

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

DOUGLAS EULÁLIO ANTUNES

**RELAÇÕES CAUSAIS ENTRE OS ANTÍGENOS DE *M. LEPRÆ* (LAM E PGL-1) E
OS RECEPTORES TOLL-LIKE 1, 2 E SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO DE
CITOCINAS IFN- γ E IL-10 NAS REAÇÕES HANSÊNICAS**

**UBERLÂNDIA
2017**

DOUGLAS EULÁLIO ANTUNES

**RELAÇÕES CAUSAIS ENTRE OS ANTÍGENOS DE *M. LEPRÆ* (LAM E PGL-1) E
OS RECEPTORES TOLL-LIKE 1, 2 E SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO DE
CITOCINAS IFN- γ E IL-10 NAS REAÇÕES HANSÊNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Prof^ª. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

**UBERLÂNDIA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A636r Antunes, Douglas Eulálio, 1983
2017 Relações causais entre os antígenos de *M. leprae* (LAM E PGL-1) e os receptores TOLL-LIKE 1, 2 e seus efeitos na expressão de citocinas IFN- γ e IL-10 nas reações hansênicas / Douglas Eulálio Antunes. - 2017. 189 p. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Hanseníase - Teses. 3. Antígenos - Teses. 4. Interferon - Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

RELAÇÕES CAUSAIS ENTRE OS ANTÍGENOS DE *M. LEPRÆ* (LAM E PGL-1) E OS
RECEPTORES TOLL-LIKE 1, 2 E SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
IFN- γ E IL-10 NAS REAÇÕES HANSÊNICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Uberlândia, 03 de maio de 2017.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Isabela Maria Bernardes Goulart, FAMED, UFU/MG

Prof^ª. Dr^ª. Norma Tiraboschi Foss, FMRP, USP/SP

Prof^ª. Dr^ª. Andréa de Faria Fernandes Belone, ILSL/SP

Prof^ª. Dr^ª. Yara Cristina de Paiva Maia, FAMED, UFU/MG

Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira, FAMED, UFU/MG

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, em especial ao meu pai João Eulálio (In memoriam), à minha mãe Diolína pelo amor, compreensão e incentivo desde a minha infância. Às minhas irmãs Lália, Giordana, Simone e Francilane pela força, pelo auxílio e pelo amor que temos uns pelo outro. À minha tão amada Tathiane por fazer parte e proporcionar momentos tão agradáveis na minha vida. Aos meus amigos por entenderem meu distanciamento nesses últimos anos e aos pacientes da hanseníase que contribuíram direta e indiretamente com essa pesquisa.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade que ele me concedeu de conquistar os verdadeiros bens preciosos da vida, o conhecimento, que supera qualquer ganho material. Agradeço a minha família por me incentivarem nessa longa caminhada, a minha amada mãe Diolina, às minhas amadas irmãs Lália, Giordana, Simone e Francilane por me auxiliarem nos meus primeiros ensinamentos e na minha educação, sou muito grato a vocês. Agradeço aos meus sobrinhos os quais tive a oportunidade de vê-los crescer e aos meus cunhados. A minha querida e amada Tathiane, pela força que me dá, pela força que tens e pela coragem de enfrentar tantas dificuldades.

Agradeço imensamente a minha orientadora Dr^a. Isabela Maria Bernardes Goulart, por me auxiliar nos meus primeiros passos como pesquisador, pela grande ajuda na construção do pensamento e pela disposição em tratar os pacientes com a dignidade que todo doente tem direito e oferecendo-lhes tratamento e a assistência de qualidade, muito obrigado professora!

Sinto-me grato pelas pessoas que colaboraram diretamente com essa pesquisa como o professor Dr. Luiz Ricardo Goulart, professora Dr^a. Mayara Ingrid S. Lima e seus alunos Meydson, Natália e Emilly da Universidade Federal do Maranhão, aos doutorandos (em breve doutores) Patrícia Terra Alves (INGEB/UFU), Haroldo S. Rodrigues (UFLA). Aos amigos da pós-graduação que me acompanharam desde o mestrado e hoje doutores, Ana Carolina S R da Cunha e Sérgio Araújo aos amigos futuros doutores Elaine, Diogo, Paula e Fabiane.

