

Foxp3 nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas

Chálita Patrícia de Lima¹ (PQ)*, Lucas Henrique Ferreira Sampaio² (PQ)

^{1, 2} Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Imunologia Molecular, Goiânia, Goiás, Brasil, e-mail: chalitapatricia@gmail.com

Embora as células T reguladoras (Treg) sejam fundamentais na imunorregulação de processos patológicos, o seu papel na imunologia da hanseníase precisa ser melhor avaliado. O objetivo deste trabalho foi quantificar o FoxP3, principal marcador das Treg, nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas. Foram avaliados pacientes com hanseníase paucibacilar (PB), multibacilar (MB), reação hansênica tipo 1 (RT1) e tipo 2 (RT2) e controles endêmicos saudáveis (CES). A expressão de células Treg foi investigada usando o método de ELISA para a medição do marcador FoxP3 no plasma, na ausência de estímulo, e no sobrenadante de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*), após a incubação com sonicação de células de *M. leprae* (MLCS). Os resultados mostraram que não houve diferença na expressão de FoxP3 medido diretamente no plasma, independentemente do grupo avaliado. Após estímulos das PBMCs com MLCS, foi observado, também, um forte aumento da expressão de FoxP3 em pacientes multibacilares em relação a paucibacilares. O grupo RT1 foi o que apresentou maior expressão de FoxP3 (seis vezes mais que CES e o dobro do RT2). Este estudo sugere um papel importantíssimo das Treg na etiopatogenia da hanseníase, regulando o processo inflamatório agudo exacerbado, comum na RT1, evitando lesões graves e incapacitantes.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*. Episódio reacional. Treg. FoxP3.

Introdução

A hanseníase é uma doença de pele infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* e apresenta-se como um espectro no qual as manifestações clínicas se correlacionam com a resposta imune ao patógeno.¹ A hanseníase lepromatosa (LL) e a hanseníase tuberculóide (TT) são formas polares e estáveis da doença. Os pacientes TT são caracterizados por forte resposta imune celular.^{2,3} Em contraste, os pacientes LL exibem inatividade sistêmica de células T específica e uma forte resposta humoral contra o *M. leprae*.^{4,5} Entre os pólos LL e TT, coexistem três formas instáveis de hanseníase: borderline tuberculóide, borderline borderline e borderline lepromatosa (BT, BB e BL, respectivamente).¹

Na década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu o uso de uma classificação operacional simples baseada na contagem do número de lesões de pele.⁶ De acordo com esta classificação os pacientes são divididos em

dois grupos: Paucibacilares (PB), que são pacientes que apresentam até cinco lesões de pele (esta classificação geralmente inclui TT e BT), e Multibacilares (MB), nos quais são observados mais do que cinco lesões de pele (geralmente inclui BB, BL e LL).⁷

Embora seja uma doença de evolução crônica, podem surgir ao longo do percurso patológico da hanseníase episódios agudos graves, as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais. Existem dois tipos de reações hansênicas: Reação tipo 1 (RT1) ou Reação Reversa (RR) e Reação tipo 2 (RT2), cuja principal manifestação é o Eritema Nodoso Hansênico (ENH).⁸ Estes episódios são resultados de complexas interações entre o sistema imune e o agente patológico *M. leprae* e se caracterizam por manifestações inflamatórias agudas que podem ocorrer antes, durante ou após tratamento medicamentoso em qualquer das formas clínicas.^{9,10,11}

As células T reguladoras (Tregs) são um subconjunto de células T CD4+ caracterizadas pelo fator de transcrição nuclear P3 (Forkhead box P3 ou FoxP3) e alta expressão superficial do receptor alfa de interleucina 2 de alta afinidade (CD25 ou IL2R α).^{12,13} Nas doenças infecciosas, as Tregs são ativadas e induzidas à proliferação, a fim de controlar a imunidade exacerbada graças à sua capacidade reguladora.^{14,15}

Embora as Tregs desempenhem um papel importante no mecanismo de falha do hospedeiro para controlar a disseminação de patógenos em formas graves de diferentes doenças infecciosas crônicas,^{16,17,18} seu papel na imunopatologia da hanseníase ainda não foi bem elucidado. Dessa forma, neste estudo investigamos o papel funcional e a frequência das células Treg FoxP3+ em diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas.

