classificação de Madri e com maior complexidade do conceito de polaridade, permitiu uma melhor compreensão do aspecto espectral da hanseníase, baseada em aspectos clínico-evolutivos, imunológicos, baciloscópicos e histopatológicos, consistindo em cinco formas da doença, que compreendem dois pólos opostos e três formas intermediárias que variavam de acordo com a resistência do hospedeiro; além disso, suas subdivisões possuem correlação direta com o número de bacilos detectados nas lesões, o qual é geralmente expresso como uma escala logarítmica que varia de 0 a 6+ (índice baciloscópico, IB) (Ridley e Jopling, 1966).

Com isso, em um dos pólos, denominado de pólo tuberculóide polar (TT), encontram-se indivíduos resistentes, a doença clínica é limitada apresentando lesões localizadas e bem demarcadas, e poucos bacilos, raramente positivos para exames bacteriológicos, além de exibir uma robusta resposta imune celular específica ao *M. leprae* (tipo Th1) e reação positiva à lepromina.

No pólo oposto, denominado de pólo lepromatoso polar (LL), encontram-se aqueles indivíduos que exibem uma forma disseminada da doença, com múltiplas lesões altamente bacilíferas, devido à ineficiente resposta imune celular, além de exibir predomínio da resposta imune humoral (tipo Th2), e reação negativa à lepromina. As formas clínicas intermediárias, denominadas “borderline”: *borderline* tuberculóide (BT), *borderline* média (BB), *borderline* lepromatosa (BL), são definidas de acordo com suas respectivas proximidades ao pólo resistente ou ao pólo susceptível (figura 1.5) (Ridley e Jopling, 1966; Fleury, 2006).

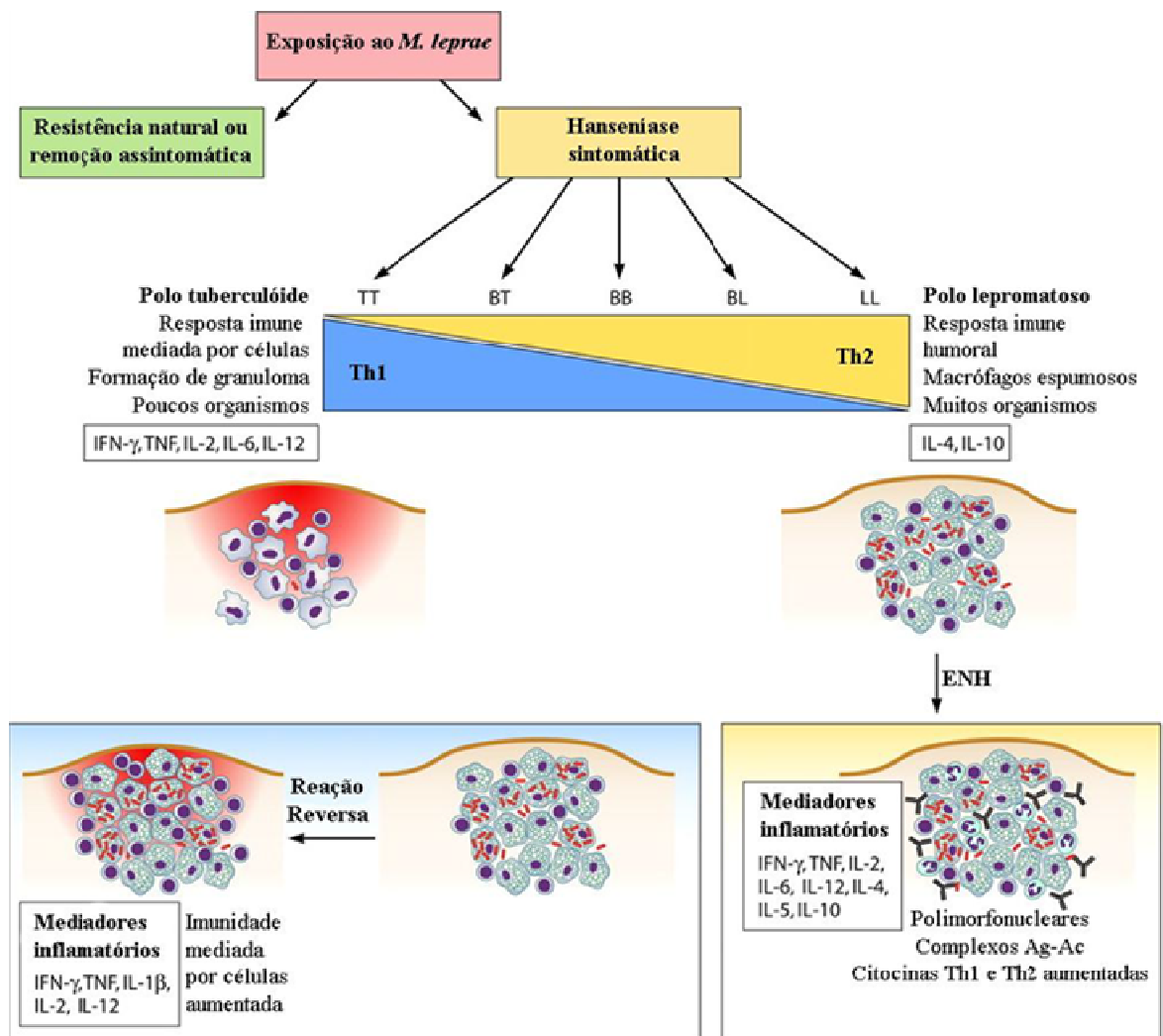


Figura 1.5. Representação das formas clínicas da hanseníase, baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966. Esquema demonstra o perfil espectral da doença: TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais, denominados RR (reação reversa) e ENH (eritema nodoso hansênico), os quais acometem principalmente indivíduos das formas clínicas indicadas para cada tipo de episódio reacional (Misch *et al.*, 2010).

Inicialmente, a forma indeterminada não foi incluída no espectro, sendo considerada uma fase inicial da doença, que não apresenta granulomas (Fleury, 2006). Em 1974, Ridley propôs uma modificação na classificação, onde a forma LL foi subdividida em polar e subpolar (Ridley, 1974), e apenas em 1978 a forma indeterminada foi proposta por Opromolla e Fleury e incorporada à classificação de Ridley e Jopling (Jopling e McDougall, 1988).

Devido às dificuldades operacionais da classificação proposta por Ridley e Jopling para o seu uso, pois necessita de apoio de exames histopatológicos, esta classificação passou a ser destinada a centros especializados, e trabalhos de pesquisa (Fleury, 2006). Em vista disso, em 1982, a OMS criou uma classificação mais simples (classificação operacional), indicada para o trabalho de campo, com a intenção de operacionalizar o diagnóstico e controle da doença, especialmente em áreas endêmicas.

O esquema de classificação da OMS é sobreposto à escala de Ridley-Jopling para compreender dois regimes distintos de poliquimioterapia e consiste em duas categorias: doença paucibacilar (PB), que inclui as formas tuberculóide polar e *borderline* tuberculóide, e doença multibacilar (MB), que inclui as formas *borderline* média, *borderline* lepromatosa e forma lepromatosa polar (MS, 2010). Os casos PB apresentam até cinco lesões cutâneas no total e os casos MB, seis ou mais lesões cutâneas. Caso o resultado do exame baciloscópico seja positivo, o paciente deverá ser classificado como MB, independentemente do número de lesões cutâneas que o mesmo apresente. Entretanto se o resultado for negativo, a classificação será definida levando em consideração somente o número de lesões cutâneas (MS, 2010).

Acrescenta-se ainda que, independente das formas clínicas apresentadas, existe uma denominação específica designada como hanseníase neural pura (HNP) ou primária, para casos em que o paciente queixa-se de parestesia, que evolui para hipo ou anestesia em determinada área, e comprometimento motor, ou ambos. Na maior parte dos casos o comprometimento é assimétrico; e pode haver comprometimento de mais de um tronco nervoso, sendo os nervos ulnar, mediano e fibular os mais comprometidos (Azulay, 2011).

Os pacientes considerados suspeitos de HNP apresentam o comprometimento nervoso periférico como primeira manifestação do tipo mononeuropatia, mononeuropatia múltipla ou polineuropatia, e mononeuropatia confluyente, sem outra suspeita na anamnese e ausência de lesão de pele identificável clínica e laboratorialmente (Garbino, 2011).

Para o diagnóstico deste tipo de manifestação clínica se faz necessário a utilização de exame histopatológico de nervo periférico, colhido por biópsia, junto aos dados clínicos, eletroneuromiográficos, laboratoriais e epidemiológicos obtidos do paciente (Garbino, 2011).

1.1.7. Tratamento

Até a década de 1940, a hanseníase era tratada nos leprosários com óleo de chaulmoogra, medicamento fitoterápico natural da Índia, administrado através de injeções ou por via oral; e provavelmente os casos curados devido ao seu uso eram os que regrediam para cura de forma espontânea (Opromolla, 1997).

Os pesquisadores só se deram conta de que o isolamento não era solução para o combate à doença no final de 1940, graças aos avanços da indústria químico-farmacêutica e das pesquisas laboratoriais, e ao uso da sulfona no tratamento dos enfermos. Dessa forma, a dapsona foi a primeira droga a ser empregada efetivamente contra a hanseníase e o primeiro caso de resistência foi notificado em 1964 (da Silva Rocha, 2012; Opromolla, 1997, Fiocruz, 2013).

No fim da década de 70, foram relatados vários casos de resistência medicamentosa e muitos países apresentaram taxas alarmantes de resistência secundária à sulfona. Em vista disso, intensificou-se o temor da perda de um dos medicamentos mais importantes no tratamento da hanseníase. Conscientes disso, a OMS propôs, em 1977, a associação de medicamentos para o tratamento da doença; e em 1981, após avaliação de especialistas, a poliquimioterapia (PQT) passou a ser adotada em seu tratamento, sendo considerada o instrumento mais importante na eliminação da doença (Opromolla, 1997; Lombardi *et al.*, 1998; Oliveira, Oliveira e Andrade, 1989).

Nos anos 1980, a preocupação com os pacientes que passaram décadas isolados levou à redefinição dos leprosários, que foram então transformados em hospitais gerais ou centros de pesquisa (Fiocruz, 2013). No Brasil, a PQT teve início gradativo após 1986 e só foi amplamente utilizada em todo o país na década de 90 (Gallo, 1995).

Todos os casos de hanseníase possuem tratamento e cura. O tratamento desses pacientes é realizado através da administração da poliquimioterapia (esquema terapêutico padrão nos países endêmicos, com distribuição gratuita pela OMS), no qual é feita uma associação de três drogas bactericidas e bacteriostáticas (rifampicina, dapsona e clofazimina) usadas de forma padronizada contra os bacilos; além disso, o tratamento possui duração fixa, dependendo do número de lesões e do resultado do exame baciloscópico (Noordeen, 2000).

A combinação das drogas é recomendada com o intuito de evitar a resistência medicamentosa; reduzir a duração e os custos do tratamento, de modo a se tornarem compatíveis operacional e financeiramente com a implementação nos países endêmicos;

aumentar a adesão do paciente e garantir a interrupção da cadeia epidemiológica da hanseníase, evitando as incapacidades (Ji, 1985; Waters, 1993; Grosset, 2000).

Existem dois tipos de tratamento de acordo com o índice baciloscópico da doença. O tratamento de pacientes multibacilares possui duração de 12 doses (devendo ser completado em até 18 meses), são utilizadas rifampicina (600 mg, uma dose por mês), clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia) e dapsona (100 mg por dia), já nos pacientes paucibacilares são administrados somente rifampicina (600 mg, uma dose por mês) e dapsona (100 mg por dia) por um período de seis doses (devendo ser completado em até 9 meses) (figura 1.6) (WHO, 2015a).

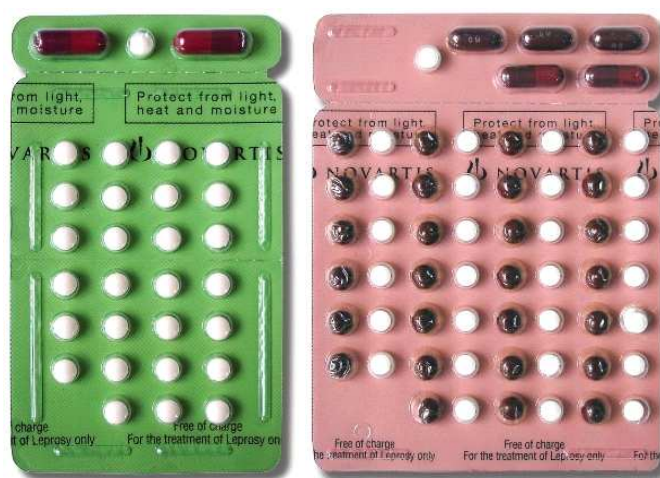


Figura 1.6. Medicação utilizada no tratamento da hanseníase. Cartela verde destinada ao tratamento de pacientes paucibacilares adultos e cartela vermelha, pacientes multibacilares adultos (Organização Pan Americana da Saúde, 2010).

A rifampicina é a droga mais importante da PQT, e por isso é utilizada nos dois tipos de pacientes. O seu alto poder foi verificado, experimentalmente, e é capaz de destruir, com uma única dose, 99,9 % das bactérias existentes em uma amostra, eliminando todas as subpopulações de *M. leprae* resistentes às demais drogas (Opromolla, 1997; Hastings, 1998; Fiocruz, 2013; OMS, 2012).

O portador de hanseníase recebe a denominada *alta por cura*, após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico, e regularidade ao tratamento, de forma que o paciente sai do registro ativo e não mais será computado nos coeficientes de prevalência da doença (Ministério da Saúde, 1999).

1.1.8. Medidas Preventivas

O diagnóstico precoce da hanseníase, tratamento com PQT, exame dos contatos, vacinação com BCG, identificação e tratamento adequado das reações e neurites, orientação de autocuidado, bem como apoio emocional e social a estes indivíduos favorecem a prevenção de incapacidades (PI). A PI se faz necessária em alguns casos após a alta da PQT (reações, neurites e deformidades em olhos, mãos e pés). A avaliação neurológica, grau de incapacidade, aplicação de medidas preventivas e a orientação para o autocuidado são procedimentos que precisam ser realizados nas Unidades de Saúde, pois são necessários para evitar seqüelas (Ministério da Saúde, 2010).

Por outro lado, é fundamental o monitoramento dos contatos domiciliares. Para fins operacionais, considera-se contato intradomiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o paciente hansênico nos últimos cinco anos (MS, 2010). Além disso, a ampla cobertura com a vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guërin) continua sendo uma contribuição importante para a redução da carga da hanseníase (Düppre *et al.*, 2008).

A investigação epidemiológica consiste no exame dermato-neurológico de todos os contatos intradomiciliares dos novos casos detectados, independentemente de sua classificação operacional e do repasse de orientações sobre o período de incubação, transmissão e sinais e sintomas precoces da hanseníase, visando, com isso, à descoberta de casos entre aqueles indivíduos que convivem ou conviveram com o doente e suas possíveis fontes de infecção (OMS, 2010).

No Brasil, de acordo com as normas implementadas pelo Ministério da Saúde através da Portaria Conjunta N° 125, de 26 de março de 2009, por orientação da OMS, a utilização da vacinação com BCG segue os seguintes critérios: os contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase com menos de um ano de idade já vacinados, não necessitam da aplicação de outra dose de BCG; entretanto, os contatos com mais de um ano de idade, já vacinados com a primeira dose, que não apresentem sinais e sintomas da doença no momento da avaliação, independentemente de serem contatos de pacientes classificados como PB ou MB devem seguir as instruções da tabela 1 (Cunha *et al.*, 2004). Na incerteza da cicatriz vacinal ao exame dos contatos intradomiciliares, recomenda-se aplicar uma nova dose, independentemente da idade.

Avaliação da Cicatriz Vacinal	Conduta
Sem cicatriz	Prescrever uma dose
Com uma cicatriz de BCG	Prescrever uma dose
Com duas cicatrizes de BCG	Não prescrever nenhuma dose

Tabela 1 – Vacinação de BCG nos contatos intradomiciliares de hanseníase (Portaria Nº 3.125, de 7 de Outubro de 2010).

Com isso, foi demonstrado que a administração da vacina BCG subsequente ao diagnóstico de um caso de hanseníase multibacilar é extremamente eficaz na redução do risco de doença entre os familiares e outros contatos próximos a esses pacientes com hanseníase; e que o monitoramento dos contatos domiciliares, em busca de diagnóstico precoce desses indivíduos ainda em estágios iniciais da hanseníase, é determinante para a prevenção e diminuição da gravidade da doença (Düppre *et al.*, 2008).

1.9. Episódios Reacionais

Os episódios reacionais hansênicos, também denominados estados reacionais ou reações hansênicas, representam fenômenos inflamatórios agudos sobrepostos à evolução crônica da infecção, e caracterizam-se por uma exacerbação do quadro clínico de forma súbita, com surgimento de novas lesões na pele, reativação de lesões antigas, agravamento dos sintomas neurológicos (Jopling, 1970). Esses episódios são frequentes e importantes no contexto da hanseníase, podendo ocorrer durante o curso natural da doença, ao longo e / ou após o tratamento específico com a poliquimioterapia (PQT), e refletem o fenômeno de hipersensibilidade aguda diante dos antígenos do *M. leprae* (Kamath *et al.*, 2014).

Os estados reacionais são a principal causa de lesões dos nervos periféricos, com perda potencial da função neural, evoluindo para incapacidades físicas importantes, provocadas pela hanseníase; além de constituírem importantes fatores de risco para o retratamento da doença e abandono de tratamento (MS, 2002; Lucas, 2005; Silva e Griep, 2007). Na prática de campo, a carga de sofrimento produzido por esta morbidade reflete diretamente na incompreensão dos pacientes quanto à realidade de hoje que hanseníase tem cura (Souza, 2010).

As reações seguem-se a fatores desencadeantes, implicados como importantes no desenvolvimento desses episódios reacionais, tais como: infecções intercorrentes, vacinação, uso de contraceptivo e outras drogas, puerpério, gravidez, amamentação, medicamentos iodados, estresse físico e emocional. Os indivíduos hansenianos podem ser surpreendidos por esses quadros ou estados reacionais em cerca de 10 a 50 % dos casos, e constituem um dos maiores problemas encontrados no manejo de pacientes portadores de hanseníase (Burns *et al.*, 2004; Nery, 2013).

Esses episódios podem ocorrer tanto em casos multibacilares (maioria dos casos), como paucibacilares (Burns *et al.*, 2004; Nery, 2013). Em pacientes com grande carga bacilar, a presença contínua de antígenos de bacilos mortos aumenta o risco de reações hansênicas, já que esta eliminação bacilar é lenta e depende do sistema fagocitário do indivíduo na ordem de 0,6 a 1,0 log / ano. Este mecanismo também explica porque as reações podem ocorrer logo após alta medicamentosa (Manandhar, Lemaster e Roche, 1999).

Em 1998, Nery *et al* realizaram um estudo com pacientes multibacilares, no qual foi demonstrado que em pacientes com índice baciloscópico maior do que três existe uma maior proporção de casos de eritema nodoso hansênico, enquanto nos pacientes com índice baciloscópico menor do que três, a reação reversa é mais frequente (Nery *et al.*, 1998).

A duração e o número desses surtos reacionais dependem muitas vezes da forma clínica, bem como do índice baciloscópico inicial (Becx-Bleumink, Berhe, 1992; Kahawita, Walker, Lockwood, 2008); dessa forma, a caracterização clínico-epidemiológica dos padrões reacionais é primordial para o manejo desses pacientes. A compreensão da correlação entre as formas clínicas e os estados reacionais é extremamente importante, principalmente quando estes estados ocorrem após a alta por cura, podendo ser confundidos com recidiva (Shetty, Wakade e Antia, 2001).

Grandes variações na apresentação clínica da hanseníase na reação fazem da histopatologia uma ferramenta importante para apoiar o diagnóstico clínico (Adhe, Dongre e Khopkar, 2012).

As reações hansênicas são classificadas em dois tipos de acordo com Jopling (1970): reação hansênica do tipo I ou reversa (RR), e a reação hansênica do tipo II, cuja principal manifestação é o eritema nodoso hansênico (ENH). A RR é causada por um aumento súbito da resposta imune celular ao *M. leprae*, gerando uma resposta

inflamatória que é extremamente danosa ao tecido afetado; além disso, estudos demonstram um predomínio do padrão Th1 (IL-1 β , TNF, IL-2, IFN- γ) nessas reações (Nery, 2006; Nery, 2013).

A RR acomete entre 10 e 33 % dos pacientes com hanseníase e surge, geralmente durante o tratamento ou após o primeiro ano da alta. Os pacientes apresentam as seguintes características clínicas: infiltração de lesões antigas, associada ao surgimento de novas lesões em forma de manchas ou placas infiltradas; eritema; edema das lesões pré-existentes; e aparecimento de novas pápulas e placas eritematosas, na maioria das vezes na sua vizinhança; dor; lesões vésico-bolhosas; ulcerações; hiperestesia; parestesia; mal estar; dor ou espessamento de nervos periféricos com perda da função sensitivo-motora e, mais raramente, febre; déficit da função neural na ausência de sintomas (neuropatia silenciosa), acometendo principalmente os nervos ulnar e tibial posterior (Andrade, Lehman e Schreuder, 2005; Nery *et al.*, 2006).

A RR pode ocorrer nas formas clínicas *borderline*: *borderline* tuberculóide (BT), *borderline* média (BB) e *borderline* lepromatosa (BL) (Batista *et al.*, 2008). Aproximadamente um terço dos pacientes com a forma *borderline* lepromatosa (BL) possuem risco de desenvolver a RR. Além disso, sua histopatologia apresenta edema dentro do granuloma, separando células inflamatórias com variadas densidades de linfócitos na derme; em vista disso, faz-se necessário a realização do exame de série de biópsias para a distinção entre progressão ou involução da histopatologia da reação (Lucas, 2005; Kamath *et al.*, 2014). O tratamento da RR é realizado por meio do corticóide sintético prednisona na dose de 1 a 2 mg / Kg (peso / dia), até melhora do quadro, com redução gradual da dose, com o objetivo de reduzir a reação inflamatória (MS, 2010).

O ENH afeta cerca de 50 % dos pacientes multibacilares. Geralmente, é caracterizado pelo surgimento abrupto de pápulas, nódulos dolorosos profundos, eritematosos, que podem variar de poucos a inúmeros, que podem evoluir para necrose, nas formas mais graves do ENH; também pode vir acompanhado de sintomatologia relacionada ao acometimento ocular, hepático, esplênico, de linfonodos, peritônio, testículos, articulações, tendões, músculos, ossos e rins, acompanhados, muitas vezes, por febre, mal-estar geral, adenopatia dolorosa leucocitose e, geralmente apresentam-se em múltiplos episódios, tornando-se mesmo crônico (Pocaterra *et al.*, 2006).

O ENH tem como características histopatológicas edema dérmico, infiltração de neutrófilos e vasculite em um fundo de infiltrado macrofágico (Hussain *et al.*, 1995). De acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde, a Talidomida é a droga de escolha na dose de 100 a 300 mg / dia, conforme a intensidade do quadro. Na impossibilidade do seu uso, prescreve-se prednisona na dose de 1 a 2 mg / kg / dia (MS, 2010). Segundo Azulay (2011), outras drogas também podem ser utilizadas na reação do tipo II: clofazimina, pentoxifilina e azatioprina. Além da metilprednisolona endovenosa ou pulsoterapia para facilitar a retirada da dose oral total do corticóide, com conseqüente diminuição dos efeitos colaterais e morbidade (Nery, 2006; Azulay, 2011).

1.9.1. A Reação do tipo II - Eritema Nodoso Hansênico

O ENH é uma das principais causas de danos permanentes nos nervos periféricos, podendo acarretar em deformidades e incapacidades observadas na hanseníase. Acredita-se que o ENH seja um episódio relacionado à formação de complexos imunes com conseqüente ativação do sistema complemento (Legendre, Muzny e Swiatlo, 2012). Dados recentes sugerem que a resposta imune mediada por células desenvolve um importante papel na doença (Kahawita e Lockwood, 2008).