Quero agradecer a toda equipe do CREDESH, uma equipe que se resume em compromisso, competência e compaixão, pois é isso que os pacientes da hanseníase merecem. Meu agradecimento em especial a enfermeira Dulcinéa, médicos Dr^a. Cida e Dr. Adeilson, aos técnicos Rose, Olinda, Cláudia e a todos que não citei aqui.

Obrigado amigos, Michel, Rafael, Shields, Warley, Ueslei, Rangel, João Marcelo, Fábio, Franciel, Gean, Bruno (Brunão), Eric por fazerem parte dos meus bons e divertidos momentos na infância, adolescência e até os dias de hoje.

Agradeço a todos os pacientes da hanseníase que contribuíram com essa pesquisa, mesmo passando por momentos difíceis, nunca abdicaram em participar de nossos estudos.

Finalizo agradecendo ao Dr. Opromolla (In memoriam) pela contribuição em nosso campo teórico e pelos esforços diante de uma doença negligenciada, pois este “Nadou contra a corrente, enfrentou a descrença, a imobilidade, a indiferença e acreditou sempre” e acrescento que ele entendeu que a cura só interessa ao doente e a quem se coloca no lugar deles.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana. ”

Carl Jung

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito. ”

Chico Xavier

"A vida humana é uma provação, e a adversidade o lugar de honra. "

John Hughes

RESUMO

Introdução: As reações hansênicas caracterizam-se por eventos imunológicos agudos que ocorrem antes, durante ou após a Poliquimioterapia da hanseníase, sendo desencadeadas principalmente pela interação entre os antígenos do *Mycobacterium leprae*, PGL-1 e LAM, com os componentes da imunidade do hospedeiro, *TLR1* e *TLR2*, que consequentemente induzem outras células a sintetizar citocinas que favorecem o controle ou disseminação bacilar. **Objetivos:** Estabelecer e quantificar as relações causais entre os antígenos de *M. leprae* (PGL-1 e LAM) e os receptores *TLR1*, *TLR2* e seus efeitos na expressão de citocinas IFN- γ e IL-10 nas reações hansênicas. **Material e métodos:** Por meio da sorologia ELISA foi possível dosar os níveis de IgM anti-PGL-1 e IgG anti-LAM e com emprego da RT-qPCR procedeu-se a análise da expressão gênica de *TLR1*, *TLR2*, IFN- γ e IL-10 utilizando amostras do sangue de 17 pacientes com reação hansênica e 17 sem reação (caso-controle) que posteriormente foram subdivididos em 4 grupos. Na comparação entre as médias das variáveis nos diferentes grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e na avaliação do grau de associação entre as principais variáveis, a matriz de correlação de *Pearson*. Ao final, elaborou-se a análise de trilha para verificar relações causais envolvendo os antígenos e receptores do tipo *Toll* tendo como efeitos direto e indireto a expressão de citocinas. **Resultados:** Do total de 34 pacientes, 76,4% (26/34) eram MB e 23,6% PB, sendo que 100% (17/17) dos casos reacionais eram MB e dos controles 53% (9/17). Analisando o grupo reacional, 41,2% (7/17) apresentaram reação tipo 1, enquanto que 58,8% (10/17) tiveram reação tipo 2, destacando que na reação tipo 1, 57,1% (4/7) dos pacientes tiveram reação antes do tratamento (*downgrading*), 14,2% (1/7) durante e 28,8% (2/7) após PQT. Na reação tipo 2, todos desenvolveram reação após alta. Os níveis de anti-PGL-1 estiveram elevados na reação tipo 1 e na reação tipo 2, com diferença significativa entre as médias desses grupos quando comparados aos controles PB ($F=6,42$; $p=0,002$). Em relação ao anti-LAM, esse esteve associado a reação do tipo 2, grupo cujas médias foram mais elevadas, e apresentaram diferenças significativas quando comparado aos demais grupos ($F=15,27$; $p<0,001$). Os grupos reacionais expressaram maiores níveis de mRNA de IL-10 ($F=3,99$; $p=0,023$), enquanto que o grupo controle expressou mais IFN- γ , especialmente aqueles PB ($F=5,30$; $p=0,008$). Não houve diferenças nos níveis de expressão de *TLR1* e *TLR2* nos diferentes grupos. No grupo reacional, a análise de trilha quantificou os efeitos diretos de anti-LAM (0,623) e anti-PGL-1 (0,605) sobre *TLR2*, maiores que o efeito residual desse modelo (0,255), indicando que esses marcadores antigênicos influenciaram somente a expressão de *TLR2*, que consequentemente associou-se a IL-10 nesse grupo. Um mecanismo oposto ocorreu no grupo controle, visto que, constatou-se uma via imunológica que regulou a expressão de IFN- γ dependente da associação entre *TLR1-TLR2*. **Conclusão:** Em conclusão, a análise de trilha permitiu demonstrar a relação causal entre antígenos, *TLR2* e IL-10 nas reações hansênicas, que podem sofrer influência de falha no mecanismo de associação entre *TLR1* e *TLR2*, objeto de futuras investigações.