Material e Métodos

Para a análise do número de células Treg no sangue periférico foram recrutados cinco grupos de estudo:

Os grupos 1 e 2 foram constituídos por pacientes com hanseníase PB (n=10) e MB (n=10), recém diagnosticados e virgens de tratamento específico para hanseníase. Os pacientes PB foram classificados em TT e BT, enquanto os pacientes MB foram classificados em BL e LL, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley & Jopling (1966).

Os grupos 3 e 4 foram compostos por pacientes com reação RT1 e RT2, respectivamente, com $n=10$ em cada grupo. Todos os pacientes RT1 e RT2 foram submetidos a exames dermatoneurológicos e classificados por um dermatologista com larga experiência em diagnóstico de hanseníase. Todos os pacientes com RT1 e RT2 recrutados estavam em uso de MDT. As amostras de todos os pacientes em reação foram coletadas durante a ocorrência do episódio reacional.

O recrutamento de pacientes com hanseníase, apresentando reação ou não, foi realizado no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica e no Hospital Anuar Auad, Goiânia, Goiás, Brasil, no período compreendido entre janeiro e setembro de 2016.

Para o grupo 5 ($n=10$) foram recrutados controles endêmicos saudáveis (CES), representados por indivíduos saudáveis, sem histórico clínico ou familiar de hanseníase ou tuberculose. O recrutamento e coleta sanguínea do grupo CES foram realizados no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás no período compreendido entre os meses de junho e julho de 2016.

Após a avaliação clínica e explicação sobre estudo, os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário padronizado para a obtenção de dados sociodemográficos. Em seguida realizou-se a coleta de sangue por punção venosa em tubos com heparina. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas/UFG e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (protocolo #12962).

Culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram preparadas a partir de sangue total heparinizado não diluído venoso. As PBMC foram ressuspensas em RPMI1640 suplementado com 50000 U de penicilina/estreptomicina e 10% de soro humano inativado pelo calor. Foram adicionadas a cada poço e 2×10^5 células de uma placa de 96 poços e estimuladas com antígeno de sonicação de células de *M. leprae* (MLCS - 1 ml de MLCS sob uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$). Após 3 dias de incubação a 37°C e 5% CO_2 , aproximadamente 100 μl de sobrenadante foram recolhidos para quantificar as Treg.

A concentração de Treg FoxP3+, a partir de plasma (na ausência de estímulo) e sobrenadantes da cultura de PBMC estimulados com o antígeno MLCS, foi determinada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com o kit FoxP3

humano, de acordo com as instruções do fabricante (LifeSpan BioSciences Seattle, Washington).

A significância estatística foi avaliada pela análise de Kruskal-Wallis para comparação de grupos múltiplos e Mann-Whitney U para comparação entre dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando valores de $p < 0,05$ foram obtidos.

Resultados e Discussão

No grupo dos pacientes com hanseníase PB a maioria deles foi classificada com a forma BT, segundo critérios de Ridley-Jopling. Para o grupo de pacientes com hanseníase MB, a proporção foi de sete indivíduos classificados com a forma BL e 3 com LL. Nos grupos RT1 e RT2 a maioria dos pacientes foi classificada como BT e LL, respectivamente. A Tabela 1 mostra as principais características dos pacientes com hanseníase PB e MB, com reação tipo 1 ou tipo 2 e do grupo de controles.

Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo e controle.