A maioria dos pacientes apresenta múltiplos episódios agudos da doença de curta duração ou ENH crônico com durabilidade maior do que 6 meses (Pocaterra *et al.*, 2006), podendo se prolongar durante vários anos (Kumar, Dogra e Kaur, 2004).

A forma LL e o índice de bacilos ≥ 4 representam fatores de risco significativos para o desenvolvimento do ENH (Manandhar, Lemaster e Roche, 1999; Saunderson, Gebre e Byass, 2000; Pocaterra *et al.*, 2006). Em 1999, Manandar *et al* demonstraram que o infiltrado dérmico também representa um fator de risco (Manandhar, Lemaster e Roche, 1999). Além disso, demais fatores de risco como gravidez, lactação, puberdade, infecção intercorrente, vacinação e estresse psicológico têm sido associados (Maurus, 1978; Duncan *et al.*, 1983), embora não tenham sido confirmados em estudos prospectivos.

As lesões desse episódio reacional são tipicamente encontradas na face e na extensão da superfície dos membros, mas qualquer local do organismo pode ser afetado (figura 1.7) e o infiltrado inflamatório encontra-se, normalmente, situado nas camadas

profundas da derme e epiderme. As células constitutivas do infiltrado variam de acordo com a evolução da doença (Mabalay *et al.*, 1965).

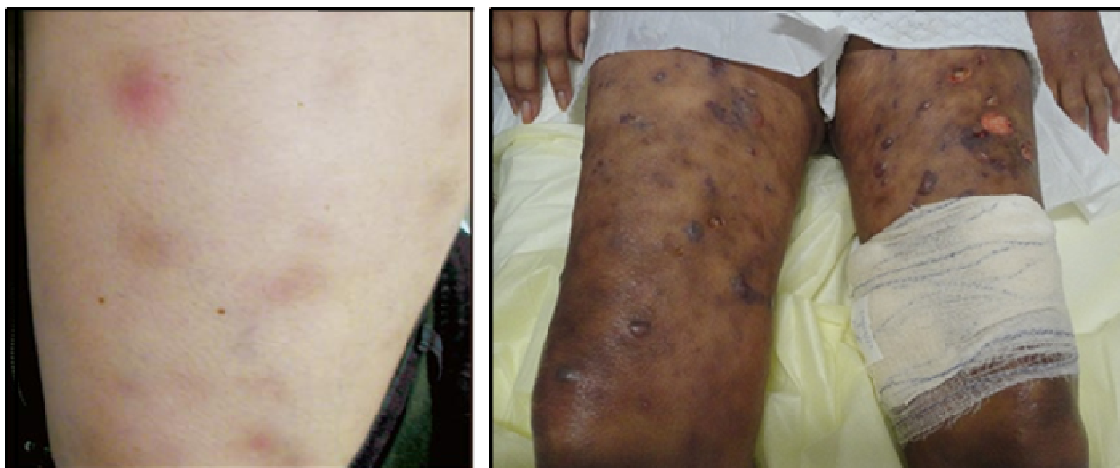


Figura 1.7. Lesões de pele de paciente com eritema nodoso hansênico (ASA - FIOCRUZ, 2014).

Uma das diferenças histológicas entre o ENH e forma LL é a infiltração de neutrófilos característica nas lesões do ENH. Em 2010, Lee *et al.* investigaram os mecanismos de recrutamento de neutrófilos no local da doença. O perfil de expressão gênica das lesões do ENH compreende ativação da via integrada de TLR2 e do receptor Fc, migração de neutrófilos e inflamação. Os principais aspectos desta via incluem: (a) FcR ou TLR2 induzem a liberação de IL-1 β ; (b) ativação do endotélio, incluindo a regulação positiva de E-selectina e subsequente ligação de neutrófilos; e (c) regulação positiva dos mediadores inflamatórios associados tanto com neutrófilos e monócitos / macrófagos (Lee *et al.*, 2010).

Em 2012, Adhe *et al* relataram que os neutrófilos estavam presentes tanto no infiltrado granulomatoso e / ou no interstício, com ou sem leucocitoclasia. Em algumas seções, eles também foram vistos invadindo a epiderme e os ductos das glândulas sudoríparas. Entretanto, a densidade do infiltrado neutrofilico foi variável. No ENH, foi observado ainda que nas lesões inicialmente mais graves estavam presentes infiltrados muito mais densos quando comparados com lesões menos graves e / ou antigas. A coleção densa de neutrófilos na epiderme e derme é provavelmente responsável pelo achado clínico de pústulas em lesões de ENH (Adhe, Dongre e Khopkar, 2012).

A presença de fibrina na parede do vaso foi o sinal mais comum observado, seguido de trombos de fibrina e neutrófilos na parede do vaso, em alguns casos. As

características histológicas da vasculite dependem da fase em que a lesão foi biopsiada. Uma lesão mais antiga terá infiltrado neutrofílico esparsos e predomínio de células mononucleares, enquanto uma lesão precoce apresentará predominantemente infiltrado neutrofílico com deposição de fibrina. A oclusão da lamina vascular com amplo envolvimento de vasos na parte inferior da derme e tecido subcutâneo estão envolvidos com processos que levam a necrose ou ulceração da lesão. As alterações vasculares foram mais prevalentes na derme superior e média do que no tecido subcutâneo, sendo a necrose e ulceração bastante incomuns no ENH (Adhe, Dongre e Khopkar, 2012).

O espectro histopatológico de vasculite varia de inchaço endotelial, infiltração neutrofílica da parede do vaso com destruição das paredes e leucocitoclasia (Palit e Inamadar, 2006); a deposição de fibrina nas paredes dos vasos e a formação de trombos no lúmen também podem ocorrer. As lesões iniciais do ENH mostram a presença de formas granulares e fragmentadas de bacilos (Job, Gude e Macaden, 1964; Mabalay *et al.*, 1965; Sehgal *et al.*, 1986). Em 1960, Ridley mostrou que a existência de uma preponderância granular sobre as formas sólidas nas lesões de ENH em comparação com as lesões LL sem reação, além de relatar que os bacilos se tornaram granular mais rapidamente antes do aparecimento do ENH (Ridley, 1960).

A imunidade celular está também envolvida na patogênese do ENH; de forma que a relação da proporção das células T CD4⁺ para T CD8⁺ encontra-se alterada de 2 para 1. Além disso, existe evidência do envolvimento das respostas do tipo Th1 e Th2, tanto nas lesões de pele como no soro (Sreenivasan *et al.*, 1998; Moraes *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 2000; Nath *et al.*, 2000; Teles *et al.*, 2002).

As citocinas TNF e IL-6 já foram caracterizadas por muitos autores no soro e nas lesões de pele de quase todas as reações (Sreenivasan *et al.*, 1998; Moraes *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 2000; Teles *et al.*, 2002). As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com ENH mostraram uma maior liberação de TNF comparada ao ENH inativo, RR e lesões LL (Barnes *et al.*, 1992).

O *M leprae* também estimula neutrófilos a secretarem TNF e IL8, aumentando a inflamação. Os níveis circulantes de TNF e interferon- γ (IFN- γ) encontram-se elevados nesses pacientes e a leucocitose periférica com presença de neutrófilos é um achado comum (Oliveira *et al.*, 1999; Legendre, Muzny e Swiatlo, 2012). Além disso, a proteína C reativa, proteína A amilóide e antitripsina alfa 1 também têm sido relatados como elevados no soro de pacientes com ENH (Kahawita e Lockwood, 2008)

Em 2010, Souza realizou um estudo composto por uma coorte com 118 pacientes, classificados como 66 LL, 15 BT, 08 BL, 08 BB, observou que o ENH ocorreu em 59,1 % dos pacientes LL; destes, 61,5 % mantiveram o ENH após o tratamento, embora o quadro tendesse a redução quase totalmente (80 %) no 1º ano pós-PQT. O ENH em pacientes LL variou em outros estudos de 25 % a 76,3 % (Souza, 2010; Silva, Griep, 2007; Gallo *et al.*, 1997; Gallo, Oliveira, 1997).

Em alguns pacientes (4,5 %), essas reações são prolongadas e agressivas causando grande morbidade, observando-se surtos de comprometimento do estado geral, febre, cefaleia, náuseas e vômitos com eclosão de lesões dolorosas contínuas, prolongando-se até o 4º semestre pós - PQT. Diferente das outras formas clínicas, dos pacientes LL que não tiveram reações durante o tratamento, 11 % desenvolveram após a cura (Souza, 2010).

O ENH deverá ser tratado como grave, diante da presença de qualquer um dos seguintes sinais: dor ou incômodo em um ou mais nervos, com ou sem perda de função; ulceração dos nódulos de ENH; dor ou vermelhidão nos olhos, com ou sem diminuição da acuidade visual; edema dolorido nos testículos (orquite) ou nos dedos (dactilite); artrite ou linfadenopatia acentuada (OMS, 2010).

1.10. Talidomida

A α -N-[ftalimido]-glutarimida, mais conhecida como Talidomida, é um análogo estrutural da glutetimida que foi sintetizada na Alemanha Ocidental, em 1953, nos laboratórios da Ciba, e depois pela empresa alemã Chemie Grunenthal, em 1954 (MS, 2014).

Dado seu excelente efeito sedativo e antiemético, e satisfeitos os padrões toxicológicos exigidos na época, a droga foi colocada no mercado sem exigência de prescrição médica, e utilizada por milhões de pessoas, em 46 países, incluindo o Brasil, convertendo-se em um dos fármacos mais populares da década de 50. Entretanto, em 1960, a Talidomida foi retirada do mercado devido à incidência de graves efeitos teratogênicos (Mazzoccoli *et al*, 2012; MS, 2014).

A Talidomida é um derivado do *ácido glutâmico* e estruturalmente contém dois anéis amida e um único centro quiral. Este composto existe na forma de mistura equivalente de dois isômeros ópticos S (-) e R (-) que se interconvertem rapidamente em

condições fisiológicas. O *enantiômero S* está relacionado com os efeitos teratogênicos da Talidomida, enquanto o *enantiômero R* é responsável pelas propriedades sedativas do fármaco (figura 1.8) (MS, 2014).

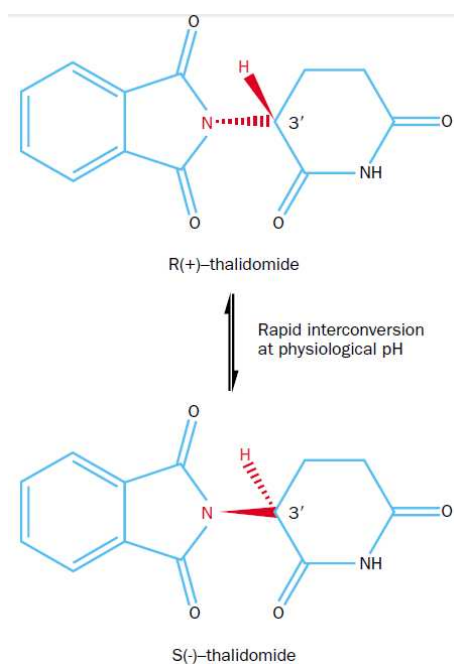


Figura 1.8. Estrutura dos enantiômeros da Talidomida (Frank, Macpherson, Figg, 2004).

Em 1965, o Dr. Jacob Sheskin, um dermatologista israelense, fez uma descoberta acidental ao administrar Talidomida em seus pacientes com hanseníase, devido às suas propriedades sedativas. Os pacientes com eritema nodoso hanseniano apresentaram melhora inesperada das lesões inflamatórias de pele e dos sintomas sistêmicos, logo após o início da terapia com o fármaco (Mazzoccoli *et al*, 2012). Em 1971, a OMS coordenou um ensaio clínico que comprovou a rápida melhora em número significativo de pacientes, levando à liberação do medicamento para tratamento do ENH, sob estrita regulação e precauções (WHO, 1988). Assim, a partir de estudos clínicos e da descoberta de suas aplicações terapêuticas, a Talidomida voltou a ser comercializada em alguns países, entre eles o Brasil.

Esses efeitos imunomoduladores da Talidomida desencadearam uma renovação de seu interesse, contribuindo para que outros pesquisadores começassem a utilizar o medicamento em doenças de base imunológica, bem como as que possuem manifestações dermatológicas, tais como o prurigo nodular, lúpus eritematoso discóide e sistêmico (Sheskin, 1975; Thomas *et al.*, 2000). Em 1998, a droga foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do ENH e, em 2006, para o

tratamento do mieloma múltiplo. Com isso, o *status* da Talidomida como uma “droga órfã”, contra-indicada durante a gravidez e amamentação, levou ao seu uso inovador em várias doenças inflamatórias que não respondiam aos tratamentos tradicionais, como é o caso do ENH (Mazzoccoli *et al.*, 2012).

1.10.1. Mecanismo de ação da Talidomida

Dentre suas propriedades, são notáveis as alterações nos níveis de TNF, uma importante citocina envolvida em diversos processos biológicos, tais como a apoptose e a resposta imune. Estudos *in vitro* demonstraram que a Talidomida inibe seletivamente a produção do fator de necrose tumoral (TNF) em monócitos humanos quando estes foram tratados com LPS e outros agonistas micobacterianos em cultura, acelerando ostensivamente a degradação dos transcritos do seu RNA mensageiro (Sampaio *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 1993; Sampaio *et al.*, 1993). Além disso, outros trabalhos sobre o efeito da droga mostraram que a mesma foi responsável pela redução dos níveis de TNF em macrófagos alveolares humanos (Tavares *et al.*, 1997), bem como no fluido cérebro espinhal, levando a uma diminuição de inflamação cerebral (Schoeman *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo* demonstraram que o pré tratamento com Talidomida, através da injeção intraperitoneal do fármaco em camundongos, e posterior estímulo com LPS, era responsável pela redução dos níveis de TNF (Moreira, Wang, *et al.*, 1997). Acrescenta-se, ainda, a atuação da Talidomida no bloqueio da replicação do HIV (Makonkawkeyoon *et al.*, 1993), na supressão da perda de peso associada a AIDS (Reyes-Teran *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 2000), na redução de úlceras aftosas orais (Jacobson *et al.*, 2001) e no aumento do ganho de peso em pacientes com infecção por *M. Tuberculosis*, concomitante ao HIV-1 (Klausner *et al.*, 1996).

Acrescenta-se, ainda, que a Talidomida tem se mostrado significativamente promissora no tratamento de vários distúrbios imunológicos, incluindo diarreia microsporidial (Sharpstone *et al.*, 1995), meningite bacteriana (Burroughs *et al.*, 1995; Schoeman *et al.*, 2000), doença crônica do enxerto contra o hospedeiro (Vogelsang *et al.*, 1992), doença de Crohn (Ginsburg, Hanan e Ehrenpreis, 2001) e choque séptico (Moreira, Wang, *et al.*, 1997).

Além disso, foi demonstrada sua atuação como supressora da angiogênese (D'amato *et al.*, 1994), possivelmente através da inibição da proliferação de células

endoteliais (Moreira *et al.*, 1999). Devido ao fato da angiogênese ser crítica para o crescimento da maioria dos tumores sólidos, a Talidomida foi testada para o tratamento de gliomas de alto grau de repetição, no qual demonstrou atividade significativa (Fine *et al.*, 2000), além de efetividade contra o mieloma múltiplo (Hideshima *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2001), outro câncer altamente dependente de TNF (Hideshima *et al.*, 2001). Dentre esses processos alterados pela Talidomida estão também relacionados com distúrbios de ordem maligna, entre eles: síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo e tumores sólidos, os quais constituem atualmente uma das mais fortes linhas de pesquisa para a adoção da droga como agente terapêutico (De Carvalho *et al.*, 2007).

O uso da Talidomida para tratamento de tumores já havia sido testado desde 1965; porém, o grande aumento de testes clínicos na área oncológica surgiu com o seu efeito anti-angiogênico (Thomas *et al.*, 2000). Entretanto, foi demonstrada que sua ação se limita a alguns tipos de câncer, sendo o Sarcoma de Kaposi, câncer de próstata, melanomas e mieloma múltiplo onde ocorrem as melhores taxas de resposta ao fármaco, mostrando que o efeito anti-angiogênico e anti-tumoral depende dos fatores envolvidos em cada tipo de tumor (Franks, Macpherson e Figg, 2004).

Nos casos de mieloma múltiplo, por exemplo, estudos pré-clínicos da Talidomida sugerem que a mesma age de várias formas. Dentre elas, o fármaco modula as interações adesivas e, portanto, pode alterar o crescimento e a sobrevivência das células tumorais e a sua resistência à droga; as citocinas secretadas no microambiente da medula óssea pelas células do mieloma e / ou pelas células estromais da medula óssea, tais como interleucina IL-6, IL-1 β , IL-10 e TNF podem aumentar o crescimento e a sobrevivência das células do mieloma, e a Talidomida pode alterar sua secreção e bioatividade. Além de diminuir a secreção do fator de crescimento endotelial vascular, da IL-6 e do fator de crescimento básico dos fibroblastos pelas células do mieloma e/ou pelas células estromais da medula óssea (Richardson, Hideshima e Anderson, 2002).

Nos casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a Talidomida suprime a replicação e diminui a carga viral, além de proporcionar melhoras em nível sistêmico, favorecendo o bem-estar do paciente, com redução da febre induzida pelo TNF, o mal-estar, a fraqueza muscular e a caquexia no paciente imunodeprimido (Makonkawkeyoon *et al.*, 1993).

O efeito da Talidomida em várias desordens imunológicas, como as descritas acima (Schuler e Ehninger, 1995; Zwingenberger e Wnendt, 1995; Klausner, Freedman e Kaplan, 1996), é mediado, muito provavelmente, através de sua atuação sobre a

modulação da produção de citocina. Além do TNF, o fármaco também demonstrou potente atividade imunomodulatória, principalmente devido a sua capacidade de alterar a secreção e atividade de várias citocinas, incluindo a redução da produção de IL-6 e IL-12 (Moreira, Tsenova-Berkova, *et al.*, 1997; Haslett *et al.*, 1998; Corral *et al.*, 1999; Haslett *et al.*, 1999; Lokensgard *et al.*, 2000); o aumento da produção de IL-10, induzida por LPS, em PBMC (Corral *et al.*, 1999); e a supressão da síntese de óxido nítrico (Lopez-Talavera *et al.*, 1996).

A supressão significativa da produção de TNF pela Talidomida também resultou na diminuição da expressão de várias moléculas de adesão da superfície celular, tais como ICAM-1, VCAM-1, L-selectina e E-selectina em células endoteliais (Nogueira *et al.*, 1994; Geitz, Handt e Zwingenberger, 1996). Estes efeitos gerais também foram sugeridos como sendo atribuídos parcialmente ao bloqueio da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB), pela Talidomida por meio da supressão da atividade da quinase IkappaB (Keifer *et al.*, 2001). O NF-kB é um fator de transcrição envolvido em muitos processos fisiológicos, como a regulação de genes relacionados com a inflamação (TNF, IL-6, IL-8 e IL-2), e de genes envolvidos na apoptose (BIRC3 e membros da família Bcl-2), e em fatores angiogênicos (VEGF) ((Sampaio *et al.*, 1991; Majumdar, Lamothe e Aggarwal, 2002)

Ao mostrar que a Talidomida suprime a ativação de NF-kB induzida por TNF em células Jurkat, Majumdar *et al.* sugeriram que tais modulações podem contribuir para o papel do fármaco na supressão da proliferação, inflamação, angiogênese e sistema imune (Majumdar, Lamothe, Aggarwal, 2012). Além disso, a Talidomida também pode atuar por via de co-estimulação de células T CD8⁺ humanas, o que resulta na produção aumentada de IL-2, IL-12 e IFN- α . A IL-2, por sua vez aumenta a proliferação de células T, enquanto a IL-12 e IFN- α ativam as células killers para eliminar as células cancerosas (Davies *et al.*, 2001; Kawamata *et al.*, 2006). Estes aspectos demonstram a sua atividade imunomoduladora, o que difere da ação de simples anti-inflamatórios; dessa forma, o contexto do seu uso é fundamental para determinar sua atividade biológica, embora a mesma atue, na maioria dos casos, reduzindo a atividade inflamatória.

A inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares também foi um avanço considerável para o entendimento da ação da Talidomida, que embora pudesse ser correlacionado com a inibição de TNF, forneceu indícios para a descrição de outras ações do fármaco, como a redução de receptores para integrina, além de diminuir a

produção de IgM; alterar as razões de células T CD4 / CD8; e / ou inibir processos de angiogênese e ativação celular. Entretanto, a proliferação de linfócitos parece não ser afetada pela Talidomida (Faure, Thivolet e Gaucherand, 1980).

Os efeitos da Talidomida também podem ser atribuídos à redução na estabilidade de mRNA de genes pró-inflamatórios como o TNF (Moreira *et al.*, 1993) e COX-2 (Moreira *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 2007); da inibição eixo fosfatase PTEN – proteína quinase akt (proteína quinase B) (Knobloch *et al.*, 2008) e mais recentemente pela inibição da formação de um complexo ubiquitina ligase E3, através da interação direta com a proteína CRBN (Ito *et al.*, 2010).

Análises com microarranjos de DNA para identificar o impacto da Talidomida na expressão gênica em células PBMCs humanas após a estimulação com LPS demonstraram que a droga não atua diretamente na expressão gênica de citocinas inflamatórias. Entretanto, a mesma é capaz de modular genes precursores do processo de inflamação. Além desses processos, foi observada a baixa expressão de genes relacionados à morfogênese dos vasos sanguíneos, como por exemplo, a angiopoietina 1 (ANGPT1), o que pode explicar as propriedades anti-angiogênicas da droga (Paiva *et al.*, 2012; Gupta e Qin, 2003).

1.11. A Talidomida e o Eritema Nodoso Hansênico

A Talidomida é a terapia de primeira linha para o ENH - moderado a grave – e ENH recidivante, e pode ser utilizada para a supressão e prevenção da doença cutânea (Teo *et al.*, 2002); entretanto, sua teratogenicidade torna o seu uso restrito.

Uma característica da Talidomida é a resposta clínica no tratamento do ENH, acompanhada por uma rápida redução no número de neutrófilos nas lesões (Sheskin e Convit, 1969) e inibição das citocinas pró - inflamatórias (Moreira *et al.*, 1993; Van Crevel *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2007).

Entre os vários mecanismos de ação descritos para a Talidomida, encontram-se a inibição da produção de TNF, a estimulação da produção de IL – 2 por células T, além da inibição de recrutamento de neutrófilos (Moreira *et al.*, 1993; Haslett *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010).

A eficácia da Talidomida no ENH está associada com a redução nos níveis circulantes da citocina pró-inflamatória TNF (Sampaio *et al.*, 1993). Esta ação pode

estar relacionada à capacidade do fármaco em reduzir os sintomas locais e sistêmicos deste episódio reacional, e reduzir o número de neutrófilos e células T CD4 nas lesões (Anvisa, 2015).

Além da reação hansênica clássica completa, todos os equivalentes reacionais (iridociclite, orquiepididimite, adenite, neurite) beneficiaram-se da terapêutica, embora em intensidade e prazos variáveis. Sintomas como redução da febre, das lesões cutâneas, da leucocitose, das artralguas também são indicativos da resposta terapêutica à Talidomida em pacientes com ENH. A curto prazo, foi observada uma melhoria em 52% dos pacientes que receberam 100 mg, quatro vezes por dia, em um ensaio duplo-cego, randomizado em comparação com aspirina (Iyer *et al.*, 1971). As respostas foram observadas em 70 – 80 % dos pacientes que receberam Talidomida *versus* 25 % em outros ensaios placebo-controlados, e doses de manutenção de 25 - 100 mg por dia têm se mostrado igualmente eficazes após o controle dos sintomas iniciais (Teo *et al.*, 2002).

Os resultados de uma revisão de 15 anos de experiência, em mais de 4000 pacientes com ENH e tratados com Talidomida, mostraram que 99 % dos indivíduos responderam ao tratamento como fármaco em 24 - 48 h (Sheskin, 1980). Entretanto, cabe ressaltar que a Talidomida não possui ação antibacteriana ou antifúngica. Assim, a sua utilidade clínica parece dever-se às suas propriedades contra a inflamação e moduladora sobre o sistema imunológico (Anvisa, 2015).