Palavras-chave: Reações hansênicas. PGL-1. LAM. *Toll-like receptor 2*. Interferon gama. Interleucina 10.

ABSTRACT

Background: The leprosy reactions are acute immunological events that occur before, during or after MDT of leprosy, being triggered mainly by interaction between the antigens of *Mycobacterium leprae*, PGL-1 and LAM, with the components of immunity of the host, such as, TLR1 and TLR2, that induce cells to produce cytokines related to control or bacillary dissemination. **Objectives:** The main goal of this research is establish causal relations between antigens of *M. leprae* (PGL-1 and LAM) and receptors, TLR1, TLR2 and their effects on cytokines expression, IFN- γ and IL-10, in leprosy reactions. **Methods:** Through ELISA serology it was possible measure the levels of anti-PGL-1 IgM and anti-LAM IgG, and with the use of the RT-qPCR proceeded the analysis of gene expression of TLR1 TLR2, IFN- γ and IL-10 using blood samples from 17 reactional patients and 17 nonreactional patients (Case-control study) that posteriorly were subdivided into 4 groups. For comparison between means of the variables, it resorted to use of analysis of variance (ANOVA) and about the degree of association between the variables, it has applied the correlation matrix. At the end, it was used the path analysis to verify the causal relation evolving antigens and toll-like receptors, whose the direct and indirect effects were the cytokines expression. **Results:** Among 34 patients, 76.4% (26/34) were MB and 23.6% PB, being that 100% (17/17) of reactional cases were MB and among the controls 53% (9/17). Analyzing the reactional group, 41.2% (7/17) suffered type 1 reaction, while 58.8% (10/17) presented type 2 reaction, emphasizing that, among patients with type 1 reaction, 57.1% (4/7) had reaction before treatment (downgrading), 14.2% (1/7) during and 28.8% (2/7) after MDT, whereas all patients of the type 2 reaction group, developed this occurrence after treatment. The levels of anti-PGL-1 have been elevated in type 1 and type 2 reactions with significant differences between means of these groups when compared to PB controls ($F=6.42$; $p=0.002$). Regarding to anti-LAM, this has been associated to type 2 reaction, group whose the means were higher than others, and this data showed significant differences as well ($F=15.27$; $p<0.001$). The reactional groups expressed higher levels of IL-10 ($F=3.99$; $p=0,023$), whereas the control group produced high levels of IFN- γ , especially the PB control ($F=5.30$; $p=0.008$). There were no differences in the levels of TLR1 and TLR2 expression in the comparison among groups. In the reactional group, the path analysis quantified the direct effects of anti-LAM (0.623) e anti-PGL-1 (0.605) on TLR2, which were higher than the residual effect of this model (0.255), indicating that these antigenic markers influenced only the TLR2 expression, which consequently correlated with the IL-10 expression in this group. An opposing mechanism occurred in the control group, insofar as it was found an immunological pathway that regulated the IFN- γ expression dependent on TLR1 and TLR2 association. **Conclusion:** In conclusion, path analysis allowed to demonstrate the causal relation between TLR2 and IL-10 in leprosy reactions that may suffer influence of failure in the mechanism of association between TLR1 and TLR2, as such occurs in TLR2 polymorphisms, object of future investigations.