	PB	MB	RT1	RT2	CES
Sexo	6 F / 4 M	4 F / 6 M	5 F / 5 M	4 F / 6 M	4 F / 6 M
Idade	36,8 (19-78)	38 (18-81)	37,1 (18-77)	37,5 (19-86)	37,3 (18-76)
Índice Baciloscópico	0	2,1 (0,5-4,0)	0,5 (0-2)	2,1 (0,5-3,0)	n.a.
Forma clínica (Ridley-Jopling)	3 TT/ 7 BT	7 BL/ 3 LL	1 BT/ 7 BL/ 2 LL	1 BB/ 4 BL/ 5 LL	n.a.

F - feminino; M - masculino; TT - forma tuberculóide; BT- forma borderline-tuberculóide; BB - forma borderline-boderline; BL - forma borderline-lepromatosa; LL - forma lepromatosa; n.a.- não aplicável. A idade e o índice baciloscópico estão expressos em mediana (mínimo-máximo). Fonte: O autor.

A expressão de células Treg entre os indivíduos recrutados foi investigada usando o método de ELISA, para a medição do marcador FoxP3, primeiramente no plasma sem estímulo e posteriormente no sobrenadante de PBMCs. Conforme demonstrado na Figura 1, não houve qualquer diferença na expressão de FoxP3+ medido diretamente no plasma, na ausência de estímulos, entre os grupos analisados. Ou seja, a quantidade de células Treg circulantes foi similar quando se

comparou os níveis de FoxP3 do grupo de indivíduos saudáveis com pacientes, com ou sem reação.

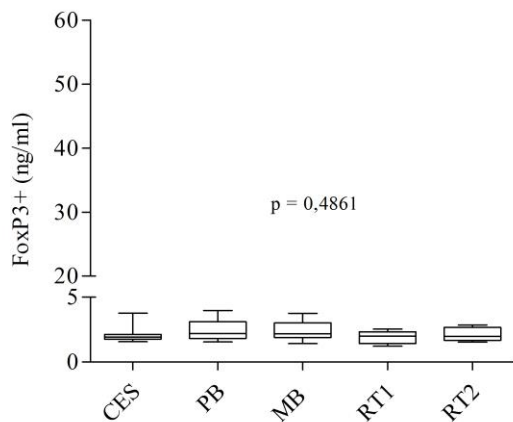


Figura 1. Quantificação de células Treg FoxP3+ no plasma. O número de Treg FoxP3 no plasma de pacientes com hanseníase e controles foi determinado por ELISA. CES – controles endêmicos saudáveis; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar; RT1 – reação tipo 1; RT2 reação tipo 2. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (2575%) e a linha preta dentro de cada box indica o valor da mediana, n = 10 por grupo.

Depois de estimulados com o antígeno MLCS, as PBMCs de todos os grupos demonstraram aumento estatisticamente significativo na expressão de Foxp3 quando comparados com indivíduos saudáveis (Figura 2). A mediana do número de Foxp3 no grupo MB foi de 16,06 ng/ml, significativamente maior que nos grupos CES e PB. Conforme ilustrado na Figura 2, ao analisar as amostras de pacientes com as formas polares da hanseníase foi observado um aumento significativo (cerca de 2,5 vezes mais) da expressão de células Treg em pacientes MB, quando comparados com PB que apresentaram mediana de 6,83 ng/ml. O grupo de indivíduos com episódios reacionais do tipo 1 apresentou a maior expressão de Foxp3, com mediana de 33,3 ng/ml. A quantidade de Treg Foxp3+ em pacientes RT1 foi cerca de seis vezes maior que a de indivíduos saudáveis e mais que o dobro dos indivíduos RT2.

Ao se comparar as respostas de pacientes MB e pacientes RT2, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos, que demonstraram uma expressão mediana de 14,1 e 16,1 ng/ml de Foxp3, respectivamente, após o estímulo com MLCS. Em contrapartida, ao comparar o grupo PB versus RT1, o número de células Treg FoxP3+ em pacientes RT1 foi significativamente maior.