Entretanto, vale ressaltar que a Talidomida é um medicamento de uso controlado, e sua utilização exige uma série de medidas de controle, a exemplo de produção, prescrição e dispensação, de acordo com a Lei nº 10.651, de 16 de abril de 2003 e a Resolução – RDC nº 11, de 22 de março de 2011, RDC 24, de 12 de abril de 2012, pelos seus efeitos teratogênicos comprovados (MS, 2014). Atualmente, sua produção está sob a responsabilidade do laboratório oficial da Fundação Ezequiel Dias (Funed), no Estado de Minas Gerais. A prescrição está condicionada a rígidos critérios e deve ser realizada por meio de Notificação de Receita de Talidomida, acompanhada do Termo de Responsabilidade / Esclarecimento (MS, 2014). A distribuição que acontece em âmbito local implica assistência farmacêutica efetiva que oriente e monitore a sua entrega, utilização, resultados e devolução / descarte apropriados.

No Brasil, o fármaco está proibido para mulheres grávidas e sob rígido controle para mulheres em idade fértil, tendo em vista que a ingestão de um único comprimido durante a gestação pode ocasionar síndromes no feto, como: focomelia (aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco, tornando-o semelhante à forma externa da

foca), amelia (ausência completa de braços e / ou pernas e ainda ausência ou malformação dos dedos das mãos e dos pés), além de provocar alterações dos membros superiores e inferiores, defeitos visuais, auditivos, na coluna vertebral e, em casos mais raros, defeitos cardíacos e no tubo digestivo. Além disso, os pacientes do sexo masculino deverão ser orientados pelo prescritor quanto ao uso de preservativo masculino, durante todo o tratamento com o fármaco e após 30 dias de seu término (§ 4º do art. 19 da RDC nº 11, de 22 de março de 2011) (MS, 2014).

2. Justificativa

Os estados reacionais são a principal causa de lesões dos nervos e de incapacidades físicas provocadas pela hanseníase. Em vista disso, é importante que o diagnóstico dos mesmos seja feito precocemente, a fim de que o tratamento da doença tenha início imediato e sua cadeia de transmissão seja interrompida.

O Eritema Nodoso Hansênico é acompanhado por sintomas sistêmicos com alterações no estado geral de saúde do paciente, como por exemplo: fadiga, fraqueza, febre, dores nas articulações e perda de peso. A presença de nódulos dolorosos de curso subagudo pode ocorrer principalmente nos membros inferiores, e ocasionalmente no tronco. O ENH se desenvolve em torno 50 % dos pacientes com hanseníase lepromatosa e pode ocorrer diversas vezes ao longo do curso da doença. Dessa maneira, diversas dúvidas persistem, principalmente a respeito do mecanismo responsável por desencadear o ENH e os fatores que contribuem para sua cronicidade, uma vez que em diversos casos o tratamento imunomodulador deve ser mantido por longos períodos.

Atualmente a Talidomida representa a droga de primeira escolha no manejo do ENH agudo e recorrente. As propriedades anti-angiogênicas e anti-inflamatórias deste fármaco, bem como os mecanismos moleculares envolvidos, não estão completamente elucidados na hanseníase, tendo em vista que a maioria dos estudos foi realizada em diferentes tipos de câncer. Dessa forma, levando em consideração as diversas aplicações da Talidomida, informações que venham a elucidar sua atividade imunomoduladora no ENH também poderiam ser transpostas para outras patologias.

Acrescenta-se, ainda, que o estudo de expressão gênica global utilizando a técnica de microarranjo representa uma importante ferramenta de análise, devido a possibilidade de investigar um grande número de genes simultaneamente. Além disso, estudos de avaliação do perfil de expressão gênica em doenças como mieloma múltiplo ou câncer de mama possibilitaram a descoberta de alvos para diagnóstico, estratificação, bem como predição e comportamento prognóstico ao tratamento (Zhan, Barlogie e John D, 2007).

Em suma, a utilização do microarranjo na compreensão da imunopatogênese do ENH possui um valor relevante, tendo em vista se tratar de uma doença sem modelo animal ou *in vitro*. Nosso estudo pode promover novas descobertas de alvos moleculares que favorecem não apenas uma melhor compreensão da imunopatogênese

do ENH, podendo contribuir para um melhor diagnóstico e prognóstico da doença, bem como a busca de novos alvos terapêuticos. Outro ponto de vista muito importante é a melhor compreensão da ação da Talidomida não apenas no ENH, como nas demais patologias na qual a mesma é empregada.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Melhorar o entendimento da imunopatogênese do ENH, através da validação de alvos moleculares modulados negativamente pela ação da Talidomida, detectados através de microarranjo previamente realizado, em lesões de pele de pacientes ENH após o uso do fármaco.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Selecionar um grupo de genes dentre os negativamente expressos, levando em consideração as funções biológicas e o quadro de sintomas e sinais do ENH;
- 3.2.2. Correlacionar as alterações morfológicas da pele observadas antes e após a Talidomida com o quadro clínico, através da técnica de imunohistoquímica;
- 3.2.3. Avaliar a expressão dos genes previamente selecionados nas lesões antes e após o tratamento, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real, a fim de confirmar os resultados obtidos pelo microarranjo;
- 3.2.4. Avaliar a expressão proteica relacionada aos genes selecionados, através de *Western Blotting*, para validação dos resultados obtidos pelo microarranjo;
- 3.2.5. Utilizar a técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão protéica no contexto das alterações histopatológicas.

4. Materiais e métodos

4.1. Infraestrutura física / Tecnologia

A parte experimental foi realizada em sua maior parte no próprio Laboratório de Hanseníase (LAHAN, FIOCRUZ – RJ), utilizando a infraestrutura física já estabelecida no mesmo. O atendimento dos pacientes e a coleta das amostras foram realizados no Ambulatório Souza Araújo (ASA, FIOCRUZ-RJ), centro de referência nacional - com acreditação internacional - para atendimento de pacientes com hanseníase. Os ensaios de microarranjo foram realizados em colaboração com o *Laboratory of Clinical and Infectious Diseases* do *National Institutes of Health* (NIH - USA), responsáveis pelo fornecimento do suporte técnico-científico para elaboração dos ensaios e análise de dados, mediante intermédio do Dr. Frank de Leo e Dra. Elizabeth Sampaio.

4.2. Biossegurança e permissão ética

Todas as amostras foram manipuladas de acordo com as normas preconizadas para a manipulação de material biológico. A participação de cada indivíduo neste estudo foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº. 643/11), no qual os mesmos foram informados dos riscos e benefícios, além da confidencialidade do estudo.

No sentido de garantir a proteção e o bem-estar dos indivíduos incluídos neste trabalho, não foi citado o nome de qualquer um dos participantes.

4.3. População estudada

O estudo compreendeu um total de 10 pacientes do sexo masculino, diagnosticados clínica e histopatologicamente com ENH, no qual segundo as diretrizes do Ministério da Saúde, foram administradas 300 mg / dia de Talidomida, por um período de 1 semana, mediante acompanhamento clínico.

Os pacientes do sexo feminino, com idade inferior a 18 anos, portadores de diabetes, infecções causadas por outras micobactérias e aqueles coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana foram excluídos deste estudo.

Para classificação das formas clínicas adotou-se os critérios da rotina do ASA, que consistem em exame dermatológico, pesquisa de BAAR em esfregaço cutâneo e histopatologia. Foi caracterizada como reação tipo II, ou eritema nodoso hansênico, a presença de nódulos eritematosos, dolorosos espontaneamente ou à palpação, isolados ou associados a manifestações sistêmicas (Nery *et al.*, 2006).

4.4. Obtenção e processamento das amostras biológicas

As amostras de pele foram coletadas no ASA, pelo dermatologista, no momento do diagnóstico do ENH e após sete dias de tratamento com Talidomida. Os dados clínicos foram obtidos através dos prontuários dos pacientes. O intervalo entre as consultas foi semanal, de modo que a evolução clínica dos pacientes também pôde ser analisada. A evolução clínica foi avaliada de forma padronizada, pelo mesmo dermatologista, buscando sinais e sintomas sistêmicos, comprometimento de nervos periféricos e avaliação macroscópica das lesões.

Um fragmento do centro da lesão de ENH foi coletado com *punch* de 6 mm de diâmetro. As biópsias coletadas foram divididas para avaliação histológica, através da coloração com Hematoxilina-Eosina (alterações morfológicas) e coloração de Wade (identificação de BAAR) (Moura *et al.*, 2012); e posterior marcação por imunohistoquímica, além de extração de RNA e proteína.

4.5. Expressão gênica global

Este trabalho é um desdobramento de outro já em atividade no laboratório, apoiado pela CAPES através do edital CAPES-SUS, do Programa Nacional de Pós-Doutorado em Saúde - PNPDS, intitulado como: *Identificação de possíveis alvos terapêuticos para o tratamento do Eritema Nodoso Leproso: perfil de expressão gênica nas lesões reacionais antes e após tratamento com a Talidomida e descrição de funções biológicas envolvidas*. No decorrer do projeto foi executado um experimento de microarranjo de lesões de pele biopsiadas pareadas de 4 pacientes, sendo 4 durante o ENH e as outras 4 após uma semana de tratamento com Talidomida 300 mg / dia.

O perfil de expressão gênica foi obtido através da infraestrutura da plataforma de microarranjo da *Vanderbilt University* (TN - USA), através de uma colaboração com o *Laboratory of Clinical and Infectious Diseases – NIH – USA* (por intermédio da Dra.

Elizabeth Sampaio e Dr. Frank de Leo), utilizando o chip Affymetrix, U133Plus2, *H. sapiens*, cobrindo 54.675 sondas, incluindo duplicatas e controles, que representam 20.121 genes únicos, que puderam ser testados simultaneamente. Para esses experimentos, 2 a 2,5 µg de RNA obtido de lesões de pele biopsiadas foram utilizados para a confecção do microarranjo. Biópsias obtidas de pacientes em condições semelhantes foram utilizadas como replicatas biológicas (mínimo de 3) para posterior análise dos dados. Para a confecção das lâminas do microarranjo, as amostras dos mesmos pacientes, em momentos diferentes, foram confrontadas de forma pareada.

4.6. Análise dos dados do microarranjo

A análise primária dos dados foi feita utilizando o programa da *Affymetrix Expression Console*. O nível de expressão para cada sonda foi determinado e o logaritmo (base 2) dos sinais gerados foi utilizado para normalização e redução da variabilidade.

Os valores de *fold change* ENH vs. 1 semana de tratamento foram calculados, obtendo valores positivos indicando os genes com expressão reduzida com o uso da Talidomida. As médias das intensidades dos sinais normalizados nas amostras “teste” e “controle” em cada experimento repetido foram comparadas e analisadas através do teste one-way utilizando o software GeneSpring 6.0.

Após normalização dos dados, das 54675 sondas, filtramos 1556 que obedecessem ao critério de possuir o $p \leq 0,01$, considerados significativos, bem como *fold change* ≥ 2 (redução na expressão após tratamento) ou ≤ -2 (aumento na expressão após tratamento). A partir desta lista chegamos a 894 genes únicos reduzidos e 412 aumentados.

O enriquecimento da lista de genes foi realizado através da plataforma online disponibilizada pelo NIH, DAVID v 6.7 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*- <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), onde utilizamos os 100 principais genes reduzidos.

Os genes superexpressos após o tratamento não foram considerados nesta etapa de análise, uma vez que estudos preliminares indicaram não haver processos biológicos estatisticamente significativos quando seguimos a mesma abordagem.

Seguimos as orientações da própria plataforma para as análises, porém alguns parâmetros foram alterados durante o processo. Trabalhamos em parceria com o Dr.

Flavio Nobre, COPPE - UFRJ, para a realização do tratamento matemático e das análises estatísticas referentes ao microarranjo.

4.7. Análise de vias de sinalização e enriquecimento dos dados do Microarranjo

Através da análise de processos biológicos (Gene Ontology – GO – Biological Process – BP) realizada na plataforma digital DAVID, identificamos um total de 174 processos biológicos, sendo que 27 desses processos biológicos apresentavam $p < 0,01$ com a participação de 88 genes (Tabela 2). O processo biológico com maior significância estatística identificada foi o de resposta imune, contando com 17 genes (*CLEC5A*, *CD1D*, *FCGR3B*, *S100A7*, *GALNT2*, *AQP9*, *CCR2*, *GBP5*, *IL7R*, *LILRB2*, *PTX3*, *PTPRC*, *RSAD2*, *RGS1*, *SLC11A1*, *THBS1*, *TLR1*) e $p=7,0E-6$.

GO Pathway	Genes na Lista/Genes na Via	P Valor
GO:0006955 - immune response	17/690	7,03E-06
GO:0009611 - response to wounding	13/530	1,41E-04
GO:0006952 - defense response	14/615	1,44E-04
GO:0001817 - regulation of cytokine production	8/181	1,62E-04
GO:0001775 - cell activation	9/287	5,10E-04
GO:0002440 - production of molecular mediator of immune response	4/31	0,001014
GO:0000041 - transition metal ion transport	5/71	0,001117
GO:0007155 - cell adhesion	13/700	0,001679
GO:0022610 - biological adhesion	13/701	0,001699
GO:0002252 - immune effector process	6/134	0,001707
GO:0002683 - negative regulation of immune system process	5/83	0,001992
GO:0001819 - positive regulation of cytokine production	5/90	0,002678
GO:0009968 - negative regulation of signal transduction	7/221	0,002986
GO:0048585 - negative regulation of response to stimulus	5/100	0,003915
GO:0030098 - lymphocyte differentiation	5/103	0,00435
GO:0045321 - leukocyte activation	7/242	0,004654
GO:0042445 - hormone metabolic process	5/106	0,004817
GO:0010648 - negative regulation of cell communication	7/248	0,005237
GO:0002822 - regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	4/55	0,005296
GO:0002819 - regulation of adaptive immune response	4/56	0,00557
GO:0006968 - cellular defense response	4/61	0,007068
GO:0048754 - branching morphogenesis of a tube	4/65	0,008422
GO:0030217 - T cell differentiation	4/65	0,008422
GO:0042592 - homeostatic process	12/751	0,008529
GO:0016477 - cell migration	7/276	0,008689
GO:0042110 - T cell activation	5/126	0,008811
GO:0046649 - lymphocyte activation	6/199	0,009144

Tabela 2 – Processos biológicos identificados como negativamente modulados, a partir da análise da expressão gênica global, em lesões de ENH regredidas após uma semana de tratamento com Talidomida.

Também é possível notar que a resposta a ferimentos (*response to wounding*) foi o segundo processo com maior significância estatística; no qual, observamos 13 dos nossos genes (*CCR2, NRPI, PLSCR1, PTX3, S100A8, SAA1, SERPINE1, SLC11A1, THBD, THBS1, TLR1, TNC, VCAM1*) e $p=1,4E-04$. O processo de adesão celular (*cell adhesion*) também aparece entre os 10 principais processos biológicos com a participação de 13 genes (*ADAM12, COL12A1, CYR61, FERMT2, ITGB1, ITGB1P1, LAMB1, NRPI, PLXNC1, PTPRC, PCDH17, TNC, THBS1, VCAM1*) e $p=0.001679$.

Quando submetidos à análise de vias de sinalização, utilizando o banco de dados KEGG na plataforma DAVID, identificamos somente duas vias com $p<0,1$, *ECM-receptor interaction* (interação de matriz extracelular e receptores - 4 genes: *ITGB1, LAMB1, TNC* e *THBS1*; $p=0,031$) e *Primary immunodeficiency* (imunodeficiência primária - 3 genes: *JAK3, IL7R* e *PTPRC*, $p=0,033$).

Também procedemos com uma análise integrativa dos nossos dados através da comparação da nossa lista de 894 genes regulados negativamente após tratamento com Talidomida e uma lista de genes modulados positivamente durante o ENH, publicada anteriormente em colaboração com nosso grupo (Lee *et al.*, 2010). Através do mesmo corte de *foldchange* e *p* valor ($foldchange \geq 2$ e $p \leq 0,01$), obtivemos uma lista com 2013 genes positivamente modulados nas lesões de ENH em comparação com lesões LL não reacionais. Sobrepondo nossa lista de 894 genes com a nova lista gerada, obtivemos 202 genes compartilhados, conforme o diagrama de Venn a seguir (figura 4.7).

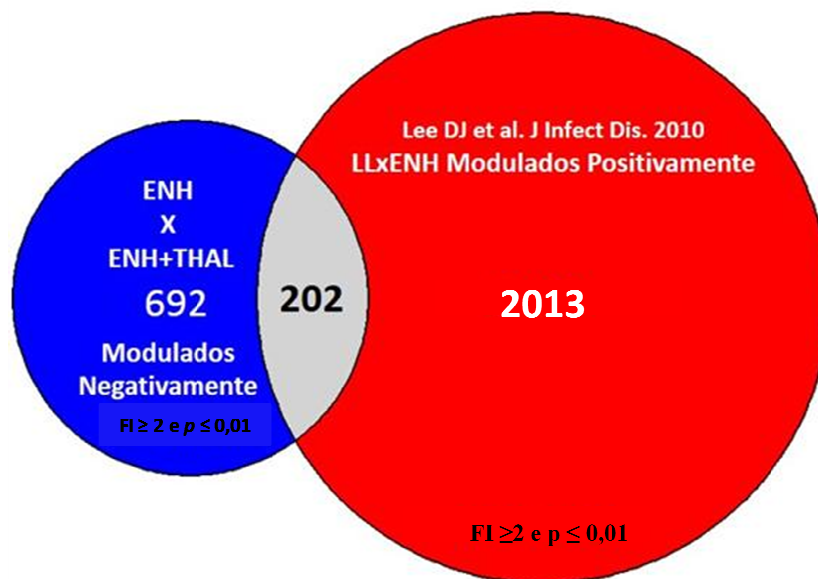


Figura 4.7 Diagrama de Venn mostrando a sobreposição entre genes reduzidos em lesões após tratamento com Talidomida e genes aumentados durante o ENH.

4.8. Seleção dos genes utilizados no estudo

Para seleção dos genes a serem testados, consideramos a posição ocupada pelos mesmos em relação a sua expressão reduzida após tratamento com a Talidomida, funções biológicas descritas na literatura e correlação com os fenômenos ocorridos no ENH (inflamação, angiogênese, migração de células imunes). Selecionamos genes representativos da composição: tenascina C (TNC) e molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) e remodelamento da matriz extracelular: desintegrina e metaloproteinase 12 (ADAM12) e metaloproteinase 1 (MMP1); do tipo celular presente na lesão (CD16); vias de sinalização e componentes de regulação do processo inflamatório: proteína supressora de sinalização da citocina 3 (SOCS3) e caspase 1 (CASP1); e moléculas solúveis envolvidas na ativação e migração celular: proteína rica em cisteína 1 (CYR61), trombospondina 1 (THBS1) e pentraxina 3 (PTX3).

Além disso, também levamos em consideração os principais genes presentes na análise integrativa, na qual comparamos nossos dados com outro microarranjo já publicado, onde foram identificados os genes super expressos no ENH em comparação com lesões lepromatosas (Lee *et al.*, 2010).

Símbolo dos Genes	Top100	Análise Integrativa	FoldChange
MMP1	1	SIM	74,97
PTX3	3	SIM	16,89
SOCS3	4	NÃO	15,73
VCAM	7	SIM	13,85
CYR61	9	NÃO	11,19
TNC	10	SIM	10,24
THBS1	11	SIM	9,54
FCGR3A/B (CD16b)	24	SIM	5,47
CASP1	46	NÃO	4,32
ADAM12	55	SIM	4,18

Tabela 3. Seleção de genes utilizados no estudo e seus critérios combinados. Todos os genes selecionados estão entre os 100 principais reduzidos identificados pelo microarranjo e ranqueados pelo valor de *Fold Change* (valor que representa quantas vezes o gene se encontra alterado em relação ao controle – ex. a expressão gênica de MMP1 foi reduzida em 74,97 vezes após o tratamento com Talidomida).

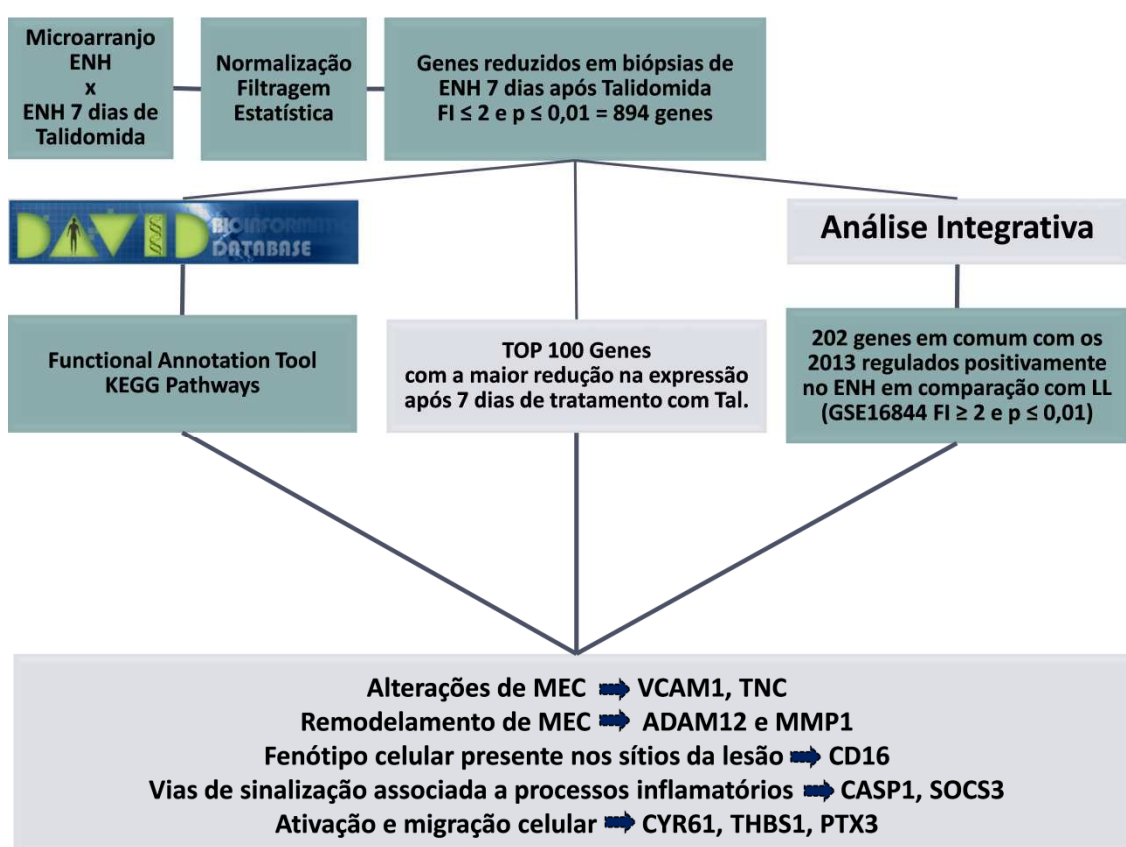


Figura 4.8. Esquema representativo da seleção dos genes através dos dados gerados pelo microarranjo, previamente obtido (Colaboração LAHAN - Fiocruz e NIH - USA).

4.9. Extração de RNA total

Para a obtenção do RNA total, derme e epiderme derivadas das lesões biopsiadas foram processadas, utilizando 2 mL de reagente TRIzol[®] (Life technologies, USA), com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (POLYTRON[®] PT-3100D - Kinematica AG).

Em seguida, as amostras em TRIzol[®] foram transferidas para microtubos e o RNA extraído segundo as instruções do fabricante. Para isso, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo de 1,5 mL, livre de DNase / RNase, para cada 1 mL de TRIzol[®], e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL propriamente identificados, contendo 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) para cada 1 mL de TRIzol[®] adicionado no início; os mesmos foram misturados por inversão e incubados a -70° C, por no mínimo 30 minutos. A fase orgânica foi armazenada a -70° C para posterior extração de proteína.