Keywords: Leprosy reactions. PGL-1. LAM. Toll-like receptor 2. Interferon gamma. Interleukin 10.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll.	37
Quadro 1	Revisão da literatura envolvendo os principais achados sobre <i>TLR1</i> e <i>TLR2</i>	41
Figura 2	Mecanismo de sinalização das reações induzidas pela interação de IL-10 com seus receptores.....	55
Figura 3	Mecanismo de sinalização e regulação para síntese de IFN- γ	58
Figura 4	Delineamento do estudo de Caso-Controle.....	61
Gráfico 1 A	Comparação entre as médias dos níveis do anticorpo IgG anti-LAM nos grupos controle e reacional.....	82
Gráfico 1 B	Comparação entre as médias dos níveis de anticorpos IgG anti-LAM nos grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB.....	82
Gráfico 1 C	Comparação entre as médias dos níveis de anticorpo IgM anti-PGL-1 nos grupos controle e reacional.....	82
Gráfico 1 D	Comparação entre as médias dos níveis do anticorpo IgM anti-PGL-1 nos grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB.....	82
Gráfico 2 A	Expressão gênica de mRNA do receptor <i>Toll-like 1</i> nos pacientes dos grupos reacional e controle.....	84
Gráfico 2 B	Expressão gênica de mRNA do receptor <i>Toll-like 2</i> nos pacientes dos grupos reacional e controle.....	84
Gráfico 2 C	Expressão gênica de mRNA do receptor <i>Toll-like 1</i> , comparações entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB.....	84
Gráfico 2 D	Expressão gênica de mRNA do receptor <i>Toll-like receptor 2</i> , comparações entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB.....	84
Gráfico 2 E	Comparação entre as expressões gênicas de mRNA de <i>Toll-like receptor 1</i> e <i>2</i> nos grupos controle e reacional.....	84
Gráfico 2 F	Comparação entre as expressões gênicas de mRNA de <i>Toll-like receptor 1</i> e <i>2</i> nos grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e MB.....	84
Gráfico 3 A	Expressão gênica de mRNA da citocina IL-10, comparação entre médias nos grupos controle e reacional.....	86