A hanseníase é caracterizada por um amplo espectro de formas clínicas, que vai depender do tipo de resposta imune gerada pelo sujeito infectado. Enquanto pacientes PB são caracterizados por uma forte resposta Th1 nos indivíduos MB observa-se uma fraca imunidade mediada por células, com predominância de resposta Th2.^{3,25}

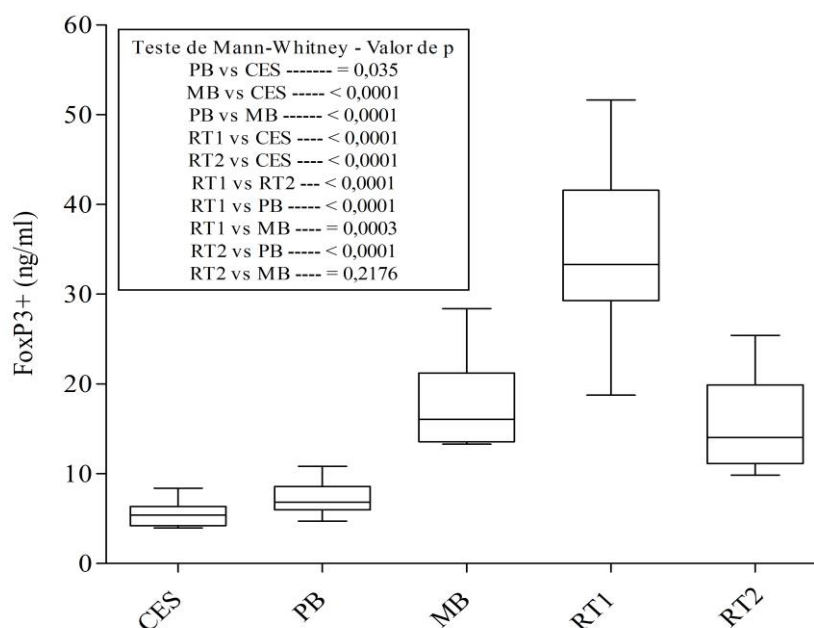


Figura 2. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes e indivíduos saudáveis após estímulo. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com hanseníase e controles foram estimuladas *in vitro* com sonicação celular do *M. leprae* ("M. leprae cell sonicate" MLCS). O número total de células Treg FoxP3 foi determinado por ELISA. CES – controles endêmicos saudáveis; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar; RT1 – reação tipo 1; RT2 – reação tipo 2. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (25-75%) e a linha preta dentro de cada box indica o valor da mediana, n = 10 por grupo.

A imunidade celular específica é mediada principalmente pelos linfócitos T. As células Treg são um subtipo de linfócito T CD4+, essencial na modulação do sistema imune pela supressão da ativação de respostas imunológicas ante à antígenos exógenos ou próprios.^{12,26} As Tregs também desempenham um papel essencial no controle da resposta imune excessiva contra antígenos microbianos, especialmente contra patógenos que estabelecem infecções persistentes.^{27,28} Porém o papel das Tregs na hanseníase foi abordado em poucos estudos e ainda há controvérsias sobre a sua função na doença e suas diferentes formas clínicas^{2,29}.

Neste estudo a frequência de células Treg FoxP3+ foram avaliados nas diferentes formas de hanseníase. Nós observamos que, na ausência do estímulo com MLCS, o número de Treg FoxP3+ foi similar em todos os grupos analisados. Mas após estimulação foi observado um forte crescimento dessa população de linfócitos FoxP3+ em todos os grupos de pacientes, independente da forma clínica.