Após o período de incubação, os tubos foram mantidos por 10 minutos em temperatura ambiente, e então centrifugados a 12000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 1 mL de etanol 75% através de centrifugação a 7500 x g por 5 min a 4° C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 20 min e, posteriormente, ressuspensos em 10 µL de água destilada ultrapura, livre de DNase / RNase (Life Technologies, USA).

4.9.1. Quantificação e pureza do RNA

A quantificação e avaliação de pureza do RNA extraído anteriormente foi realizada por espectrofotometria, utilizando o instrumento NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo scientific, USA). Inicialmente foi lido 1 µL de água destilada ultrapura, livre de DNase / RNase (Life Technologies, USA) para determinar o “branco”. Em seguida, 1 µL de cada amostra foi lido contra o “branco” no comprimento de onda de 260 nm. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: $A_{260/280}$ indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto $A_{260/230}$ indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram

consideradas com alto grau de pureza quando as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ apresentaram valores $> 1,8$.

4.9.2. Análise da integridade do RNA

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de agarose (Life technologies, USA) 1,2 % em tampão MOPS 1 X (Sigma-Aldrich, USA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se 200 ng de RNA a 35 % formamida, MOPS 1 X, 0,125 % de corante azul de bromofenol e 1 μ L de SYBR[®] Green II 100 X (Life technologies, USA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho seco a 65° C por 15 minutos e depois aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de fotodocumentação (L-Pix touch, Locus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S) e ausência de rastros de RNA no gel.

4.10. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

4.10.1. Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir de 1 μ g de RNA total, extraído anteriormente, adicionado a reação de síntese de cDNA, com o uso do kit SuperScript III[®] First-Strand Synthesis SuperMix para RT-PCR em tempo real (Life Technologies, USA). Seguindo o protocolo do fabricante, 1 μ g de RNA acrescido de 1 μ L de de Oligo(dT)₂₀ (50 μ M), 1 μ L de Anneling Buffer e H₂O em quantidade suficiente para completar 8 μ l de volume final, foram incubados a 65° C por 5 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram mantidas em gelo, por pelo menos 1 minuto.

Em um segundo momento, foram adicionados 10 μ L de 2 X First-Strand Reaction Mix e 2 μ L de SuperScript[®] III/RNaseOUT[™] Enzyme. Essa mistura foi incubada a 50° C por 50 minutos para transcrição, seguida de incubação a 85° C por 5 minutos para inativação da enzima. Após o período de incubação, as amostras foram mantidas em gelo, por pelo menos 1 minuto e posteriormente armazenadas a -20° C até posterior uso.

4.10.2. RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR)

Para análise da expressão gênica, a reação de RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o reagente TaqMan[®]Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Para o RT-PCR em tempo real foram utilizadas amostras de cDNA, obtidas anteriormente, na concentração de 10 ng por reação. Para isso, a reação de PCR foi realizada com volume final de 10 µL, onde foram adicionados 1 µL de cada cDNA, 3,5 µL de água destilada ultrapura, livre de DNase / RNase (Life Technologies, USA) e 5 µL de TaqMan[®]Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems). Para cada amostra foram amplificados os genes de interesse e o gene constitutivo GAPDH (Hs99999905_m1) (Life Life Technologies, USA). As reações foram incubadas no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus[®] (Applied Biosystems, USA) e submetidas a ciclos de 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95° C por 1 segundo e 60° C por 20 segundos.

Para os ensaios acima, os seguintes ensaios TaqMan[®] foram utilizados: SOCS3 (Hs02330328_s1), VCAM1 (Hs00171642_m1), MMP1 (Hs00899658_m1), TNC (Hs01115665_m1), ADAM12 (Hs01106101_m1), THBS1 (Hs00962908_m1), PTX3 (Hs00173615_m1), FCGR3A (Hs00275547_m1), CYR61 (Hs00155479_m1), CASP1 (Hs00354836_m1) (Life Life Technologies, USA).

4.10.3. Análise dos dados obtidos a partir de RT-PCR em tempo real

A análise da expressão gênica relativa foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Inicialmente foi calculado o ΔC_T , subtraindo-se os valores de C_T (do inglês *threshold cycle*, limiar do ciclo) de cada gene alvo pelos valores de C_T do gene normalizador, o controle endógeno GAPDH (Life Technologies, USA). Uma vez determinado o ΔC_T das amostras, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta CT}$, referente a cada gene alvo.

4.11. Extração de proteínas pelo método de TRIzol®

A extração de proteínas pelo método de TriZol® foi realizada como descrito por (Hummon *et al.*, 2007). Resumidamente, foi realizada a separação da fase de RNA e a precipitação do DNA das amostras com TriZol®, como descrito pelo fabricante. A fase fenol-etanol restante de cada amostra foi colocada em uma membrana de celulose (Snake skin dialysis tubing MWCO 3,5k, Thermo Scientific, USA) com auxílio de clamps apropriados, e submetida a um processo de três etapas de diálise em solução de SDS 0,1 % a 4° C: por 16 horas, 4 horas e 2 horas, respectivamente. Após esse procedimento, a massa globular (visível) de cada amostra foi coletada, transferida para um tubo novo e centrifugada por 20 minutos a 6000 x g a 4° C. Em seguida o pellet foi ressuspenso e homogeneizado em 100 µl de solução de Tris - HCl 1M, uréia 8 M, pH 8, até sua dissolução completa.

4.11.1. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas obtida das biópsias foi aferida pelo método de Bradford (Bradford, 1976), através do reagente Bradford (Sigma-Aldrich, USA). Para elaboração da curva padrão foi utilizada albumina sérica bovina (BSA) em tampão salino, variando entre 0,1 - 1,4 mg / mL. Em uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-one, Brasil) foi aplicada a curva padrão (diluição seriada: 0,1µg / µL a 1µg / µL), água destilada como branco (10 µL / poço), e as amostras diluídas 10 x (1 µL / poço de amostra e 9 / poço µL de H₂O). Em seguida, em cada poço, foram adicionados 200 µL do reagente Bradford e a placa foi submetida a homogeneização em um agitador por aproximadamente 30 segundos. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram analisados pelo software SoftMax® data acquisition and analysis (Molecular Devices, USA).

4.12. Western Blotting - corrida, transferências e incubações

Após as dosagens pelo método de Bradford, 30 µg das proteínas extraídas das biópsias foram diluídas em tampão de amostra (10 % glicerol, 5 % 2 – mercaptoetanol,

2 % SDS, 0,06 M Tris - Hcl, pH 6,8 e azul de bromofenol); em seguida, as proteínas presentes nos lisados celulares foram desnaturadas em banho seco a 100°C por 5 minutos.

As amostras desnaturadas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida - SDS 12 % e a corrida foi realizada em tampão constituído por 25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1 % de SDS, a 120 V em cuba de eletroforese (Bio-Rad, USA) por 90 minutos.

O gel contendo as proteínas que migraram durante a corrida e uma membrana de nitrocelulose (GE, São Paulo, Brasil) foram montados no suporte da cuba de transferência. O sanduíche montado contendo: esponja, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel filtro e esponja, foi então colocado na cuba de transferência (Bio-Rad, USA), juntamente com o tampão constituído de 25 mM de Tris; 192 mM de glicina; metanol 10 %. A transferência foi realizada utilizando corrente de 100 V durante 1 hora.

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de *Rouge Ponceau* para a confirmação da transferência e identificação do padrão de massa molecular e, posteriormente, descoradas por lavagens com solução de TBS / T (10 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; Tween-20 0,05 %). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em solução de bloqueio (5 % de BSA em TBS / T 1X 0,15 % Tween) por 1 hora e incubadas *overnight* com os anticorpos primários monoclonais anti - TNC (ab108930, Abcam, USA) na diluição de 1:1000, anti - VCAM1 (ab134047, Abcam, USA) na diluição de 1:2000, anti - CD16 (ab183354, Abcam, USA) na diluição de 1:1000, anti - MMP1 (ab52631, Abcam, USA) na diluição de 1:500, PTX3 (LS-C140141, LSBio, USA) na diluição de 1:2000, TNF na concentração de 2 µg / ml (MAB210, R&D Systems, USA), em 1 % de BSA em TBS / T 1 X 0,15 % Tween.

Após esta incubação, as membranas foram lavadas por três vezes com TBS / T 1X 0,15 % Tween durante 10 a 15 minutos e logo em seguida, foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários anti - IgG de coelho conjugado à peroxidase (P0448, Dako Cytomation, Dinamarca) diluído 1 : 2000 em 1 % de BSA em TBS/T 1 X 0,15 % Tween, ou anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (P0447, DakoCytomation, Dinamarca) diluído 1:2000. As membranas foram lavadas três vezes com TBS / T por 10 minutos e reveladas em cassete de revelação.

A detecção das bandas foi realizada adicionando-se sobre a membrana 1 mL do substrato quimioluminescente *Western blotting* Luminol (Santa Cruz, USA). Em seguida, em câmara escura, a membrana foi exposta a um filme radiográfico X (X-

OMAT LS; Kodak, NY, USA) por diversos períodos de tempo, e o filme foi revelado após imersão em solução reveladora e solução fixadora (Kodak, USA).

Após a revelação, a membrana foi incubada, sob agitação, com solução de *stripping* (NaOH 0,2 M, 25 mM de glicina, 1 % de SDS pH 2,2) por 2 períodos de 15 minutos, intercalados por três lavagens com TBS / T 1 X 0,15 % Tween, durante 10 a 15 minutos, para a remoção dos anticorpos. A membrana foi então novamente bloqueada com TBS / T 1 X com 5 % de BSA em 0,15 % de Tween por 1 hora e então um novo *Western Blotting* foi realizado para GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, USA) numa diluição de 1:500 de TBS / T com 1 % de BSA em 0,15 % de Tween, seguindo um protocolo semelhante ao anterior, porém o anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (P0448, DakoCytomation, Dinamarca) na diluição de 1 : 2000.

A quantificação do *Western blotting* foi realizada através de densitometria, utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated, USA). Os resultados foram apresentados como a mediana \pm desvio padrão da razão Alvo / GAPDH.

4.13. Imunohistoquímica

As lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH no momento do diagnóstico e 7 dias após o seu tratamento com Talidomida foram congeladas imediatamente após a coleta e mantidas em nitrogênio líquido até o momento de uso. Posteriormente, a partir de fragmentos de lesões de pele congeladas foram feitos cortes de 5 - 6 μ m de espessura com o auxílio do criostato LM3000 (Leica, Wetzlar, Alemanha) e analisados pela técnica de imunoperoxidase.

Após o corte em criostato, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por no mínimo 40 minutos, e os cortes congelados foram fixados em acetona gelada por 10 minutos. Após o período de secagem, foram hidratados em PBS pH 7,4 por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 0,3 % em PBS por 15 minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com o Kit ABC Elite (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram escorridas e lavadas em PBS por 5 minutos e incubadas em soro normal por 1 hora à temperatura ambiente (Kit ABC Vector, Vectastain, CA, USA).

Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas numa solução de soro albumina bovina (BSA) 0,1 % diluída em tampão fosfato de sódio (PBS) na concentração de 1 X por 1 hora a temperatura ambiente. As secções foram incubadas com os anticorpos primários humanos monoclonais produzidos em coelho: anti - CD16a (ab183354, Abcam, USA) na diluição de 1:50; monoclonais produzidos em camundongo: anti - TNC (ab108930, Abcam, USA) na diluição de 1:100, anti - CD105 (ab11414, Abcam, USA) na diluição de 1:50, anti - CD11c na diluição de 1:25 (M0732, DakoCytomation, Dinamarca), anti - CD3 (347340, B&D) na diluição de 1:25; policlonais produzidos em camundongo: anti - VCAM1 (ab134047, Abcam, USA) na diluição de 1:200, anti-MMP1 (ab52631, Abcam, USA) na diluição de 1:100, anti - ADAM-12 (ab137468, Abcam, USA) na diluição de 1:100; monoclonais produzidos em rato: anti - PTX3 (LS-C140141, LSBio) na diluição de 1:50, por 60 minutos, lavadas com PBS e em seguida incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Vectatain ABC kit; VectorLaboratories, Inc.; Burlingame, CA) por 60 minutos, seguido da incubação com o complexo avidina-biotina (Vectatain ABC kit; VectorLaboratories, Inc.; Burlingame, CA) por 40 minutos a temperatura ambiente e processadas de acordo com instruções do fabricante.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos e incubadas em tampão de acetato de sódio pH 5,2 por 5 minutos. Para revelação, os anticorpos primários foram detectados pelo Kit Substrato de Peroxidase com AEC (3-amino-9-etilcarbazol) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), manuseados de acordo com as instruções do fabricante, e acompanhados ao microscópio para não supercorar, por no máximo 20 minutos. Em seguida, os cortes foram contra-corados por 5 minutos com Hematoxilina de Mayer, lavados em água corrente e montados com meio aquoso Paramount (Dako, ThousandOaks, CA). Para as lâminas de controle negativo, o anticorpo primário foi omitido ou um isotipo controle de especificidade irrelevante foi utilizado.

As amostras foram analisadas por um microscópio óptico de campo claro Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Inc., NY, USA), com auxílio do programa Infinity Capture (Lumenera Corporation, ON, Canadá) e as imagens geradas foram avaliadas através do software ImageProPlus.

4.14. Análises estatísticas

Os resultados foram representados como média \pm erro padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste t de Wilcoxon (pareado e não paramétrico) e a significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

As análises estatísticas dos dados apresentados foram realizadas através do programa Windows GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O número de replicatas experimentais independentes foi especificado nas legendas de cada figura.

5. Resultados

5.1. O tratamento com Talidomida conduz a uma regressão dos sintomas clínicos de reações do tipo II após 7 dias

Nosso grupo de estudo compreendeu um total 10 pacientes do sexo masculino diagnosticados clínica e histopatologicamente como primeiro episódio reacional referente ao ENH, no qual segundo as diretrizes do Ministério da Saúde, foram administradas 300 mg / dia de Talidomida como agente anti-inflamatório único, conforme intensidade do quadro, por um período de 1 semana, mediante acompanhamento clínico.

A evolução clínica dos pacientes foi avaliada após o tratamento, onde foi possível observar que a maioria dos episódios reacionais do tipo II foi controlada, apresentando involução ou estacionamento de lesões cutâneas características desse tipo de reação, além de redução de sintomas sistêmicos como mal estar geral, febre e edema, após administração do fármaco na concentração e período acima indicados.

Em termos de faixa etária, o ENH foi predominante nos pacientes com idade superior a 20 anos e a média de idades dos indivíduos compreendeu 36,5 anos; período este muito importante porque está relacionado ao momento de vida em que os mesmos são profissionalmente ativos.

Paciente	Idade	Sexo	Data	Lesões Cutâneas da Reação ENH/TTO	Mal-estar geral ENH/TTO	Febre ENH/TTO	Edema ENH/TTO	Outros
1	24	M	Dia 0	Novas lesões do tipo ENH, característica ativa.	Sim	Sim/ 38,8°C	Sim	Parestesia, perda de peso, dor neural, artralgia, mialgia, alteração da sensibilidade, nódulos inflamatórios.
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas.	Não	Sim	Sim	Parestesia, artralgia, mialgia, alteração da sensibilidade, presença de manchas hipercrômicas.
2	28	M	Dia 0	Novas lesões do tipo ENH, característica ativa.	Sim	Sim/ 37°C	Sim	Queixas nasais, artralgia, surto, alteração de sensibilidade, mialgia, dor neural, aparecimento súbito de sintomas, parestesia, infiltração, emagrecimento, doença respiratória.
			7 Dias após Talidomida	Nova reação, tipo ENH com lesões antigas estacionadas	Não	Não	Não	Perda de peso, presença de nódulos inflamatórios.
3	28	M	Dia 0	Nova reação, tipo ENH com lesões novas, característica: ativa.	Não	Sim/ 37°C	Não	Mialgia, artralgia, adenomegalia. Presença de nódulos inflamatórios
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, característica estacionada.	Não	Não	Não	Melhora dos sintomas. Parestesia em MMI esquerdo (pé), presença de nódulos.
4	32	M	Dia 0	Nova reação, tipo ENH com novas lesões ativas	Não	Não	Não	Presença de nódulos inflamatórios
			7 Dias após Talidomida	Nova reação, tipo ENH com lesões antigas estacionadas	Não	Não	Não	Melhora dos sintomas
5	23	M	Dia 0	Novas lesões do tipo ENH, característica ativa.	Sim	Sim/38,5°C	Sim	Mialgia, artralgia, dor neural, alteração da sensibilidade e força muscular, neurite, placas bem delimitadas.
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas	Não	Não	Não	Melhora dos sintomas.
6	49	M	Dia 0	Novas lesões do tipo ENH, característica ativa.	Sim	Sim/38,5°C	Sim	Lesão cutânea, dor muscular, queixa nasal, dor neural, alteração da sensibilidade
			7 Dias após Talidomida	Nova reação do tipo EM; Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas	Sim	Não	Sim	X
7	62	M	Dia 0	Nova reação, tipo ENH com lesões novas, característica: ativa.	Sim	Sim	Não	Mialgia, parestesia, alteração da sensibilidade, placas por todo o corpo.
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas	Não	Não	Não	Presença de nódulos inflamatórios
8	22	M	Dia 0	Nova reação, tipo ENH com novas lesões ativas	Não	Sim/ 39°C	Não	Queixas nasais, presença de nódulos inflamatórios ulcerados.
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas.	Não	Não	Não	Melhora dos sintomas. Presença de nódulos.
9	56	M	Dia 0	Nova reação, tipo ENH com novas lesões ativas	Não	Não	Sim	Parestesia nos pés, presença de nódulos e pápulas.
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas	Não	Não	Não	X
10	41	M	Dia 0	Novas lesões do tipo ENH, característica ativa.	Sim	Sim	Sim	Parestesia, redução da sensibilidade, Presença de nódulos inflamatórios e vesículas, artrite, orquite
			7 Dias após Talidomida	Lesões antigas do tipo ENH, características involuídas	Não	Não	Não	X

Tabela 4. Quadro Clínico representativo de 10 pacientes com ENH no momento do diagnóstico e 7 dias após tratamento com Talidomida.

5.2. Talidomida reduz alterações clássicas descritas no ENH após 7 dias de tratamento

Na fotografia representativa de um paciente com ENH (figura 5.2.A) no momento do diagnóstico, as lesões apresentaram-se em relevo, relativamente à pele vizinha; com presença de nódulos com coloração eritematosa, porém avermelhada no centro, de limites sombreados que vão se apagando gradualmente; mais intensos no centro da lesão do que na periferia. Acrescenta-se, ainda, a presença de edema tecidual com grande infiltração, cujos limites não se podem delimitar precisamente, alguns desses nódulos confluem formando placas eritematosas em toda a extensão do membro superior esquerdo, especialmente na face externa e posterior dos braços, bem como nos antebraços e cotovelo.

Após 7 dias de tratamento com Talidomida (figura 5.2.B), todos os fenômenos foram se atenuando gradualmente, com o desaparecimento da infiltração, enquanto que o eritema foi modificando sua coloração, primitivamente vermelho intenso, e tornando-se violácea, até que, do antigo nódulo só persistiu uma pigmentação equimótica de limites difusos e coberta por uma fina descamação.

Já na imagem representativa de coloração histológica com hematoxilina-eosina, no momento do diagnóstico observamos (figura 5.2.C) lesão subcutânea profunda, onde é possível observar intenso infiltrado inflamatório localizado na derme e, principalmente, na hipoderme, próximo ao tecido subcutâneo e a anexos cutâneos; Infiltrado inflamatório este, composto por macrófagos espumosos, algumas células polimorfonucleares, incluindo neutrófilos, além de glândulas sudoríparas desorganizadas e edema vascular, confirmando os aspectos descritos na literatura. Após o sétimo dia de tratamento com Talidomida (figura 5.2.D), as lesões apresentaram redução intensa do infiltrado inflamatório dérmico em alguns casos e moderada em outras, diminuição do edema vascular, neovascularização e colagenização da derme.

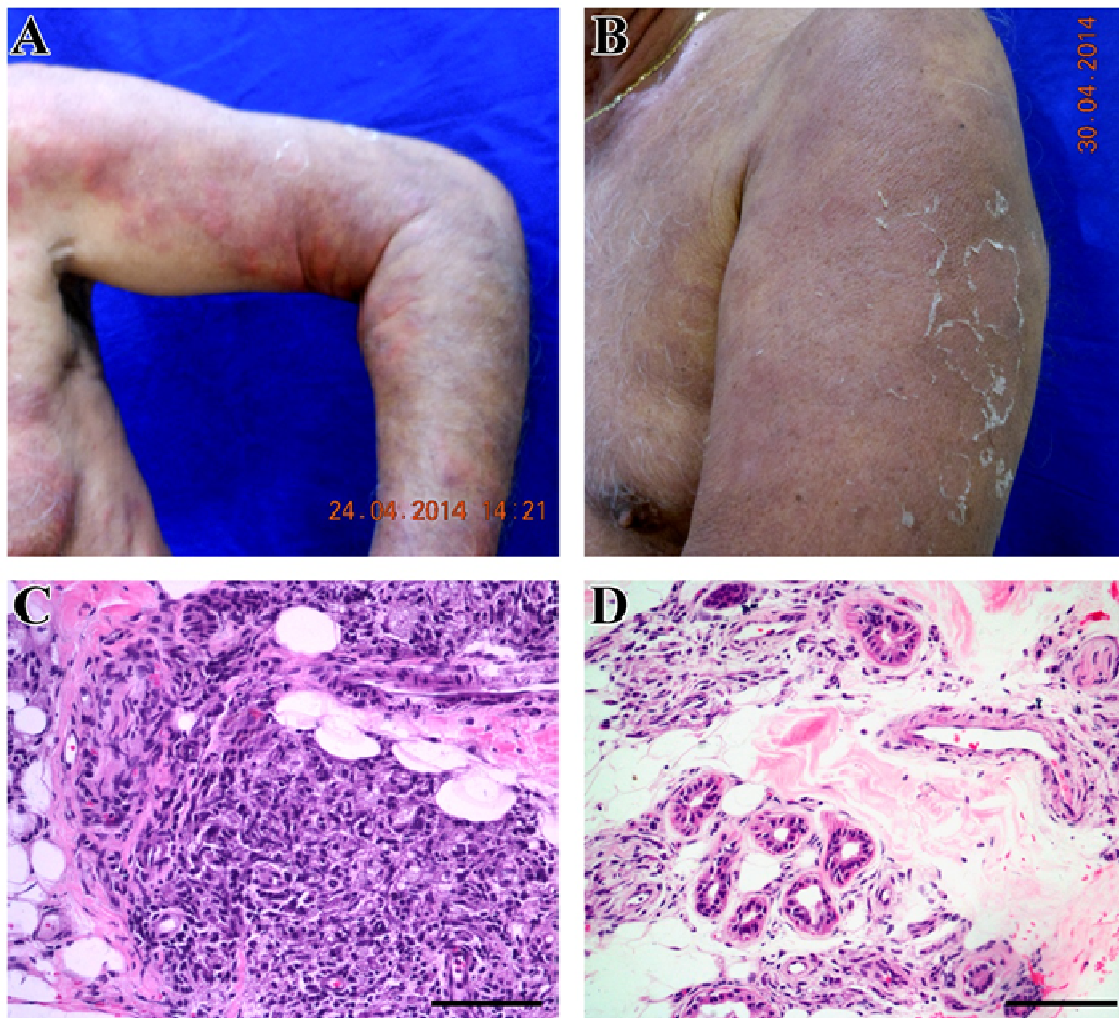


Figura 5.2. Aspectos macro (A e B) e microscópicos (C e D) das lesões cutâneas de paciente com ENH antes e 7 dias após tratamento com Talidomida, respectivamente. As imagens são representativas da avaliação de 5 pacientes com ENH. As imagens histológicas foram obtidas no microscópio Nikon E400 Eclipse e avaliadas no programa Infinity software. Barras: (C-D) = 25 μ m.

5.3. Talidomida reduz alterações na histopatologia do ENH após 7 dias de tratamento

Na figura 5.3.A referente ao momento do diagnóstico (dia 0) do paciente 1, podemos observar derme e hipoderme intensamente comprometidas pela presença de infiltrado inflamatório denso, com envolvimento de estruturas vasculares (seta) e neurais (asterisco), além da presença de células mononucleares, contendo numerosos neutrófilos. Após tratamento com Talidomida por um período de 7 dias (figura 5.3.B), notamos a redução considerável do infiltrado inflamatório nas regiões de derme e hipoderme.

No dia 0 do paciente 2 (figura 5.3.C), podemos observar a presença de vasculite aguda, representada por infiltrado inflamatório, dissociando as camadas do vaso (seta) e intensa proliferação de células endoteliais. Além disso, notamos a presença de matriz extracelular edemaciada e infiltrada, contendo focos de angiogênese. Posteriormente ao tratamento com o fármaco (figura 5.3.D), observamos a colagenização da matriz extracelular, além de redução intensa do infiltrado inflamatório perivascular, embora permaneçam focos de vasos neoformados (setas).

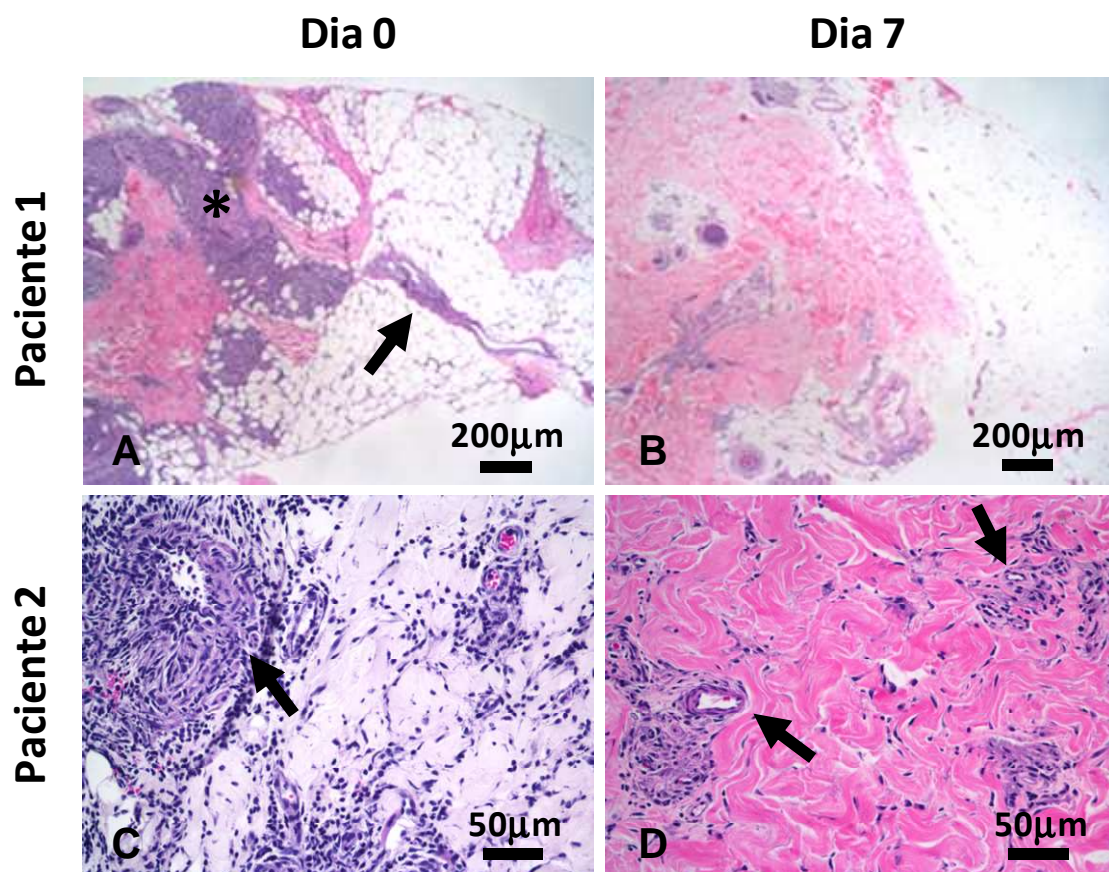


Figura 5.3. Fotomicrografias de lesões cutâneas de pacientes com ENH no momento do diagnóstico e após 7 dias de tratamento com Talidomida. As fotomicrografias são referentes a dois pacientes diagnosticados com ENH no momento do diagnóstico (dia 0) (A e C) e após 7 dias de tratamento com Talidomida (dia 7) (B e D). As imagens de cortes de parafina corados com hematoxilina-eosina (HE) foram observadas ao microscópio Olympus e capturadas através do software Infinity. Barras = (A-B) 200 µm; (C e D) = 50 µm.

5.4. Validação por RT - PCR de genes modulados negativamente, selecionados a partir do microarranjo, após 7 dias de tratamento com Talidomida

Após enriquecimento dos dados de microarranjo através da análise de processos biológicos na plataforma online de bioinformática DAVID e análise integrativa, os seguintes genes alvos foram selecionados para validação por RT-PCR em tempo real.

De uma forma geral, podemos destacar o gene de TNF, um conhecido marcador de melhora da reação do tipo II e que *in vitro* / *in vivo* pode ser modulado negativamente pela ação da Talidomida; os genes de THBS1, CYR61, PTX3, TNC, VCAM-1 como fatores secretados, responsáveis pela ativação celular tecidual e que alteram a composição da MEC; CD16 como um receptor de porção Fc, capaz de indicar uma alteração na população de células na lesão; e as moléculas intracelulares CAPS1 e SOCS3, responsáveis pelo controle de vias importantes relacionadas com inflamação e apoptose. Também avaliamos os genes das metaloproteinases MMP1 e ADAM12, responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC).

A expressão gênica de TNF (figura 5.4.A), THSB1 (figura 5.4.B), CYR61 (figura 5.4.C), e PTX3 (figura 5.4.D) foi significativamente reduzida após 7 dias de tratamento com Talidomida.

As demais moléculas: TNC (figura 5.4.E), VCAM-1 (figura 5.4.F), CD16a (figura 5.4.G), Caspase 1 (figura 5.4.H) e SOCS3 (figura 5.4.I), MMP1 (figura 5.4.J) e ADAM 12 (figura 5.4.K) não apresentaram redução da expressão gênica nas lesões de pele de pacientes com ENH após tratamento com o fármaco, neste mesmo período de tempo. Dessa forma, acreditamos ser necessário o aumento dos valor do N experimental atual.

Cada um dos genes foi testado para todos os 10 pares de biópsias, no entanto as reações de RT - PCR em tempo real foram inconclusivas para alguns casos nas condições padronizadas, o que reduziu o número total considerado para TNF e PTX3. Além disso, para algumas biópsias, as moléculas TNC e PTX3 apresentaram ausência de amplificação detectada (pontos vermelhos).

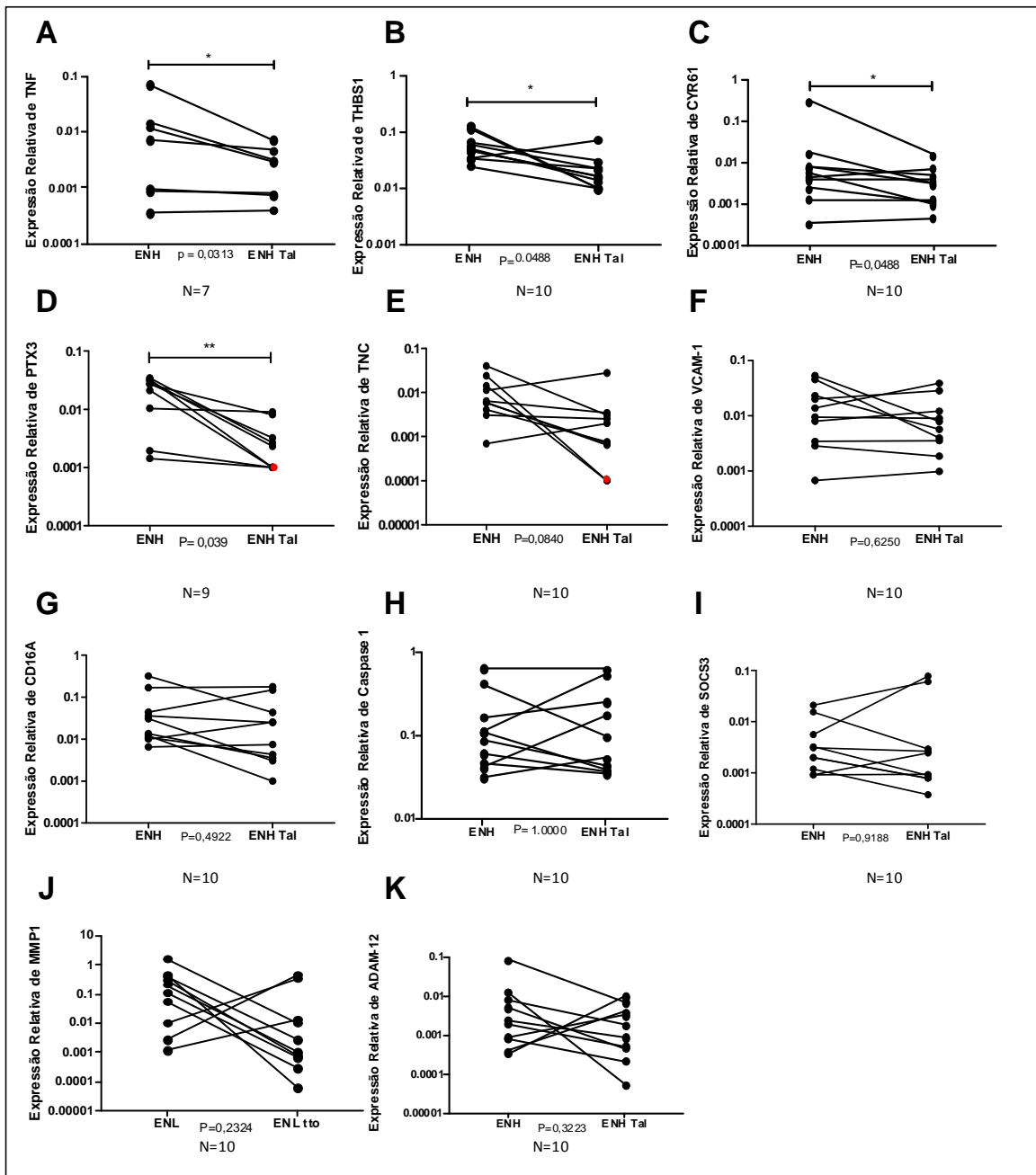


Figura 5.4. Modulação da expressão gênica de TNF (A), THBS1 (B), CYR61 (C), PTX3 (D), TNC (E), VCAM-1 (F), CD16a (G), caspase 1 (H), SOCS3 (I), MMP1 (J), ADAM-12 (K) e por RT-PCR em tempo real semi-quantitativo, de lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH, no momento do diagnóstico e 7 dias após o tratamento com Talidomida, respectivamente. Todos os valores de expressão gênica obtidos ($\Delta\Delta C_t$) foram normalizados pela expressão de GAPDH. Os resultados representam a média de 7-10 experimentos independentes (indicados na parte inferior de cada RT-PCR em tempo real) e a significância estatística foi calculada por teste Wilcoxon (p<0,01; * p<0,05). Pontos vermelhos representam ausência de amplificação detectada.**

5.5. Talidomida modula a expressão proteica de moléculas expressas nas lesões de ENH após 7 dias de tratamento

Para a detecção e análise qualitativa da expressão proteica nas lesões de pele biopsiadas dos pacientes com ENH, através de imunoidentificação, as mesmas foram submetidas à análise por *western blotting* para as moléculas TNF, TNC, CD16a, V-CAM1, PTX3, caspase 1 e MMP-1 no momento do diagnóstico dos pacientes e 7 dias após tratamento com Talidomida.

As moléculas TNF (figura 5.5.A), TNC (figura 5.5.B), CD16a (figura 5.5.C), V-CAM1 (figura 5.5.D) apresentaram redução estatisticamente significativa de sua expressão protéica após 7 dias de tratamento com Talidomida.

Entretanto, as moléculas PTX3 (figura 5.5.F) e caspase 1 (figura 5.5.G) apresentaram resultados inconclusivos. Já MMP-1 (figura 5.5.E) apresentou aumento estatisticamente significativo de sua expressão protéica em todos os pacientes quando avaliados no mesmo período de tempo após tratamento.

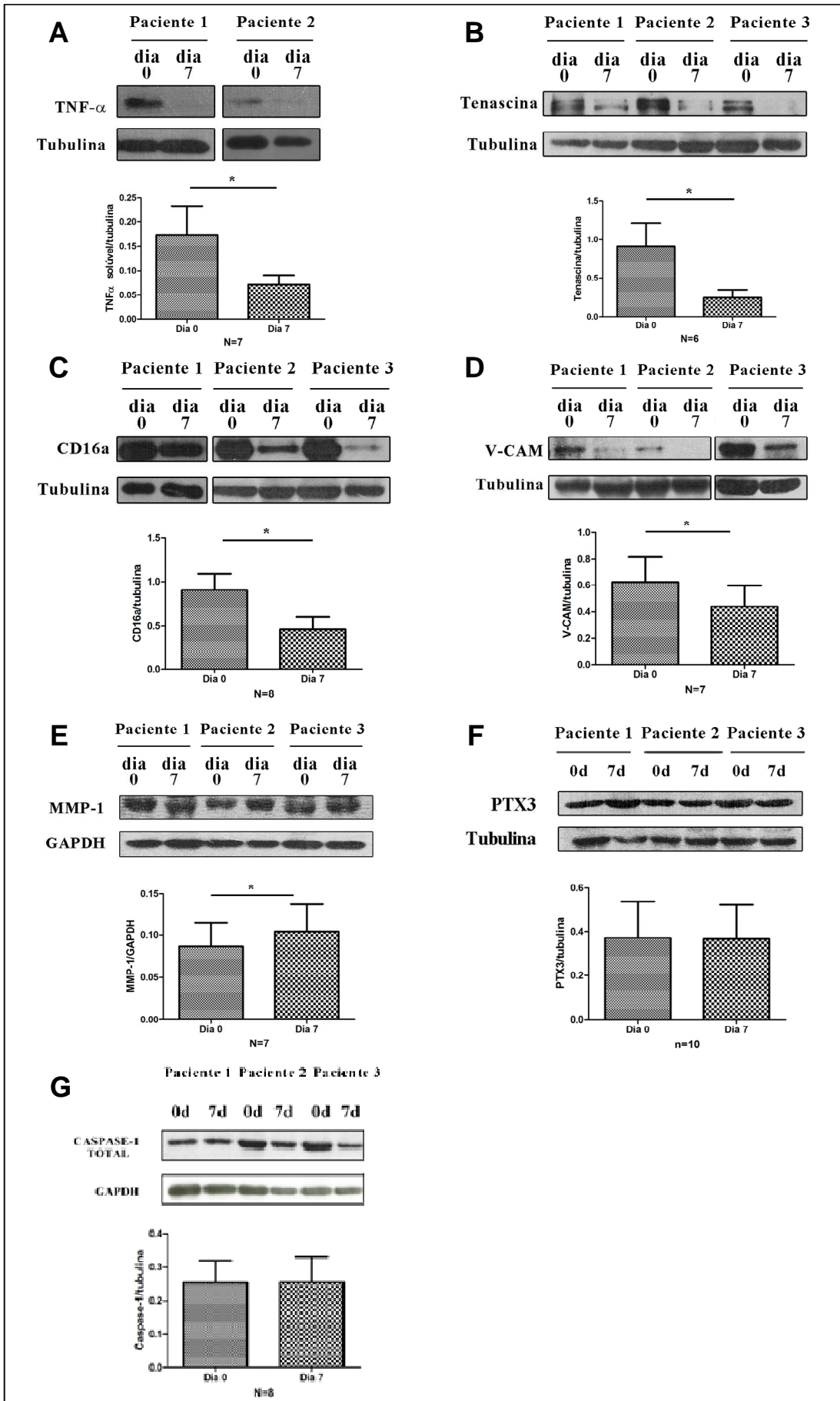


Figura 5.5. Western blotting demonstrativo do efeito do tratamento com Talidomida sobre a expressão proteica de TNF (A), TNC (B), CD16a (C), V-CAM (D), MMP-1 (E), PTX3 (F), Caspase-1 (G) em lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH, no momento do diagnóstico e 7 dias após o tratamento com Talidomida. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 6-10 experimentos independentes (indicados na parte inferior de cada WB) e a significância estatística foi calculada pelo teste de Wilcoxon (* $p < 0,05$). Adicionalmente, são mostradas as análises densitométricas da intensidade de expressão das bandas geradas, normalizadas pela expressão de GAPDH e Tubulina, conforme identificado em cada molécula analisada. Experimentos representativos.

5.6. Talidomida promove a redução de moléculas envolvidas na imunopatogênese do ENH após 7 dias

Para identificar a presença e localização das moléculas presentes na imunopatogênese das lesões de pele biopsiadas dos pacientes com ENH, as mesmas foram submetidas à análise por imunohistoquímica para as moléculas CD3⁺, CD11c⁺, CD16a⁺, CD105, MMP1⁺ e PTX3⁺. Na lesão dos pacientes no momento do diagnóstico foram observadas muitas células CD3⁺ (figura 5.6 A), CD11c⁺ (figura 5.6C), CD16a⁺ (figura 5.6 E), CD105 (figura 5.6 G), MMP1⁺ (figura 5.6 I) e PTX3⁺ (figura 5.6 K) distribuídas principalmente nos infiltrados inflamatórios da derme e ao redor de anexos cutâneos (*asteriscos e setas*, respectivamente). Além disso, observamos uma grande quantidade de vasos sanguíneos CD105⁺ distribuídos pela derme e, principalmente, localizados nos infiltrados dérmicos e próximos aos anexos cutâneos (*asteriscos e setas*, respectivamente).

Após 7 dias de tratamento com Talidomida (figura 5.6 B, D, F, H, J e L), verificamos uma redução na expressão de todos os marcadores analisados, além da diminuição do infiltrado inflamatório dérmico (*asterisco e setas*) e também nos microvasos.

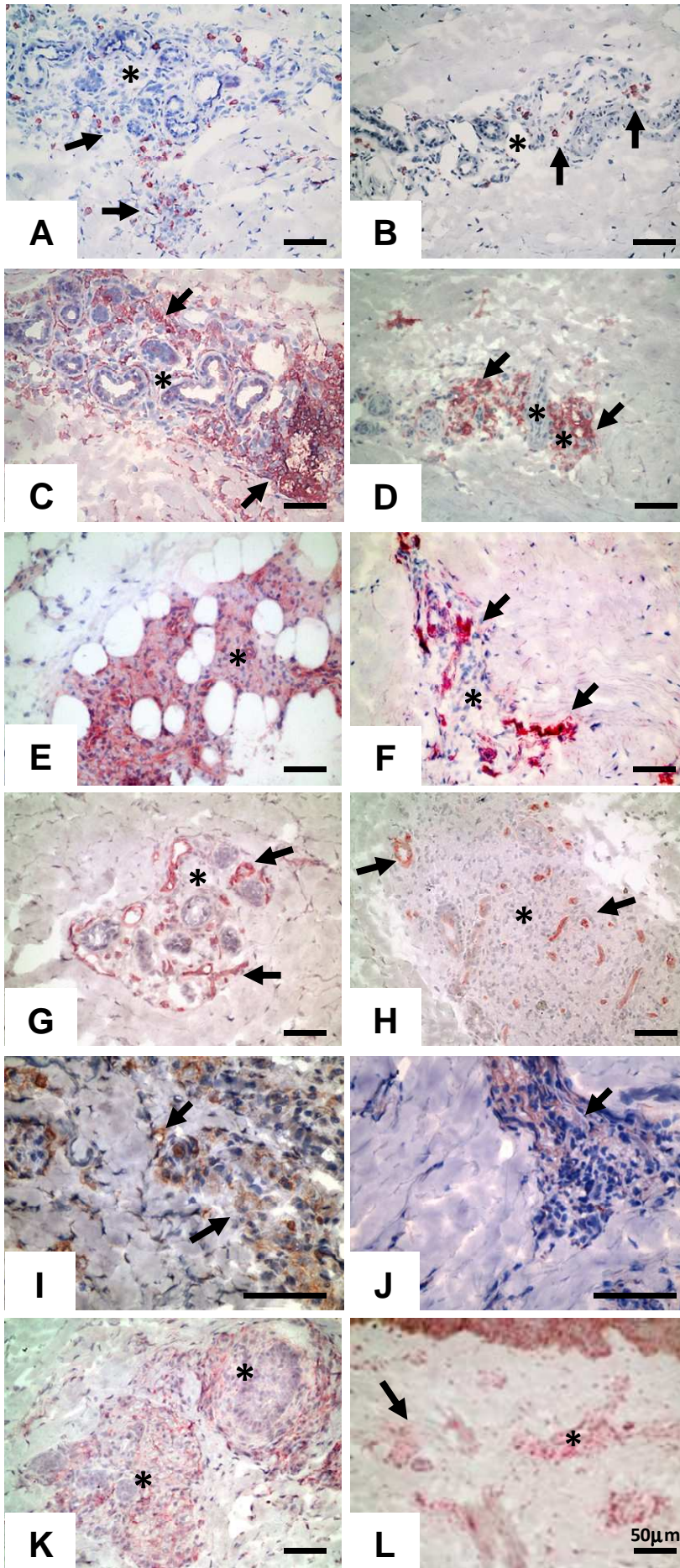


Figura 5.6. Expressão de marcadores celulares nas lesões de pele de pacientes com ENH antes e após tratamento com Talidomida. Fotomicrografias de lesões de pele de pacientes com ENH antes (coluna da esquerda) e 7 dias após tratamento com Talidomida (coluna da direita) marcados para CD3 (A e B), CD11c (C e D), CD16a (E e F), CD105 (G e H), MMP1 (I e J) e PTX3 (K e L). Essas observações são representativas de 5 pacientes com ENH. Método de imunoperoxidase e contraste com hematoxilina. As imagens foram obtidas no microscópio Nikon E400 Eclipse e avaliadas no programa Infinity software. Barras = 50µm.

5.7. O uso de Talidomida reduz a expressão de TNC após 7 dias de tratamento

Para caracterizarmos a distribuição e a expressão de TNC nas lesões de pele de pacientes com ENH, os cortes foram imunomarcados contra TNC.

Com relação ao padrão imuno - histoquímico observado, no momento do diagnóstico verificamos uma intensa marcação para TNC nos infiltrados inflamatórios dérmicos (*setas*) (figura 5.7.A), na região subepidérmica (*asterisco*), ao redor de anexos cutâneos presentes na região profunda da derme (*setas em C*) da pele de paciente no momento do diagnóstico e antes do tratamento (figura 5.7.C). Após 7 dias de tratamento com Talidomida verificamos a redução da marcação para TNC na área subepidérmica (*setas*) (figura 5.7.B) e nos infiltrados inflamatórios, localizados na derme e ao redor das glândulas sudoríparas (figura 5.7.D).