Este resultado corrobora com trabalhos anteriores que demonstraram que, independentemente da doença infecciosa, a quantidade de células Tregs circulantes é semelhante quando comparamos indivíduos doentes e saudáveis.^{30,31,32}

Os resultados deste estudo são fortemente divergentes de outros trabalhos que mostram as células Treg aumentadas em pacientes PB quando comparados com pacientes MB.^{19,20} Essa divergência de resultados pode ser devido a diferenças genéticas das populações estudadas. Entretanto o presente estudo corrobora com trabalhos anteriores, em que foi observado um aumento significativo de Treg em pacientes MB, quando comparados com PB e indivíduos saudáveis.^{22,36,37,38} Acreditamos que este aumento está supostamente relacionado com a anergia das células T observada na forma MB da doença. As células Treg teriam, então, um papel patogênico crucial nesses indivíduos MB, pois o aumento da expressão de Treg poderia aumentar a supressão de resposta Th1, reduzindo a liberação de IFN- γ , o que favoreceria a sobrevivência e proliferação do bacilo.

Neste estudo também foram determinadas a quantidade de células Treg FoxP3+ em culturas de PBMCs de pacientes com RT1 e RT2, durante os episódios reacionais. Em ambos os grupos reacionais foi observado um aumento da quantidade de Treg FoxP3 em comparação com pacientes PB e CES. Este achado mostra concordância parcial com um estudo recente, em que foi observada uma diferença estatisticamente significativa em pacientes com RT1 em comparação com pacientes sem reação.³⁹ A evidência de aumento de Treg FoxP3+ também foi observada em pacientes com RT1 quando comparados com formas não reacionais da doença.²³

Além disso, no presente trabalho, ao se comparar os dois grupos reacionais entre si, o número de Treg FoxP3+ foi significativamente maior em RT1 do que em RT2. O grupo de pacientes com RT1 apresentou mais que o dobro da expressão de FoxP3 que pacientes RT2. A mesma tendência de maior quantidade de células Treg em TR1 também foi observada em estudos anteriores.^{20,24,40} O aumento de Tregs durante o episódio reacional do tipo I parece estar relacionado com o dano neural que ocorre nesse tipo de reação.²⁰ Assim, sugere-se que o aumento das células FoxP3+ no grupo RT1 possa decorrer da tentativa de proteção tissular em um contexto de um processo inflamatório agudo e exacerbado.

Considerações Finais

Os dados aqui apresentados fornecem informações importantes sobre a participação de células Treg nas diferentes formas de hanseníase e em reações hansênicas, demonstrando o papel relevante destas células na imunopatologia da doença. Nossos resultados sugerem que o maior número de Treg em pacientes com RT1 poderia ser benéfico para o hospedeiro como um mecanismo de proteção para tentar regular a resposta imune contra o *M. leprae* e atenuar a ativação da resposta inflamatória crônica, o que poderia ocasionar lesões graves e incapacitantes nos tecidos e nervos. Os resultados deste estudo sugerem ainda que a forte resposta de células Treg FoxP3+ diminui a resposta imune Th1 em pacientes MB e RT2, o que permite a sobrevivência e dispersão dos bacilos nestas formas de hanseníase. Além disso, o estudo também provou a eficiência do teste de ELISA em medir células T reguladoras FoxP3+.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

Referências

1. RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **Int J Lepr.** 1966; 34: 255–73.
2. BLOOM, B. R.; MEHRA V. Immunological unresponsiveness in leprosy. **Immunol Rev.** 1984; 80: 5–28
3. ROBERT, L. M. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. **J Invest Dermatol.** 1994; 102 (6): 828-32.
4. SIELING, P. A.; ABRAMS, J. S.; YAMAMURA, M.; SALGAME, P.; BLOOM, B. R.; REA, T. H. *et al.* Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection: in vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J Immunol.** 1993; 150 (12): 5501–10.
5. SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology.** 1994; 191 (4–5): 378–87.
6. WHO. Chemotherapy of leprosy: report of a WHO study group. **Tech Rep Rev.** 1994; 847.
7. YAWALKAR, S. J. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** Novartis Foundation for Sustainable Development, 8th ed. Basle: Switzerland: 2009; p. 29-30.
8. RIDLEY, D. S. Reactions in leprosy. **Lepr Rev.** 1969; 40 (2): 77-81.