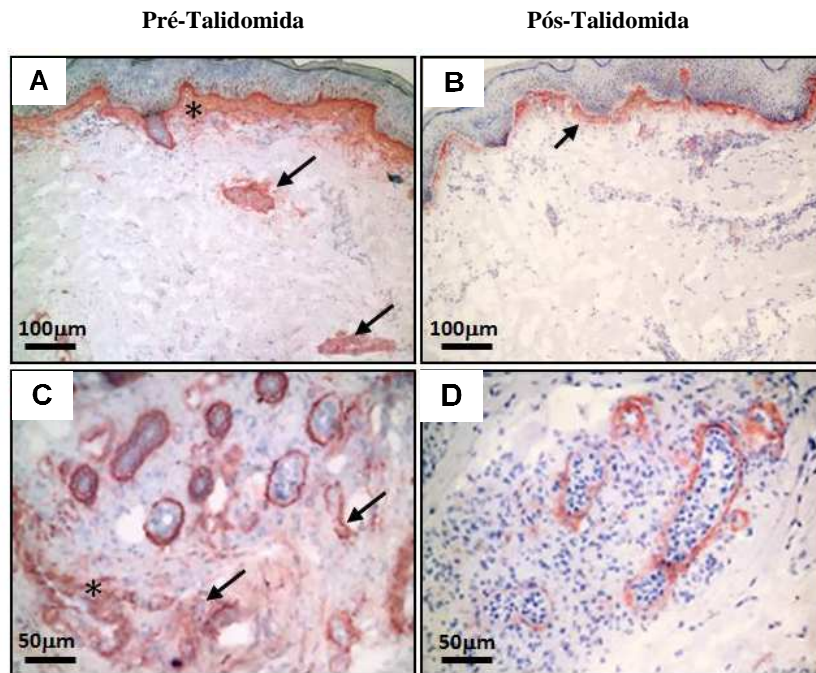


Figura 5.7. Expressão de TNC em lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH antes (A e C) e após 7 dias de tratamento com Talidomida (B e D). As imagens histológicas foram capturadas de campos aleatórios, e são representativas da avaliação de cortes congelados, provenientes de lesões de pele biopsiadas de 5 pacientes com ENH. As imagens foram observadas ao microscópio Olympus e capturadas através do software Infinity. Barras = (A e B) 100 µm; (C e D) 50 µm.

6. Discussão

Neste estudo, foram demonstrados que no ENH além dos tradicionais genes envolvidos na resposta imune inflamatória, outros sistemas biológicos responsáveis pela homeostasia tissular são moléculas chaves para desencadear e regredir o evento quando tratados com a Talidomida. Avaliando nosso trabalho pelo ponto de vista do fármaco, diversos genes que são sabidamente envolvidos com metástase, desenvolvimento de tumores, fibrose e inflamação crônica foram identificados como sendo modulados pela Talidomida.

Trabalhos sobre os efeitos da Talidomida em modelo murino com tuberculose pulmonar mostraram que a droga acarretou uma redução tanto no tamanho do granuloma, como na destruição do pulmão (Moreira, Tsenova-Berkova, *et al.*, 1997). Já em modelo utilizando coelhos com meningite tuberculosa, demonstrou-se que o uso da Talidomida associado a antibióticos foi responsável pela diminuição total da mortalidade devido à doença (Tsenova *et al.*, 1998).

A análise de microarranjo realizada em estudo prévio com amostras de lesões de pele biopsiadas de pacientes com ENH (N=4), possibilitou repetir o desenho do estudo clínico no presente trabalho, utilizando nesta ocasião um maior número de amostras (N=10), além da ampliação das técnicas empregadas, tais como RT-PCR em tempo real, *western blotting* e imunohistoquímica, para confirmação dos dados obtidos anteriormente. Para isto realizamos as etapas necessárias para a seleção de genes a serem analisados através das técnicas acima.

Nas lesões agudas, o infiltrado inflamatório apresenta, predominantemente, leucócitos polimorfonucleares (PMN), geralmente situados nas camadas mais profundas da derme e hipoderme, muitas vezes constituindo microabscessos assépticos. Embora, a sua intensidade varie entre casos discretos de ENH com lesões cutâneas pouco dolorosas, sem comprometimento do estado geral, a casos mais graves que necessitam internação. Por outro lado, a participação de células endoteliais no recrutamento de células inflamatórias não deve ser descartada como um ponto chave para o desenvolvimento deste episódio reacional. A presença de edema na derme é outro achado frequente; já as lesões tardias podem apresentar alterações de proliferação ou obliterativa (Job, Gude e Macaden, 1964; Foss *et al.*, 2003).

Dentre as moléculas presentes na imunopatogênese das lesões de pele biopsiadas dos pacientes com ENH, observamos a redução da imunomarcagem de CD3⁺ nos

infiltrados remanescentes das lesões em regressão. A molécula CD3 é uma glicoproteína membro da família das moléculas de adesão, denominada integrina. Seu receptor de superfície é que interage com o receptor de linfócitos T (TCR) formando o complexo TCR – CD3. Além disso, pode ser usada como marcador fenotípico para indicar a população de linfócitos T, pois estão presentes apenas nestas células (Parkin e Cohen, 2001).

Além disso, também observamos redução da imunomarcação das células CD11c⁺, em especial na epiderme, indicando uma redução da população de células dendríticas após o tratamento. As células CD11c são consideradas as mais efetivas apresentadoras de antígenos, além de estarem envolvidas nos processos de quimiotaxia, fagocitose e adesão celular; entretanto possuem baixa frequência nos linfonodos drenantes quando comparadas as demais populações celulares (Osugi, Vuckovic e Hart, 2002).

Em nosso trabalho verificamos a marcação de diversos microvasos positivos para CD105 durante o ENH, entretanto, após o período de tratamento a mesma apresentou-se reduzida, o que indica o processo de angiogênese como uma característica do ENH. O anticorpo monoclonal CD105 (endoglina) identifica o receptor do fator transformador do crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Este receptor é uma glicoproteína transmembranar do tipo I que é expressa nas células endoteliais, sendo um marcador da angiogênese tecidual, em processos inflamatórios e na formação de tumores, embora pouco expresso no endotélio de tecidos normais (Kumar, Wang *et al.*, 1996). Vários estudos demonstram o seu potencial no diagnóstico, prognóstico e terapia de tumor (Huang *et al.*, 2014; Cavar *et al.*, 2015).

De forma geral, apesar do CD16a não se tratar de um marcador fenotípico que possa indicar uma população celular exclusiva, a redução de células positivas para esta molécula indica que uma dessas populações, na qual a mesma encontra-se envolvida, possa ser chave para o desenvolvimento do ENH. Além disso, a molécula CD16a também apresentou redução significativa após o 7º dia de tratamento com Talidomida, através de avaliação da expressão gênica.

O antígeno CD16 é um receptor de baixa afinidade para IgG, existe tanto como uma proteína ancorada glicosil-fosfatidilinositol (GPI) em células polimorfonucleares, como uma proteína transmembranar em células NK. Este antígeno tem expressão em granulócitos, monócitos, macrófagos e em células natural killer, além de ser responsável pela função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Hogg, 1988).

A presença de alterações no microambiente tecidual no ENH parece promover a inflamação crônica do tecido, sendo isto confirmado pela natureza de genes reduzidos após o tratamento com a Talidomida. Embora envolvidos no reparo ao dano tecidual e esta ser uma das principais funções biológicas identificadas a partir da análise do microarranjo, é aceito que o excesso de moléculas com funções inflamatórias, envolvidas com migração celular e degradação tecidual participem de eventos de inflamação crônica. O envolvimento de padrões moleculares associados ao dano tissular (DAMPs) no ENH parece justificar os eventos inflamatórios verificados, no entanto outros marcadores ainda precisam ser avaliados de forma mais consistente.

Estudos recentes têm demonstrado que proteínas expressas na MEC humana adquirem propriedades de DAMPs em algumas doenças que evoluem para cronificação, tais como artrite reumatóide. Entre estes DAMPs descritos encontram-se colágeno, TNC e fibronectina. Os DAMPs são reconhecidos através de receptores da resposta imune inata, tais como TLRs e receptores da família NOD-like (NLRP3). Estes receptores iniciam vias de transdução de sinal que levam à inflamação em resposta a MAMPs (padrões moleculares associados a micróbios) e / ou DAMPs (Feldman, Rotter e Okun, 2015).

Dentre as principais moléculas consideradas DAMPs liberadas ou expressas no ENH, detectou-se a TNC. A expressão de outras moléculas inflamatórias e modificadoras da matriz, como as MMPs e ADAM12, acabam por degradar a MEC e propagam o ciclo inflamatório destrutivo .

Nas biópsias de pele de pacientes com ENH no momento do diagnóstico, a expressão gênica de TNC foi detectada em todos os 10 pacientes analisados. Embora, após o período de 7 dias de tratamento com Talidomida, dois casos apresentaram expressão gênica negativa para esta molécula. Além disso, a análise estatística não indicou significância entre os valores obtidos. Entretanto, observamos a diminuição de sua expressão protéica através das técnicas de *western blotting* e imunohistoquímica.

A TNC atua como um DAMP, provocando ativação das células da imunidade inata, via ligação com TLR-4 (Goh *et al.*, 2010). Trata-se de uma glicoproteína extracelular categorizada como uma proteína matricelular, sendo altamente expressa durante o processo de cicatrização de feridas e inflamação, além de possuir uma ampla variedade de efeitos sobre a resposta celular na morfogênese e remodelação tecidual (Imanaka-Yoshida, Yoshida e Miyagawa-Tomita, 2014).

Embora a expressão aguda da TNC seja necessária para a cicatrização de feridas adequadamente (Sumioka *et al.*, 2013), sua expressão persistente pode ser prejudicial; como no caso de ratos com doença de Alzheimer, em que esta molécula apresenta-se positivamente regulada, e sua supressão reduz a neuropatologia e inflamação na doença (Xie *et al.*, 2013). Além disso, a TNC representa um importante fator na propagação da inflamação crônica e pode atuar de forma semelhante após doenças como, por exemplo, a Síndrome do cólon irritável (Gaudet e Popovich, 2014).

A presença da TNC no ENH pode representar um fator determinante para a manutenção da inflamação tecidual crônica; encontramos a molécula disposta ao redor de microvasos e também ao redor dos infiltrados inflamatórios, o que pode ser uma fonte de ativação celular constante .

Em 2009, Midwood *et al.* demonstraram pela primeira vez em um modelo de artrite no qual os sintomas de doenças inflamatórias em camundongos *knock out* para TNC foram rapidamente resolvidos; inversamente, injeções de TNC promoveram inflamação das articulações. Dessa forma, a TNC pode ser um importante alvo terapêutico a ser explorado para o tratamento do ENH (Midwood e Orend, 2009; Kim *et al.*, 2012).

Recentes investigações detalhadas de vários modelos de doenças utilizando TNC KO têm sugerido que esta glicoproteína pode promover a cicatrização do tecido, contudo contribui para o aumento de inflamação e fibrose (Midwood *et al.*, 2011; Udalova *et al.*, 2011; Brellier e Chiquet-Ehrismann, 2012; Imanaka-Yoshida, 2012; Chiquet-Ehrismann *et al.*, 2014).

A presença de TNC, junto a outros achados, parece confirmar que o processo inflamatório crônico que pode ocorrer no ENH recorrente possa ser mediado por eventos de fibrogênese e pela presença de mediadores inflamatórios importantes para o reparo tecidual, no entanto expressos de forma descontrolada, o que leva a mais danos do que resolução. Dessa forma, identificar quais fatores da micobactéria influenciariam nesses eventos são passos importantes a serem desenvolvidos.

Outros trabalhos do nosso grupo demonstraram, de forma original, que a Talidomida é responsável pela redução de TNF (Sampaio *et al.*, 1991), dado este confirmado no nosso trabalho, após o sétimo dia de tratamento com o fármaco, no qual podemos constatar a redução estatisticamente significativa dos valores de TNF, mediante análise de expressão gênica e por *western blotting* no nosso grupo amostral.

A ação da Talidomida se faz através do bloqueio do RNA mensageiro que comanda a produção desta citocina, o que poderia explicar o seu efeito no ENH (Moreira *et al.*, 1993). Dessa forma, o efeito da Talidomida em reduzir os níveis séricos de TNF ocasiona a melhora das manifestações locais e sistêmicas do ENH, inibindo a migração de células inflamatórias em direção às lesões (Sampaio *et al.*, 1993).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a Talidomida inibe a produção do TNF em monócitos, acelerando ostensivamente a degradação dos transcritos de ácido ribonucleico (RNA). Outros estudos sobre o efeito da droga mostram que a mesma foi responsável pela redução dos níveis de TNF em macrófagos alveolares humanos (Tavares *et al.*, 1997) e redução dos níveis de TNF no fluido cérebro-espinhal, levando a uma diminuição da patologia cerebral (Schoeman *et al.*, 2000).

Além disso, nosso grupo também demonstrou que a indução da ativação do NF- κ B, assim como sua capacidade de ligação ao DNA foram inibidas pela Talidomida. A droga também reduziu a produção de TNF em monócitos estimulados com *M. leprae*, inibindo a fosforilação da p38 e ativando a via de ERK 1/2 (Hernandez *et al.*, 2011).

Embora a liberação do uso da Talidomida pelos órgãos de saúde pública de vários países tenha sido pautada nas propriedades anti-TNF, o seu mecanismo de ação é bem amplo e não parece ser exclusivo sobre esta molécula. Através do nosso trabalho de análise de microarranjo, aqui descrito, como em outros, podemos ver que outros genes são modulados pela Talidomida e que estes possuem funções chave no processo inflamatório (Paiva *et al.*, 2012).

Verificamos, ainda, no nosso estudo que as metaloproteinases MMP1 e ADAM12 não apresentaram redução de sua expressão gênica após 7 dias de tratamento com Talidomida. Na análise de imunohistoquímica, observamos a redução da imunomarcagem da MMP1 nas amostras analisadas. Surpreendentemente, a análise por *western blotting* demonstrou aumento estatisticamente significativo em 7 dos casos analisados. Uma possível explicação para este fato seria em virtude dos fragmentos de tecidos, embora provenientes dos mesmos pacientes, utilizados para a técnica de *western blotting* não corresponderem aos mesmos utilizados na técnica de imunohistoquímica.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família estruturalmente relacionada, porém geneticamente distinta, de enzimas proteolíticas derivadas do hospedeiro, envolvidas na degradação fisiológica e patológica da maioria das macromoléculas da matriz extracelular (MEC) e proteínas de membrana basal

(Birkedal-Hansen, 1993). Além disso, as MMPs estão envolvidas no tráfego das células inflamatórias, nos processos de defesa e dano tissular (Greenlee, Werb e Kheradmand, 2007).

A MMP-1 é expressa por fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, hepatócitos, condrócitos, osteoblastos, células tumorais, e durante a migração de queratinócitos epidérmicos (Birkedal-Hansen, 1993). Extracelularmente, a atividade proteolítica das MMPs é regulada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e por mecanismos de ativação pró-MMPs (Shibata, Takiguchi e Abiko, 1999).

A ADAM12 é um membro da grande família de enzimas ADAM; estas são multifuncionais, em geral, ligadas a membranas, as proteases de zinco. ADAM12 tem sido implicada na patogênese de diversos tipos de câncer, fibrogênese de fígado, hipertensão e asma, e a sua elevação ou diminuição no soro humano tem sido associada a estas e outras condições fisiológicas / patológicas (Nyren-Erickson *et al.*, 2013).

Enquanto ADAM12 é transitoriamente expressa durante a morfogênese embrionária dos músculos esqueléticos, órgãos viscerais e osso (Kurisaki *et al.*, 1998), os ratos com deficiência de ADAM12 não mostram grandes anomalias de desenvolvimento (Kurisaki *et al.*, 2003). A expressão de ADAM12 pós - natal em órgãos saudáveis e sem lesões é baixa; entretanto, a mesma é altamente elevada em doenças acompanhadas por fibrose, como cirrose hepática (Le Pabic *et al.*, 2003), lesão muscular (Borneman, Kuschel e Fujisawa-Sehara, 2000), esclerodermia (Shi-Wen *et al.*, 2007), feridas crônicas (Harsha *et al.*, 2008) e hipertrofia cardíaca (Wang *et al.*, 2009)

Consistentemente, um estudo genético recente em ratos mostrou que ADAM12 é expressa nas células mesenquimais perivasculares (pericitos), que são programadas durante o desenvolvimento da parede vascular, ativadas em resposta à lesão de tecido e geram miofibroblastos pró- fibróticos (Dulauroy *et al.*, 2012).

Em vista disso, ADAM12 tem potencial para emergir como um bem sucedido alvo de drogas, embora direcionando-se ao domínio metaloproteinase com qualquer especificidade será difícil de alcançar, devido à semelhança estrutural entre os membros da família de enzimas MMP e ADAM. No geral, faz-se necessário maiores investigações para estabelecer ADAM12 como um biomarcador altamente desejável e alvo de fármacos para diferentes doenças e seus inibidores seletivos, como potenciais agentes terapêuticos.

A presença de ADAM12 e MMP1 no ENH, demonstra mais uma vez que o processo de remodelamento tecidual está desequilibrado, e que é compatível com a

fibrose e manutenção da inflamação recorrente e crônica que acomete alguns pacientes. Por outro lado, a ação da Talidomida sobre estas moléculas traz novas opções terapêuticas que podem ser baseadas em sua ação e de análogos em doenças onde a presença dessas moléculas representem um papel chave para a sua patogênese.

Em outras moléculas ainda relacionadas a matriz extracelular, assim como a THBS1 e CYR61 observamos a redução estatisticamente significativa da expressão gênica nos pacientes analisados após tratamento com o fármaco.

A proteína CYR61 é um componente da matriz extracelular, que é produzida e secretada por vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas. A CYR61 tem sido envolvida na migração dos leucócitos e no processo inflamatório, mas também está envolvida no desenvolvimento cardiovascular e carcinogênese. Ela exerce as suas funções através da ligação à várias integrinas presentes em muitos tipos celulares diferentes. Esta multiplicidade de função é agora conhecida por contribuir para um diversificado leque de processos celulares em que a mesma pode regular (Perbal, 2013).

Durante o processo de cicatrização de feridas cutâneas, miofibroblastos são recrutados para formar o tecido de granulação, onde se proliferam e rapidamente sintetizam a MEC para fornecer integridade tecidual durante o reparo. Em fases posteriores de cicatrização de feridas, estes miofibroblastos são conduzidos para a senescência pela CYR61, sobre a qual expressam um fenótipo de degradação da MEC e limitam a fibrose. Assim, as funções da CYR61, como um interruptor molecular anti-fibrótico que convertem os fibroblastos produtores de MEC em células senescentes degradadoras de MEC, impõem um controle auto-limitante na fibrogenese durante a cicatrização de feridas (Lau, 2011).

A expressão de CYR61 é fortemente regulada por citocinas e fatores de crescimento. No entanto, a CYR61 pode modular diretamente a adesão celular e os processos migratórios, enquanto regula simultaneamente a produção de outras citocinas e quimiocinas através de *feedback* parácrino e autócrino. Esta funcionalidade complexa do CYR61 tem destacado o papel fundamental que esta molécula pode desempenhar na regulação do processo de vigilância imunológica. Além disso, a CYR61 tem aparecido ultimamente como um parceiro importante no direcionamento de componentes dos processos de doença inflamatória crônica ou infecciosa, tais como aterosclerose ou artrite reumatóide (Perbal, 2013).

Por sua vez, as trombospondinas compreendem uma família de proteínas homólogas que regulam o fenótipo celular e a estrutura extracelular durante a criação e o remodelamento do tecido. Vários estudos têm demonstrado que a THBS-1 regula a diferenciação, proliferação, migração celular, e apoptose de fibroblastos, células de músculo liso e macrófagos (Jaffe, Ruggiero e Falcone, 1985; Bornstein, 2001; Adams e Lawler, 2004). Dessa forma, a THBS-1 desempenha um importante papel na regulação de várias atividades biológicas, incluindo homeostase vascular, imunidade, e cicatrização de feridas (Reed *et al.*, 1993; Bauer *et al.*, 2010; Lopez-Dee, Pidcock e Gutierrez, 2011).

De modo geral, as células endoteliais são adaptadas a expressar altos níveis de moléculas de adesão, como é o caso da VCAM-1. A expressão gênica de VCAM-1 não apresentou redução na expressão gênica, entretanto a análise por *western blotting* demonstrou redução estatisticamente significativa.

A VCAM-1 pode ser mais persistente no tecido, uma vez que sua expressão pode ser constitutiva em células dendríticas e em células endoteliais. A expressão dessas moléculas é resultado do processo de ativação do endotélio que ocorre em condições de lesão tecidual, na presença de subprodutos de microrganismos (por exemplo: lipopolissacárideos - LPS) ou mediante contato com fatores provenientes da resposta inflamatória, como componentes das cascatas do complemento, coagulação, citocinas (IL-1 β , TNF) e mediadores como a histamina e o leucotrieno B4 (Gearing *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 1997).

Após a ativação leucocitária, moléculas endoteliais de adesão, tais como VCAM-1, começam a participar do processo de ativação inflamatória, podendo inclusive ser utilizadas como marcadoras do processo inflamatório. Estas moléculas permitem adesão estável dos leucócitos e sua subsequente passagem pela camada de células endoteliais. A expressão de VCAM-1 pode ser modulada por NF κ B e sua redução de expressão mediada pela Talidomida pode ser resultado da atuação sobre este fator de transcrição (Gearing *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 1997).

Após tratamento com Talidomida, a expressão gênica de PTX3 apresentou redução estatisticamente significativa nos casos analisados, embora para dois casos a reação de RT - PCR em tempo real tenha sido negativa para esta molécula. Acrescenta-se, ainda, que nas análises protéicas por imunohistoquímica, houve redução da imunomarcação, embora a análise por *western blotting* não tenha apresentado diferença significativa em sua expressão.

Em trabalho recente do nosso grupo, onde avaliamos a expressão gênica de monócitos estimulados por LPS *in vitro* diante do tratamento com Talidomida, também identificamos e validamos a PTX3 como um dos principais genes modulados negativamente (Paiva *et al.*, 2012).

As Pentraxinas (PTXs) são uma superfamília de proteínas conservadas multifuncionais, algumas das quais são componentes da resposta humoral da imunidade inata e se comportam como ancestrais funcionais dos anticorpos (Acs). Elas são conhecidas como proteínas de fase aguda clássicas, conhecidas pela raça humana por mais de um século (Martinez De La Torre *et al.*, 2010).

A PTX3 também vem sendo apontada como um possível marcador de inflamação vascular, já que embora os seus níveis plasmáticos sejam muito baixos em indivíduos normais, eles se apresentam aumentados em condições inflamatórias, resultando em uma ampla gama de estados patológicos que variam de infecções a doenças autoimunes e / ou degenerativas (Okutani, 2006). Além disso, a PTX3 é produzida a partir de células endoteliais vasculares e macrófagos, e os seus níveis podem diretamente refletir o estado inflamatório. Devido a sua síntese extra-hepática, seus níveis são acreditados para ser um verdadeiro indicador inflamatório independente da atividade da doença (Fazzini *et al.*, 2001).

A PTX3 foi originalmente clonada em células endoteliais como um gene indutor de IL-1 β e em fibroblastos como um gene indutor de TNF (Lee *et al.*, 1994). Dessa forma, sinais pró-inflamatórios primários induzem a expressão de PTX3 em diferentes tipos de células e, em particular, em células endoteliais, monócitos / macrófagos (Alles *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Ambos os tipos celulares desempenham um papel central na patogênese da vasculite sistêmica (Kallenberg e Tervaert, 1999; Harper e Savage, 2000; Lentsch e Ward, 2000). Com isso, PTX3 pode, portanto, representar um candidato para o acompanhamento local do envolvimento inflamatório em pacientes com vasculites sistêmicas (Fazzini *et al.*, 2001).

A PTX3 é produzida por exposição a estímulos pró-inflamatórios, como: receptor Toll-like - TLR, citocinas (TNF, IL-1 β) e constituintes microbianos específicos (LPS, lipoarabinomananas, proteínas da membrana externa) (Lee, Lee e Vilcek, 1993). Curiosamente, o IFN- γ reduz a produção de PTX3 por células dendríticas, monócitos e macrófagos por meio da inibição da sua transcrição e redução da estabilidade dos transcritos (Goodman *et al.*, 2000; Doni *et al.*, 2006).

A presença da PTX3 nas lesões de ENH e sua redução após o tratamento podem ser resultado da ação sobre o endotélio vascular, uma vez que essa modulação é um evento clássico neste episódio reacional e é um dos sinais de melhora a serem notados histologicamente nas lesões regredidas após o tratamento com a Talidomida.

Tanto SOCS3 como Caspase 1 não apresentaram redução estatisticamente significativa da expressão gênica nas lesões de pele de paciente com ENH após tratamento com a Talidomida .

As proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) são inibidores intracelulares que atuam em um ciclo de feedback negativo clássico (Croker *et al.*, 2004). A SOCS3 pode apresentar profundos efeitos sobre a regulação da imunidade e inflamação, afetando a ativação, desenvolvimento e funções homeostáticas de todas as linhagens envolvidas nas respostas imunes e inflamatórias (O'shea e Murray, 2008). O aumento da expressão de SOCS3 nas lesões de ENH pode ser sinal da ativação de mecanismos que limitam a inflamação no tecido, uma vez que esta pode ser ativada por estímulos de citocinas pró-inflamatórias.

Em 2005, Ajith *et al.* demonstraram haver uma correlação entre carga bacilar e apoptose em lesões multibacilares (Ajith *et al.*, 2005). A presença de CASP-1 nas lesões de ENH pode ser um indicativo de apoptose. Dessa forma, o excesso de células em apoptose e a sua remoção tardia também podem ser um possível mecanismo de ativação de processos inflamatórios.

Os inflamassomas são complexos multiproteicos intracelulares que atuam na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) como uma estrutura essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de perigo a diferentes componentes. Dessa forma, formam plataformas moleculares que permitem a dimerização, ativação e autoproteólise da CASP-1 (Martinon, Burns e Tschopp, 2002; Ogura, Sutterwala e Flavell, 2006; Dostert, Meylan e Tschopp, 2008)).

A CASP-1 ativa é responsável por regular a secreção de várias proteínas que não possuem um peptídeo sinal e não exigem a via clássica retículo endoplasmático / Golgi - dependente para a sua liberação (Keller *et al.*, 2008). Estas proteínas estão envolvidas na inflamação, citoproteção, apoptose e angiogênese. Originalmente, a CASP-1 foi identificada como um ativador de citocinas pró-inflamatórias pró IL-1 β e pró IL-18, que também não possuem um peptídeo sinal (Ogura, Sutterwala e Flavell, 2006; Dostert, Meylan e Tschopp, 2008).

A CASP-1 também pode estar envolvida na ativação do inflamassoma. O aumento local da caspase-1 zimogênea, através de dimerização, aumenta a atividade catalítica necessária para iniciar a sua própria ativação por autoproteólise. Uma vez proteolisada, as subunidades da caspase-1 p20 e p10 se montam em dímeros p20 / p10 enzimaticamente ativos que clivamos substratos de caspase-1, tais como pró-IL-1 β e pró-IL-18 (Walker *et al.*, 1994; Elliott *et al.*, 2009).

Em vista disso, a ativação do inflamassoma pode ser um potencial evento responsável pelos elevados níveis de IL-1 β no ENH. Em processos inflamatórios, onde a presença do inflamassoma é crucial, pode ser também um potencial alvo para a aplicação da Talidomida ou de seus análogos.

Como a atividade da CASP-1 conecta inflamação com angiogênese, e ambos os processos são inibidos *in vivo* pela Talidomida. Uma redução de expressão destas proteínas do inflamassoma (CASP-1, ASC, NALP- 1/3, tripartite motif-16) inibe a sua ativação e, por sua vez, a secreção de proteínas não-convencionais (Feldmeyer *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2008; Nickel e Rabouille, 2009). Entretanto, Keller *et al.* (2009), demonstraram que o efeito inibidor da Talidomida não foi devido à supressão da expressão de proteínas do inflamassoma (Keller, Sollberger e Beer, 2009).

Dessa forma, a redução da expressão gênica da CASP-1 após o tratamento sugere que o inflamassoma possa estar envolvido no episódio do ENH, envolvendo não apenas componentes bacterianos que poderiam ativar os TLRs como primeiro sinal, assim como moléculas ativas tissulares como um segundo sinal que juntas induziriam a ativação da pró-caspase1 em caspase1 e liberação de IL-1 β , indutor da resposta inflamatória.

O dado de que a CASP-1 foi um gene identificado pelo microarranjo no ENH e reduzido pela Talidomida fortalecem esta hipótese; além do fato do ENH poder ocorrer em indivíduos em que não há evidência de multiplicação celular, sugerindo fortemente a interação de componentes estocados no tecido que em circunstâncias especiais desencadeariam esses episódios. Esta hipótese, entretanto, deve ser adequadamente explorada através de estudos desenhados para a sua confirmação.

De um modo geral, os dados gerados por este trabalho fornecem novos alvos moleculares presentes no ENH e que são modulados pela ação da Talidomida, favorecendo uma melhor compreensão da imunopatogênese observada durante este episódio reacional, bem como a atuação da Talidomida na resolução deste quadro clínico, de forma indicar a possibilidade de surgimento de novos surtos reacionais.

7. Conclusão

O enriquecimento (processos de normalização, filtragem e análise estatística) da lista de genes, oriundos dos resultados de expressão gênica global previamente realizado, proveniente de lesões de pele de pacientes com ENH no momento do diagnóstico e após uma semana de tratamento com Talidomida, nos permitiu chegar a uma lista com os 100 principais genes envolvidos em vias de sinalização e processos biológicos envolvidos na imunopatogênese da injúria tecidual ocasionada por este episódio reacional e identificados como negativamente modulados após 7 dias de tratamento com o fármaco.

Desses 100 genes, selecionados 10 alvos moleculares (MMP1, PTX3, SOCS3, VCAM-1, CYR61, TNC, THBS1, FCGR3a, CASP1, ADAM12) para este estudo, no qual obedecem a critérios referentes a posição ocupada em relação a sua expressão gênica reduzida após 7 dias de tratamento com a Talidomida, suas funções biológicas descritas na literatura e a correlação com os fenômenos descritos no ENH.

Os resultados referentes à validação funcional, realizada pelas técnicas de RT-PCR em tempo real, WB e IH, dos 10 alvos moleculares selecionados demonstram relevância clínica, e descrevem pela primeira vez o perfil de expressão gênica e proteica nessas lesões de pele de pacientes com ENH após 7 dias de tratamento com a Talidomida.

Dessa forma, é possível afirmar que a Talidomida promove a modulação negativa da expressão gênica de moléculas envolvidas nos processos de ativação e migração celular (CYR61, THBS1 e PTX3); quanto na redução da expressão proteica de moléculas envolvidas nos processos de remodelamento (TNC) e alterações (VCAM-1) da matriz extracelular, e nos fenótipos celulares presentes nos sítios das lesões inflamatórias (CD16a).

Em suma, nossos dados favorecerão uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese observada durante o ENH, bem como dos mecanismos de ação da Talidomida na resolução deste quadro clínico, de forma a indicar a possibilidade de surgimento de novos surtos reacionais, podendo acrescentar na literatura novos alvos moleculares em que a Talidomida possa atuar. Além da transposição destes dados para outras patologias, o que poderia abrir novas indicações clínicas para o seu uso, bem como de seus análogos, mediante estudos específicos.

8. Referências Bibliográficas

ADAMS, J. C.; LAWLER, J. The thrombospondins. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 6, p. 961-8, Jun 2004. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094109> >.

ADHE, V.; DONGRE, A.; KHOPKAR, U. A retrospective analysis of histopathology of 64 cases of lepra reactions. **Indian J Dermatol**, v. 57, n. 2, p. 114-7, Mar 2012. ISSN 1998-3611. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22615507> >.

AJITH, C. et al. Study of apoptosis in skin lesions of leprosy in relation to treatment and lepra reactions. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 73, n. 4, p. 269-76, Dec 2005. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16830636> >.

ANDRADE, V. L. G. Evolução da hanseníase no Brasil e perspectivas para sua eliminação como um problema de saúde pública [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública / FIOCRUZ; 102 p., Jun 1996. Disponível em: <http://hansen.bvs.isl.br/textoc/teses/ANDRADE_VERA/PDF/ANDRADE_VERA.pdf>

ALLES, V. V. et al. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. **Blood**, v. 84, n. 10, p. 3483-93, Nov 15 1994. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking).

ANDERSSON, J. O.; ANDERSSON, S. G. Insights into the evolutionary process of genome degradation. In: (Ed.). **Curr Opin Genet Dev**. England, v.9, 1999. p.664-71. ISBN 0959-437X (Print) 0959-437X (Linking).

ANDRADE, A. R. C.; LEHMAN, L. F.; SCHREUDER, P.A. M. Como reconhecer e tratar reações hanseníacas. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte; 2005.

ANVISA. FUNED Talidomida (bula). 2015. Acessado em 20 de Dez, 2015. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/talidomida/bula_talidomida.pdf

AZULAY, R. D. Dermatologia. Guanabara Koogan. 5ª edição. Rio de Janeiro, 2011. BASOMBRIO, G.; PRIETO, J. G.; KITAMURA, K.; RABELLO, S. E. A.; WADE, H. W.; COCHRANE, R. G.; KHANOLKAR, V. R.; LATAPI, S.; VEGAS, M.; ARNOLD, H. Draft report of classification committee. In: Congreso Internacional de Leprologia, 6º, Madrid, 1953. **Memoria**. Madrid, Gobierno de España. Asociación Internacional de la Lepra, 1953. p. 75-8.

BARNES, P. F. et al. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infect Immun**, v. 60, n. 4, p. 1441-6, Apr 1992. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking).

BATISTA, M. D. et al. Leprosy reversal reaction as immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 6, p. e56-60, Mar 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269334> >.

BAUER, E. M. et al. Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation. **Cardiovasc Res**, v. 88, n. 3, p. 471-81, Dec 2010. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610415> >.

BECX-BLEUMINK M, BERHE D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and rehabilitation training center (ALERT) in Ethiopia. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**; 60: p. 173-184, 1992.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 1-5, Jan 2007. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032697> >.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 64, n. 5 Suppl, p. 474-84, May 1993. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315570> >.

BORNEMAN, A.; KUSCHEL, R.; FUJISAWA-SEHARA, A. Analysis for transcript expression of meltrin alpha in normal, regenerating, and denervated rat muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 21, n. 5, p. 475-80, 2000. ISSN 0142-4319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129438> >.

BORNSTEIN, P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. **J Clin Invest**, v. 107, n. 8, p. 929-34, Apr 2001. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306593> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRELLIER, F.; CHIQUET-EHRISMANN, R. How do tenascins influence the birth and life of a malignant cell? **J Cell Mol Med**, v. 16, n. 1, p. 32-40, Jan 2012. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692981> >.

BURROUGHS, M. H. et al. Effect of thalidomide on the inflammatory response in cerebrospinal fluid in experimental bacterial meningitis. In: (Ed.). **Microb Pathog**. England, v.19, 1995. p.245-55. ISBN 0882-4010 (Print) 0882-4010 (Linking).

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1991-5, May 2003. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734239> >.

BÜHER-SÉKULA, S. Sorologia PGL 1 na hanseníase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 41: p. 3-5, 2008

BURNS, T.; BREATHNACH, S.; COX, N.; GRIFFITHS, C. editors Rook's Textbook. of Dermatology. 7th. ed, Oxford: Blackwell Sciences Ltd, Massachusetts 2004; p.29.1- 29.2

CARDOSO, C. C. et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. In: (Ed.). **J Infect Dis**. United States, v.204, 2011. p.1256-63. ISBN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking).

CAVAR, S. et al. Endoglin (CD 105) as a potential prognostic factor in neuroblastoma. **Pediatr Blood Cancer**, Feb 12 2015. ISSN 1545-5017 (Electronic)

1545-5009 (Linking).

CHIQUET-EHRISMANN, R. et al. Tenascins in stem cell niches. **Matrix Biol**, v. 37, p. 112-23, Jul 2014. ISSN 1569-1802. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472737> >.

CHO, S. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun* 1983; 41(3): 1077-83.

COCITO, C.; DELVILLE, J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. **Eur J Epidemiol**, v. 1, n. 3, p. 202-31, Sep 1985. ISSN 0393-2990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2429862> >.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, Feb 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234002> >.

CORRAL, L. G. et al. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. **J Immunol**, v. 163, n. 1, p. 380-6, Jul 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384139> >

COX, T. R.; ERLER, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. **Dis Model Mech**, v. 4, n. 2, p. 165-78, Mar 2011. ISSN 1754-8411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324931> >.

CROKER, B. A. et al. SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. **Immunity**, v. 20, n. 2, p. 153-65, Feb 2004. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14975238> >.

CUNHA, S. S. et al. Design of the leprosy component of the Brazilian BCG revaccination trial for assessing BCG effectiveness against leprosy in school children. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 72, n. 1, p. 8-15, Mar 2004. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217320> >.

D'AMATO, R. J. et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 9, p. 4082-5, Apr 26 1994. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

DAFFE, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Adv Microb Physiol**, v. 39, p. 131-203, 1998. ISSN 0065-2911 (Print) 0065-2911 (Linking).

DAVEY, T. F.; REES, R. J. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Lepr Rev**, v. 45, n. 2, p. 121-34, Jun 1974. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).

DAVIES, F. E. et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 210-6, Jul 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking).

DA SILVA ROCHA, A. et al. Drug and multidrug resistance among Mycobacterium leprae isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *J Clin Microbiol*, v. 50, n. 6, p. 1912-7, Jun 2012. ISSN 0095-1137.

DE CARVALHO, D. S. et al. Patents in targets and drugs for unbalanced cytokine and chemokine network mediated disorders. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 1, n. 3, p. 176-82, Nov 2007. ISSN 1872-213X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075980> >.

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, S. D. C., TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, M.NISTÉRIO DA SAÚDE. [Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health]. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 1, p. 200-2, Feb 2010. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140346> >.

DESIKAN, K. V. Viability of Mycobacterium leprae outside the human body. **Lepr Rev**, v. 48, n. 4, p. 231-5, Dec 1977. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/400807> >.

DESIKAN, K. V.; SREEVATSA. Extended studies on the viability of Mycobacterium leprae outside the human body. **Lepr Rev**, v. 66, n. 4, p. 287-95, Dec 1995. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637382> >.

DONI, A. et al. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 4, p. 797-802, Apr 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461742> >.

DOSTERT, C.; MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. Intracellular pattern-recognition receptors. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 7, p. 830-40, Apr 2008. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280002> >.

DUNCAN, M. E. et al. A clinical and immunological study of four babies of mothers with lepromatous leprosy, two of whom developed leprosy in infancy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 51, n. 1, p. 7-17, Mar 1983. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking).

DÜPPRE, N. C. et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 7, p. 631-8, Jul 2008. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514242> >.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade*, v. 13, n. 2, p. 76-88, Maio-Ago 2004.

ELLIOTT, J. M. et al. Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 10, p. 6546-53, Mar 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19117953> >.

FAURE, M.; THIVOLET, J.; GAUCHERAND, M. Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide. **Arch Dermatol Res**, v. 269, n. 3, p. 275-80, 1980. ISSN 0340-3696 (Print) 0340-3696 (Linking).

FAZZINI, F. et al. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 12, p. 2841-50, Dec 2001. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762945> >.

FELDMAN, N.; ROTTER, A.; OKUN, E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. **Ageing Res Rev**, Jan 2015. ISSN 1872-9649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25641058> >.

FELDMEYER, L. et al. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. **Curr Biol**, v. 17, n. 13, p. 1140-5, Jul 2007. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600714> >.

FIOCRUZ., Saúde e ciência para todos. Hanseníase. **Agência Fiocruz de Notícias**, 2013. Acesso em: 20-10-2014. <http://www.agencia.fiocruz.br/hansenia>

FINE, H. A. et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 4, p. 708-15, Feb 2000. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673511> >.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.363, 2004. p.1802-11. ISBN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

FITZPATRICK. Dermatology in general medicine. 2008. 7ª th Ed / Klaus Wolff et al. 2402pp.

FLEURY, R. N. Critérios para o emprego de classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica (Primeira parte). **Hansen. Int.** 30, p. 40-45, 2005.

FLEURY, R. N. Critérios para o emprego da classificação de Ridley e Jopling na rotina de laboratórios de anatomia patológica (segunda parte). **Hansen Int.**31: p. 47-51, 2006.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto, Hanseníase.* 30: p. 355-339 jul./set, 1997.

FOSS, N. T.; SOUZA, C. S.; GOULART, I. M. B.; GONÇALVES, H. S.; VIRMOND, M. Hanseníase: Episódios reacionais. **Projeto Diretrizes**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2003.

GALLO, M. E. N.; NERY, J. A. C.; GARCIA, C. C. Intercorrências pelas drogas utilizadas nos esquemas poliquimioterápicos em hanseníase. **Hansen. Int.** 20: p. 46-50, 1995.

GALLO, M. E. N.; OLIVEIRA, M. L. W. Recidivas e reinfeccão em hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto* 1997; 30:351-357.

GALLO, M. E. N.; ALVIM, M. F. S.; NERY, J. A. C.; ALBUQUERQUE, E. C. A. Estudo comparativo com dois esquemas poliquimioterápicos (duração fixa) em hanseníase multibacilar – seguimento de 50,32 ± 19,62 e 39,70 ± 19,47 meses. *Hansen Int* 1997; 22:5-14.

GARBINO, J. A., JARDIM, M. R., MARQUES, J. R. W, ANTUNES, S. L., SOARES, C. T., HEISE, C. O., ET AL. Hanseníase neural primária. Sociedade Brasileira de Hansenologia. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Academia Brasileira de Neurologia. **Projeto Diretrizes**, 2011.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G. Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord. **Exp Neurol**, v. 258, p. 24-34, Aug 2014. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017885> >.

GEARING, A. J. et al. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 667, p. 324-31, Dec 4 1992. ISSN 0077-8923 (Print)
0077-8923 (Linking).

GEITZ, H.; HANDT, S.; ZWINGENBERGER, K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. **Immunopharmacology**, v. 31, n. 2-3, p. 213-21, Mar 1996. ISSN 0162-3109 (Print)
0162-3109 (Linking).

GHORPADE, A. Ornamental tattoos and skin lesions. Tattoo inoculation borderline tuberculoid leprosy. In: (Ed.). **Int J Dermatol**. United States, v.48, 2009. p.11-3. ISBN 1365-4632 (Electronic)
0011-9059 (Linking).

GINSBURG, P. M.; HANAN, I.; EHRENPREIS, E. D. Treatment of severe esophageal Crohn's disease with thalidomide. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 4, p. 1305-6, Apr 2001. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316198> >.

GODAL, T. et al. Evidence that the mechanism of immunological tolerance ("central failure") is operative in the lack of host resistance in lepromatous leprosy. **Scand J Immunol**, v. 1, n. 4, p. 311-21, 1972. ISSN 0300-9475. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4590279> >.

GOH, F. G. et al. Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. **J Immunol**, v. 184, n. 5, p. 2655-62, Mar 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107185> >.

GOODMAN, A. R. et al. Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 3, p. 387-95, Mar 2000. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733100> >.

GOULART, I. M. et al. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Arch Dermatol Res**, v. 299, n. 5-6, p. 267-71, Aug 2007. ISSN 0340-3696 (Print)
0340-3696.

GREENLEE, K. J.; WERB, Z.; KHERADMAND, F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 69-98, Jan 2007. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237343> >.

GROSSET, J. The new challenges for chemotherapy research. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S100-4, Dec 2000. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201863> >.

GUPTA, M. K.; QIN, R. Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 6, p. 1144-55, Jun 2003. ISSN 1007-9327 (Print)
1007-9327 (Linking).

HARPER, L.; SAVAGE, C. O. Pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. In: (Ed.). **J Pathol**. England: 2000 John Wiley & Sons, Ltd., v.190, 2000. p.349-59. ISBN 0022-3417 (Print) 0022-3417 (Linking).

HARSHA, A. et al. ADAM12: a potential target for the treatment of chronic wounds. **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 8, p. 961-9, Aug 2008. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604515> >.

HASLETT, P. A. et al. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. **J Infect Dis**, v. 192, n. 12, p. 2045-53, Dec 2005. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288366> >.

HASLETT, P. A. et al. Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 15, n. 13, p. 1169-79, Sep 1 1999. ISSN 0889-2229 (Print) 0889-2229 (Linking).

HASLETT, P. A. et al. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. **J Infect Dis**, v. 192, n. 12, p. 2045-53, Dec 2005. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288366> >.

HASTINGS, R. C. Leprosy. **Churchill Livingstone**, Singapore, 1994.

HASTINGS, R. C. MDT and transmission. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. Jun;66(2):224, 1998.

HERNANDEZ, M. E. O. et al. Thalidomide modulates Mycobacterium leprae-induced NF- κ B pathway and lower cytokine response. **Eur J Pharmacol**, v. 670, n. 1, p. 272-9, Nov 2011. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925494> >.

HIDESHIMA, T. et al. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. **Oncogene**, v. 20, n. 33, p. 4519-27, Jul 27 2001. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking).

HIDESHIMA, T. et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 2943-50, Nov 1 2000. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking).

HOGG, N. The structure and function of Fc receptors. In: (Ed.). **Immunol Today**. England, v.9, 1988. p.185-7. ISBN 0167-5699 (Print) 0167-5699 (Linking).

HUANG, Y. K. et al. Annexin A2 and CD105 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with tumor recurrence and prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 22, p. 9921-6, 2014. ISSN 1513-7368 (Print) 1513-7368 (Linking).

HUMMON, A. B. et al. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. **Biotechniques**, v. 42, n. 4, p. 467-

70, 472, Apr 2007. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17489233> >.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J Bacteriol**, v. 147, n. 3, p. 728-35, Sep 1981. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7024248> >.

HUSSAIN, R. et al. Clinical and histological discrepancies in diagnosis of ENL reactions classified by assessment of acute phase proteins SAA and CRP. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 63, n. 2, p. 222-30, Jun 1995. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7602217> >.

HWANG, S. J. et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. **Circulation**, v. 96, n. 12, p. 4219-25, Dec 16 1997. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322 (Linking).

IMANAKA-YOSHIDA, K. Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling: from development to inflammation and repair. **Circ J**, v. 76, n. 11, p. 2513-20, 2012. ISSN 1347-4820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064399> >.

IMANAKA-YOSHIDA, K.; YOSHIDA, T.; MIYAGAWA-TOMITA, S. Tenascin-C in development and disease of blood vessels. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 297, n. 9, p. 1747-57, Sep 2014. ISSN 1932-8494. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25125186> >.

ITO, T. et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science**, v. 327, n. 5971, p. 1345-50, Mar 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223979> >.

IYER, C. G. et al. WHO co-ordinated short-term double-blind trial with thalidomide in the treatment of acute lepra reactions in male lepromatous patients. **Bull World Health Organ**, v. 45, n. 6, p. 719-32, 1971. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4947831> >.

JACOBSON, J. M. et al. Thalidomide in low intermittent doses does not prevent recurrence of human immunodeficiency virus-associated aphthous ulcers. In: (Ed.). **J Infect Dis**. United States, v.183, 2001. p.343-346. ISBN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking).

JAFFE, E. A.; RUGGIERO, J. T.; FALCONE, D. J. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 79-84, Jan 1985. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3965054> >

JL, B. H. Drug resistance in leprosy--a review. **Lepr Rev**, v. 56, n. 4, p. 265-78, Dec 1985. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3908861> >.

JIN, S. H. et al. Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of HuR. **Eur J Pharmacol**, v. 558, n. 1-3, p. 14-20, Mar 2007. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208222> >.

JOB, C. K.; GUDE, S.; MACADEN, V. P. ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM. A CLINICO-PATHOLOGIC STUDY. **Int J Lepr**, v. 32, p. 177-84, 1964 Apr-Jun 1964. ISSN 0020-7349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14203324> >.

JOPLING, W. H. Reactions in leprosy. **Lepr Rev**, v. 41, n. 1, p. 62-3, Jan 1970. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5441929> >.

JOPLING, W. H., MC DOUGALL, A. C. Handbook of leprosy – 4th ed. 180 pg. 1998.

KAHAWITA, I. P.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **An Bras Dermatol** 2008; 83:75-82.

KALLENBERG, C. G.; TERVAERT, J. W. What is new with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: diagnostic, pathogenetic and therapeutic implications. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 8, n. 3, p. 307-15, May 1999. ISSN 1062-4821 (Print) 1062-4821 (Linking).

KAMATH, S. et al. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 71, n. 4, p. 795-803, Oct 2014. ISSN 1097-6787 (Electronic) 0190-9622 (Linking).

KAPLAN, G. Potential of thalidomide and thalidomide analogues as immunomodulatory drugs in leprosy and leprosy reactions. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S117-20, Dec 2000. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201867> >.

KAWAMATA, A. et al. Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. **Oncol Rep**, v. 16, n. 6, p. 1231-6, Dec 2006. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089043> >.