9. SCOLLARD, D.M.; SMITH, T.; BHOOPAT, L.; THEETRANONT, C.; RANGDAENG, S.; MORENS, D. M. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1994; 62 (4): 559–67.
10. NERY, J. A. C.; SALES, A. M.; ILLARRAMENDI, X.; DUPPRE, N. C.; JARDIM, M. R.; MACHADO, A. M. Contribution to diagnosis and management of reactional states: a practical approach. **An Bras Dermatol.** 2006; 81 (4): 367-75.
11. KAMATH, S.; VACCARO, S. A.; REA, T. H.; OCHOA, M. T. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. **J Am Acad Dermatol.** 2014; 71 (4): 795–803.
12. SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol.** 1995; 155 (3): 1151–64.
13. THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J Exp Med.** 1998; 188 (2): 287–96.
14. HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** 2003; 299: 1057–61.
15. FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; WILLIAMS, L. M.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity.** 2005; 22: 329–41.
16. BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol.** 2005; 6: 353-60.
17. CHEN, X.; ZHOU, B.; LI, M.; DENG, Q.; WU, X.; LE, X. et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. **Clin Immunol.** 2007; 123: 50-9.
18. BONELLI, M.; SAVITSKAYA, A.; STEINER, C. W.; RATH, E.; SMOLEN, J. S.; SCHEINECKER, C. Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **J Immunol.** 2009; 182: 1689–95.
19. SAMPAIO, L. H.; SOUSA, A. L. M.; BARCELOS, M. C.; REED, S. G.; STEFANI, M. M. A.; DUTHIE, M. S. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2012; 31 (7): 1443–51.
20. BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat Rev Immunol.** 2003; 3: 253–57.
21. BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **J Allergy Clin Immunol.** 2007; 120: 227–35.
22. CHIACCHIO, T.; CASETTI, R.; BUTERA, O.; VANINI, V.; CARRARA, S.; GIRARDI, E., et al. Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis. **Clin Exp Immunol.** 2009; 156: 463–70.
23. REA, T. H. Suppressor cell activity and phenotypes in the blood or tissues of patients with leprosy. **Clin Exp Immunol.** 1983; 54: 298–304.
24. BAHRAMI, F.; DARABI, H.; RIAZI-RAD, F.; KHAZE, V.; AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H. FOXP3 expression and frequency of regulatory T cells in healed individuals from Leishmania major infection and the asymptomatic cases. **Hum Immunol.** 2014; 75: 1026–33.

25. ZEWDIE, M.; HOWE, R.; HOFF, S. T.; DOHERTY, T. M.; GETACHEW, N.; TAREKEGNE, A. et al. Ex-vivo characterization of regulatory T cells in pulmonary tuberculosis patients, latently infected persons, and healthy endemic controls. **Tuberculosis**. 2016; 100: 61-8.
26. LUO, J.; ZHANG, M.; YAN, B.; ZHANG, K.; CHEN, M.; DENG, S. Imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis patients. **Braz J Infect Dis**. 2017; 21 (2), 155-61.
27. KUMAR, S.; NAQVI, R. A.; ALI, R.; RANI, R.; KHANNA, N.; RAO, D. N. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. **Mol Immunol**. 2013; 56: 513–20.
28. BOBOSHA, K.; WILSON, L.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; BEKELE, Y.; ZEWDIE, M.; SCHIP, J. J. et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014; 8:e2773.
29. SADHU, S.; KHAITAN, B. K.; JOSHI, B.; SENGUPTA, U.; NAUTIYAL, A. K.; MITRA, D. K. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**. 2016; 10: e0004338.
30. PARENTE, J. N.; TALHARI, C.; SCHETTINI, A. P.; MASSONE, C. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. **An Bras Dermatol**. 2015; 90 (1): 41–7.
31. COSTA, M. B. **Estudo *in situ* da heterogeneidade de mastócitos e células T reguladoras em pacientes com hanseníase, com e sem episódios reacionais e em outras dermatoses** [tese]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública; 2014. 156 p.