KEIFER, J. A. et al. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. In: (Ed.). **J Biol Chem**. United States, v.276, 2001. p.22382-7. ISBN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

KELLER, M. et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v. 132, n. 5, p. 818-31, Mar 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329368> >.

KELLER, M.; SOLLBERGER, G.; BEER, H. D. Thalidomide inhibits activation of caspase-1. **J Immunol**, v. 183, n. 9, p. 5593-9, Nov 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843943> >.

KIGERL, K. A. et al. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. **Exp Neurol**, v. 258, p. 5-16, Aug 2014. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25017883> >.

KIM, M. Y. et al. Selection and characterization of tenascin C targeting peptide. **Mol Cells**, v. 33, n. 1, p. 71-7, Jan 2012. ISSN 0219-1032. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138765> >.

KLAUSNER, J. D.; FREEDMAN, V. H.; KAPLAN, G. Thalidomide as an anti-TNF-alpha inhibitor: implications for clinical use. In: (Ed.). **Clin Immunol Immunopathol**. United States, v.81, 1996. p.219-23. ISBN 0090-1229 (Print) 0090-1229 (Linking).

KLAUSNER, J. D. et al. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and M. tuberculosis infection. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 11, n. 3, p. 247-57, Mar 1 1996. ISSN 1077-9450 (Print) 1077-9450 (Linking).

KNOBLOCH, J. et al. Thalidomide induces limb anomalies by PTEN stabilization, Akt suppression, and stimulation of caspase-dependent cell death. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 2, p. 529-38, Jan 2008. ISSN 1098-5549. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178729> >.

KUMAR, P.; WANG, J. M.; BERNABEU, C. CD105 and angiogenesis. **J Pathol**; 178: p.363-366.; 1996.

KURISAKI, T. et al. Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin alpha (ADAM12) and beta (ADAM19) in mouse embryo. **Mech Dev**, v. 73, n. 2, p. 211-5, May 1998. ISSN 0925-4773. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622634> >.

KURISAKI, T. et al. Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 1, p. 55-61, Jan 2003. ISSN 0270-7306. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482960> >.

LAFERTE, J. et al. Ultramicroelisa para la detección de anticuerpos IgM anti *M. leprae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 3(6): 491-5.

LAU, L. F. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 19, p. 3149-63, Oct 2011. ISSN 1420-9071. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805345> >.

LAVANIA, M. et al. Detection of viable Mycobacterium leprae in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infect Genet Evol**, v. 8, n. 5, p. 627-31, Sep 2008. ISSN 1567-1348. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599381> >.

LE PABIC, H. et al. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1056-66, May 2003. ISSN 0270-9139. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717386> >.

LEE, D. J. et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. **J Infect Dis**, v. 201, n. 4, p. 558-69, Feb 2010. ISSN 1537-6613. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070238> >.

LEE, G. W. et al. Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. **J Immunol**, v. 153, n. 8, p. 3700-7, Oct 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking).

LEE, G. W.; LEE, T. H.; VILCEK, J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. **J Immunol**, v. 150, n. 5, p. 1804-

12, Mar 1993. ISSN 0022-1767. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679696>>.

LEGENDRE, D. P.; MUZNY, C. A.; SWIATLO, E. Hansen's disease (Leprosy): current and future pharmacotherapy and treatment of disease-related immunologic reactions. **Pharmacotherapy**, v. 32, n. 1, p. 27-37, Jan 2012. ISSN 1875-9114. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392826>>.

LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Regulation of inflammatory vascular damage. In: (Ed.). **J Pathol**. England: 2000 John Wiley & Sons, Ltd., v.190, 2000. p.343-8. ISBN 0022-3417 (Print) 0022-3417 (Linking).

LEVY, L. et al. Treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide. **Lancet**, v. 2, n. 7824, p. 324-5, Aug 1973. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4124808>>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>.

LOCKWOOD, D. N. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. **Lepr Rev**, v. 67, n. 4, p. 253-9, Dec 1996. ISSN 0305-7518. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9033196>>.

LOKENS GARD, J. R. et al. Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. In: (Ed.). **J Infect Dis**. United States, v.182, 2000. p.983-7. ISBN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking).

LOMBARDI, C.; MARTELLI, C. M. T.; SILVA, S. A.; SUAREZ, R. E. G. La eliminacion de la lepra de las Americas: Situacion actual y perspectivas. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**. 4(3): p. 149-55, 1998.

LOPEZ-DEE, Z.; PIDCOCK, K.; GUTIERREZ, L. S. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2011, p. 296069, 2011. ISSN 1466-1861. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765615>>.

LUCAS, S. Bacterial diseases. In: David E, Rosalie E, Bennett J, George M, fors. **Lever's histopathology of the skin**. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; .p. 575, 2005.

LOPEZ-TALAVERA, J. C. et al. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. In: (Ed.). **Hepatology**. United States, v.23, 1996. p.1616-21. ISBN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking).

MABALAY, M. C. et al. THE HISTOPATHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY OF ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM. **Int J Lepr**, v. 33, p. 28-49, 1965 Jan-Mar 1965. ISSN 0020-7349. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14282354>>.

MAJUMDAR, S.; LAMOTHE, B.; AGGARWAL, B. B. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. **J Immunol**, v. 168, n. 6, p. 2644-51, Mar 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking).

MAKONKAWKEYOON, S. et al. Thalidomide inhibits the replication of human immunodeficiency virus type 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 13, p. 5974-8, Jul 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327469> >.

MANANDHAR, R.; LEMASTER, J. W.; ROCHE, P. W. Risk factors for erythema nodosum leprosum. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, n. 3, p. 270-8, Sep 1999. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575406> >.

MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. de A.; PENNA, G. O.; ANDRADE, A. L. S. S. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. **Rev. bras. epidemiol**, v.5, n.3, p. 273-285, 2002. ISSN 1980-5497.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3154-9, Sep 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954241> >.

MARTINEZ, A. N. et al. Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 7, p. 2124-30, Jul 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439537> >.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, p. e1354, Oct 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022631> >.

MARTINEZ DE LA TORRE, Y. et al. Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5055-64, May 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357257> >.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191486> >.

MATSUOKA, M. et al. Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. **Indian J Lepr**, v. 71, n. 1, p. 61-7, 1999 Jan-Mar 1999. ISSN 0254-9395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10439326> >.

MAZZOCCOLI, L.; CADOSO, S. H.; AMARANTE, G. W.; DE SOUZA, M. V.; DOMINGUES, R.; MACHADO, M. A.; DE ALMEIDA, M. V.; TEIXEIRA, H. C. Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. **Biomed Pharmacother**. Jul;66(5): p.323-9, 2012.

MAURUS, J. N. Hansen's disease in pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 52, n. 1, p. 22-5, Jul 1978. ISSN 0029-7844 (Print)
0029-7844 (Linking).

MEDICINE MAN: The Forgotten Museum of Henry Wellcome. **British Museum Press**. Edited by Ken Arnold and Danielle Olsen, 416 pp.

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D.; MELO, G. E. B. A.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da hanseníase. **An Bras Dermatol** ; 83: p.343-350, 2008.

MIDWOOD, K. S. et al. Advances in tenascin-C biology. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 19, p. 3175-99, Oct 2011. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818551> >.

MIDWOOD, K. S.; OREND, G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. **J Cell Commun Signal**, v. 3, n. 3-4, p. 287-310, Dec 2009. ISSN 1873-961X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19838819> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SPS/ DGPE/ ATDS. Manual de Procedimentos para a Execução das Atividades de Controle da Hanseníase. Ministério da Saúde - Brasil, 83p., 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Guia para controle da Hanseníase. 3ª edição; 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de vigilância em Saúde. Portaria conjunta nº 125 de 26 de março de 2009. Define ações de controle de hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. PORTARIA 3.125 de 7 de Outubro de 2010. Acesso em: Dez - 2014. Disponível em: www.anvisa.gov.br/hotsite/talidomida/legis/portaria_n_3125_hanseniase_2010.pdf

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual de prevenção de incapacidades / elaboração: área técnica de dermatologia, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em Saúde. Portaria conjunta nº 125 de 26 de março de 2009. Define ações de controle de hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 4, p. 589-620, Dec 2010. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119019> >.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. In: (Ed.). **Science**. United States, v.308, 2005. p.1040-2. ISBN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

MORAES, M. O. et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). In: (Ed.). **Scand J Immunol**. England, v.50, 1999. p.541-9. ISBN 0300-9475 (Print) 0300-9475 (Linking).

MORAES, M. O. et al. Anti-Inflammatory Drugs Block Cytokine mRNA Accumulation in the Skin and Improve the Clinical Condition of Reactional Leprosy Patients. **J Invest Dermatol**, v. 115, n. 6, p. 935-941, 12//print 2000. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00158.x> >.

MOREIRA, A. L. et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med**, v. 177, n. 6, p. 1675-80, Jun 1993. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8496685> >.

MOREIRA, A. L. et al. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 10, p. 1199-207, Oct 1997. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking).

MOREIRA, A. L. et al. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. **Tuber Lung Dis**, v. 78, n. 1, p. 47-55, 1997. ISSN 0962-8479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666962> >.

MOREIRA, A. L. et al. Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro. **J Neurooncol**, v. 43, n. 2, p. 109-14, Jun 1999. ISSN 0167-594X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10533722> >.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L. W.; BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. *Rev da Soc Bras Med Trop*. 41(Sup II):11-8,2 008.

MUKHERJEE, R.; ANTIA, N. H. Host-parasite interrelationship between *M. leprae* and Schwann cells in vitro. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 54, n. 4, p. 632-8, Dec 1986. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking).

NATH, I. et al. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S130-7, Dec 2000. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking).

NERY, J. A. et al. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 6, p. 363-70, 1998 Nov-Dec 1998. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436656> >.

NERY, J. A. C.; DUPPRE, N. C.; SALLES, A. M.; JARDIM, M.; ILLARRAMENDI, X.; MACHADO, A. M. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais. *Uma abordagem prática*. *Na. Bras. Dermatol.* 81: p. 367-375, 2006.

NERY, J. A. et al. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 787-92, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173185> >.

NG, S. S. et al. Antitumor effects of thalidomide analogs in human prostate cancer xenografts implanted in immunodeficient mice. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 12 Pt 1, p. 4192-7, Jun 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217957> >.

NICKEL, W.; RABOUILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 148-55, Feb 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19122676> >.

NOGUEIRA, A. C. et al. Thalidomide and the immune system. 3. Simultaneous up- and down-regulation of different integrin receptors on human white blood cells. **Life Sci**, v. 55, n. 2, p. 77-92, 1994. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking).

NOORDEEN, S. K. Leprosy research and elimination. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S12-4, Dec 2000. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201868> >.

NOTO, S.; NUNZI, E. Global and regional annual 'new case detection' of leprosy reported by World Health Organization. **Lepr Rev**, v. 79, n. 2, p. 124-7, Jun 2008. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518.

NYREN-ERICKSON, E. K. et al. A disintegrin and metalloproteinase-12 (ADAM12): function, roles in disease progression, and clinical implications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4445-55, Oct 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680494> >.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-87, Apr 2008. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400190> >.

OGURA, Y.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 659-62, Aug 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923387> >.

OKUTANI, D. [The role of long pentraxin 3, a new inflammatory mediator in inflammatory responses]. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**, v. 29, n. 3, p. 107-13, Jun 2006. ISSN 0911-4300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819259> >.

OLIVEIRA, M. L. W.; OLIVEIRA, G. P., ANDRADE, V. L. G. Gradual setting up multidrug therapy in Brazil. **Int J Lepr** 1989; 57(Suppl.): 333

OLIVEIRA, R. B. et al. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. **J Leukoc Biol**, v. 65, n. 3, p. 364-71, Mar 1999. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Leprosy: The disease. 2012 Acesso em 10 de novembro de 2014. Disponível em: www.who.int/lep/leprosy/en

OSUGI, Y.; VUCKOVIC, S.; HART, D. N. Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. **Blood**, v. 100, n. 8, p. 2858-66, Oct 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking).

OPROMOLLA, P. A.; LAURENTI, R. Controle da hanseníase no Estado de São Paulo: análise histórica. **Rev. Saúde Pública**. v. 45. n. 1. São Paulo, 2011.

PAIVA, R. T. et al. A framework to identify gene expression profiles in a model of inflammation induced by lipopolysaccharide after treatment with thalidomide. **BMC Res Notes**, v. 5, p. 292, 2012. ISSN 1756-0500.

PALIT, A.; INAMADAR, A. C. Vasculitis: approach to diagnosis and therapy. **Indian J Dermatol Venereol Lepr**, v. 72, n. 5, p. 334-45, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 0973-3922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050926> >.

PARIKH, D. A.; GANAPATI, R.; REVANKAR, C. R. Thalidomide in leprosy--study of 94 cases. **Indian J Lepr**, v. 58, n. 4, p. 560-6, 1986 Oct-Dec 1986. ISSN 0254-9395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3572098> >.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-89, Jun 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403834> >.

PENNA, G. O. et al. Dermatological diseases of compulsory notification in Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 5, p. 865-77, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22147024> >.

PERBAL, B. CCN proteins: A centralized communication network. **J Cell Commun Signal**, v. 7, n. 3, p. 169-77, Aug 2013. ISSN 1873-9601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420091> >.

PFALTZGRAFF, R. E.; RAMU, G. Clinical leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 237-290.

PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators Inflamm**, v. 2010, 2010. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20706656> >.

POCATERRA, L. et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 5, p. 868-79, May 2006. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687695> >.

REED, M. J. et al. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 10, p. 1467-77, Oct 1993. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245406> >.

RESS, R. F. W. The microbiology of leprosy. In: Hastings, R.C (ed) *Leprosy*, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York. p. 31-52, 1985.

REYES-TERAN, G. et al. Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **AIDS**, v. 10, n. 13, p. 1501-7, Nov 1996. ISSN 0269-9370 (Print) 0269-9370 (Linking).

RICHARDSON, P.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. Thalidomide in multiple myeloma. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 3, p. 115-28, May 2002. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12046682> >.

RIDLEY, D. S. A bacteriologic study of erythema nodosum leprosum. **Int J Lepr**, v. 28, p. 254-66, Jul-Sep 1960. ISSN 0020-7349 (Print) 0020-7349 (Linking).

RIDLEY, D. S. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. **Bull World Health Organ**, v. 51, n. 5, p. 451-65, 1974. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4549496> >.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966 Jul-Sep 1966. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5950347> >.

RODRIGUES, G. B. et al. Preventive and therapeutic anti-inflammatory effects of systemic and topical thalidomide on endotoxin-induced uveitis in rats. In: (Ed.). **Exp Eye Res**. England, v.84, 2007. p.553-60. ISBN 0014-4835 (Print)
0014-4835 (Linking).

SAMPAIO, E. P. et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J Infect Dis**, v. 168, n. 2, p. 408-14, Aug 1993. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335978> >.

SAMPAIO, E. P. et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J Exp Med**, v. 173, n. 3, p. 699-703, Mar 1991. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1997652> >.

SANTOS, C.; FARIA, L.; MENEZES, R. F. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil: cenários de estigma e confinamento. *R. Bras. Est. Pop.*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 167-190, Jan-Jun 2008.

SAUNDERSON, P.; GEBRE, S.; BYASS, P. ENL reactions in the multibacillary cases of the AMFES cohort in central Ethiopia: incidence and risk factors. **Lepr Rev**, v. 71, n. 3, p. 318-24, Sep 2000. ISSN 0305-7518 (Print)
0305-7518 (Linking).

SCHOEMAN, J. F. et al. Adjunctive thalidomide therapy of childhood tuberculous meningitis: possible anti-inflammatory role. **J Child Neurol**, v. 15, n. 8, p. 497-503, Aug 2000. ISSN 0883-0738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961786> >.

SCHREUDER, P. A. M. et al. The ILA online Atlas of Leprosy. Atlas of leprosy.hasanmartino, 2012. Acessado em: dez-2014. Disponível em: <http://atlasofleprosy.hsanmartino.it/home.htm>

SCHULER, U.; EHNINGER, G. Thalidomide: rationale for renewed use in immunological disorders. **Drug Saf**, v. 12, n. 6, p. 364-9, Jun 1995. ISSN 0114-5916 (Print)
0114-5916 (Linking).

SCOLLARD, D. M.; MCCORMICK, G.; ALLEN, J. L. Localization of Mycobacterium leprae to Endothelial Cells of Epineurial and Perineurial Blood Vessels and Lymphatics. **The American Journal of Pathology**, v. 154, n. 5, p. 1611-1620, 5// 1999. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010654144> >.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de Dermatologia Sanitária do Município do Rio de Janeiro. Gerência de dermatologia sanitária Kédman Trindade Mello, 2012. Acessado em: dez-2014. Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=ETaWsY%2B00A4%3D>

SEHGAL, V. N. et al. The histopathology of type I (lepra) and type II (ENL) reactions in leprosy. **Indian J Lepr**, v. 58, n. 2, p. 240-3, 1986 Apr-Jun 1986. ISSN 0254-9395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3805796> >.

SHARPSTONE, D. et al. The treatment of microsporidial diarrhoea with thalidomide. **AIDS**, v. 9, n. 6, p. 658-9, Jun 1995. ISSN 0269-9370 (Print)
0269-9370 (Linking).

SHEPARD, C. C. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. **J Exp Med**, v. 112, n. 3, p. 445-54, Sep 1960. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867175> >.

SHEPARD, C. C.. Temperature optimum of Mycobacterium leprae in mice. **J Bacteriol**, v. 90, n. 5, p. 1271-5, Nov 1965. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5321481> >.

SHESKIN, J. The treatment of lepra reaction in lepromatous leprosy. Fifteen years' experience with thalidomide. **Int J Dermatol**, v. 19, n. 6, p. 318-22, 1980 Jul-Aug 1980. ISSN 0011-9059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7005131> >.

SHESKIN, J.; CONVIT, J. Results of a double blind study of the influence of thalidomide on the lepra reaction. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 37, n. 2, p. 135-46, 1969 Apr-Jun 1969. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4900407> >.

SHETTY, V. P.; WAKADE, A.; ANTIA, N. H. A high incidence of viable Mycobacterium leprae in post-MDT recurrent lesions in tuberculoid leprosy patients. **Lepr Rev**, v. 72, n. 3, p. 337-44, Sep 2001. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11715280> >.

SHI-WEN, X. et al. Endogenous endothelin-1 signaling contributes to type I collagen and CCN2 overexpression in fibrotic fibroblasts. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 625-32, Oct 2007. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681742> >.

SHIBATA, Y.; TAKIGUCHI, H.; ABIKO, Y. Antisense oligonucleotide of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 induces the plasminogen activator activity in periodontal ligament cells. **J Periodontol**, v. 70, n. 10, p. 1158-65, Oct 1999. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534069> >.

SHIMOJI, Y. et al. A 21-kDa surface protein of Mycobacterium leprae binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 17, p. 9857-62, Aug 17 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

SILVA SF, GRIEP R. Reação hansênica em pacientes portadores de hanseníase em centros de saúde da área de planejamento 3.2 do município do Rio de Janeiro. **Hansen Int**; 32: p. 155-162, 2007.

SOUZA, L. W. F. Leprosy reactions in discharged patients following cure by multidrug therapy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(6):737-739, nov-dez, 2010.

SREENIVASAN, P. et al. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. **Immunology**, v. 95, n. 4, p. 529-36, Dec 1998. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking).

STINEAR, T. P. et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. **Genome Res**, v. 17, n. 2, p. 192-200, Feb 2007. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210928> >.

STONER, G. L. Importance of the neural predilection of *Mycobacterium leprae* in leprosy. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.2, 1979. p.994-6. ISBN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).

SUMIOKA, T. et al. Impaired cornea wound healing in a tenascin C-deficient mouse model. **Lab Invest**, v. 93, n. 2, p. 207-17, Feb 2013. ISSN 0023-6837.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. Dermatologia tropical – Hanseníase. Gráfica Tropical, Manaus,1997.

TAPINOS, N.; OHNISHI, M.; RAMBUKKANA, A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. **Nat Med**, v. 12, n. 8, p. 961-6, Aug 2006. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892039> >.

TAVARES, J. L. et al. Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages. **Respir Med**, v. 91, n. 1, p. 31-9, Jan 1997. ISSN 0954-6111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9068814> >.

TELES, R. M. et al. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. **Arch Dermatol Res**, v. 294, n. 8, p. 355-62, Nov 2002. ISSN 0340-3696 (Print) 0340-3696 (Linking).

TEO, S. et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. **Microbes Infect**, v. 4, n. 11, p. 1193-202, Sep 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361920> >.

TRAUTMAN, J. R. A brief history of Hansen's disease. **Bull N Y Acad Med**, v. 60, n. 7, p. 689-95, Sep 1984. ISSN 0028-7091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207880> >.

TSENOVA, L. et al. A combination of thalidomide plus antibiotics protects rabbits from mycobacterial meningitis-associated death. **J Infect Dis**, v. 177, n. 6, p. 1563-72, Jun 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607834> >.

UDALOVA, I. A. et al. Expression and immune function of tenascin-C. **Crit Rev Immunol**, v. 31, n. 2, p. 115-45, 2011. ISSN 1040-8401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542790> >.

VAN BEERS, S. M.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. **FEMS Microbiol Lett**, v. 136, n. 3, p. 221-30, Mar 1996. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8867377> >.

VAN CREVEL, R. et al. Modulation of LPS-, PHA- and M. tuberculosis-mediated cytokine production by pentoxifylline and thalidomide. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 4, p. 574-9, Dec 2000. ISSN 1148-5493 (Print) 1148-5493 (Linking).

VISSCHEDIJK, J. et al. *Mycobacterium leprae*--millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. **Trop Med Int Health**, v. 5, n. 6, p. 388-99, Jun 2000. ISSN 1360-2276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929137> >.

VOGELSANG, G. B. et al. Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease. **N Engl J Med**, v. 326, n. 16, p. 1055-8, Apr 16 1992. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking).

WALKER, N. P. et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. **Cell**, v. 78, n. 2, p. 343-52, Jul 1994. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8044845> >.

WALKER, S. L. et al. The mortality associated with erythema nodosum leprosum in Ethiopia: a retrospective hospital-based study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, p. e2690, Mar 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625394> >.

WANG, X. et al. Matrix metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a disintegrin and metalloproteinase-12) define a signaling axis in agonist-induced hypertension and cardiac hypertrophy. **Circulation**, v. 119, n. 18, p. 2480-9, May 2009. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398663> >.

WATERS, M. F. Chemotherapy of leprosy--current status and future prospects. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 5, p. 500-3, 1993 Sep-Oct 1993. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8266396> >.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiol Lett**, v. 53, n. 3, p. 305-9, Dec 1989. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking).

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy elimination. Multidrug therapy (MDT). WHO recommended MDT regimes. MDT drugs. 2015a. Acessado em 05 de Janeiro de 2015. <http://www.who.int/lep/mdt/regimens/en/>

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy elimination. Multidrug therapy (MDT).MDT: duration of treatment FAQ. 2015b. Acessado em 05 de Janeiro de 2015. <http://www.who.int/lep/mdt/duration/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire, v. 88, n. 35, p. 365–380, 30 AUGUST 2013, 88th year / 30 AOÛT 2013, 88e Année.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert Committee on Leprosy. **Sixth report of WHO Expert Committee**. Geneve: WHO, 1988. (WHO Technical Report Series; n. 768).

WOROBEC, S. M. Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. **Research and Reports in Tropical Medicine**, 3, p. 79-91, 2012.

XIE, K. et al. Tenascin-C deficiency ameliorates Alzheimer's disease-related pathology in mice. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 10, p. 2389-98, Oct 2013. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673309> >.

ZHAN, F. H.; BARLOGIE, B.; JOHN D, S. Gene expression profiling defines a high-risk entity of multiple myeloma. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 32, n. 2, p. 191-203, Apr 2007. ISSN 1672-7347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17478923> >.

ZWINGENBERGER, K.; WNENDT, S. Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations. **J Inflamm**, v. 46, n. 4, p. 177-211, 1995. ISSN 1078-7852 (Print) 1078-7852 (Linking).