Gráfico 3 B	Expressão gênica de mRNA da citocina IL-10, comparação entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB.....	86
Gráfico 3 C	Expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ , comparação entre médias nos grupos controle e reacional.....	86
Gráfico 3 D	Expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ , comparação entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB.....	86
Figura 5	Gráfico do traço da crista, representando a variação nos valores dos coeficientes de regressão com diversos valores de k. Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística.....	91
Gráfico 4	Diagrama causal da análise de trilha no grupo com reação tipo 1, variável básica IL-10, A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017.....	93
Gráfico 5	Diagrama causal da análise de trilha, no grupo com reação tipo 2, variável básica IL-10, A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017.....	96
Gráfico 6	Diagrama causal da análise de trilha, no grupo controle, variável básica IFN- γ , A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis clínicas e epidemiológicas dos pacientes reacionais e controle (não reacionais), segundo forma clínica, classificação operacional, tipo de reação hansênica, período e ocorrência da reação, aplicação do teste de associação qui-quadrado (χ^2) para duas amostras independentes, Uberlândia, 2017 79
Tabela 2	Variáveis clínicas e epidemiológicas dos pacientes reacionais e controle (não reacionais) conforme forma clínica, quantidade de nervos afetados, quantidade de lesões cutâneas, GID, sexo e faixa etária, aplicação do teste de associação qui-quadrado (χ^2) - teste de tendência para duas amostras independentes, Uberlândia, 2017 80
Tabela 3	Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo Reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), fundamentada na correlação linear simples de <i>Pearson</i> , Uberlândia, 2017 88
Tabela 4	Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo com reação tipo 1, fundamentada na correlação linear simples de <i>Pearson</i> , Uberlândia, 2017 89
Tabela 5	Correlações simples e parciais entre as variáveis básica IL-10 e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes com reação tipo 1, Uberlândia, 2017 90
Tabela 6	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis explicativas sobre a variável básica IL-10 no grupo com reação tipo 1 após correção da multicolinearidade, Uberlândia, 2017 92
Tabela 7	Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo com reação tipo 2, fundamentada na correlação linear simples de <i>Pearson</i> , Uberlândia, 2017 94
Tabela 8	Correlações simples e parciais entre as variáveis básica IL-10 e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes com reação tipo 2, Uberlândia, 2017 95
Tabela 9	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica IL-10 no grupo com reação tipo 2, Uberlândia, 2017 95
Tabela 10	Matriz de correlação entre variáveis básica e variáveis explicativas do grupo controle, fundamentada na correlação linear simples de <i>Pearson</i> , Uberlândia, 2017 97
Tabela 11	Correlações simples e parciais entre as variáveis básica IFN- γ e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes do grupo controle, Uberlândia, 2017 98
Tabela 12	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica (IFN- γ), Uberlândia, 2017 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C	antes de Cristo
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AraLAM	Lipoarabinomanana com arabinose
BCG	<i>Bacilo de Calmett Guerrin</i>
CD14	Cluster de diferenciação 14 (Expresso por macrófagos e células dendríticas)
CD40	Cluster de diferenciação 40 (Molécula de ativação de linfócitos B)
CD40L	Ligante do cluster de diferenciação 40
CD46	Cluster de diferenciação 46 (proteína reguladora do complemento)
CD86	Cluster de diferenciação 86 (Proteína ativadora de células T)
CD206	Cluster de diferenciação 206 (Receptor de manose tipo C 1)
CD209	Cluster de diferenciação 209 (DC-SIGN)
CD281	Cluster de diferenciação 282 (Toll-like receptor 1)
CD282	Cluster de diferenciação 282 (Toll-like receptor 2)
CFZ	Clofazimina
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo à AMPc
CXCL10	Quimiocina [Chemokine (C-X-C motif) ligand]
DCs	Células dendríticas
DC-SIGN	Receptor de lectina tipo C expresso em células dendríticas
DD	Dimorfo-Dimorfo
DDS	Dapsona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DT	Dimorfo-Tuberculoide
DV	Dimorfo-Virchowiano
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EM	Eritema multiforme
ENH	Eritema nodoso hansênico
FcRs	Receptores Fc
FDA	Food and Drug Administration

FOXP3	Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras
GAS	Local de ativação de interferon-gama
GENES	Aplicativo computacional em Genética e Estatística Experimental
GID	Grau de incapacidade no diagnóstico
HI	Hanseníase Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
ICAM1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IFN- γ R	Receptor de Interferon gama
IFN- τ	Interferon tau
IFN- ω	Interferon ômega
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG ₁	Imunoglobulina G classe 1
IgG ₂	Imunoglobulina G classe 2
IgG ₃	Imunoglobulina G classe 3
IgM	Imunoglobulina M
IKK	Complexo de quinase I κ B
IKK α	I κ B quinase alfa
IKK β	I κ B quinase beta
IKK γ	I κ B quinase gama
IL	Interleucina
IL-10R-alfa	Subunidade alfa do receptor de interleucina 10
IL-10R-beta	Subunidade beta do receptor de IL-10
IL-2R	Receptor da interleucina 2
IRAK-1	Quinase 1 associadas ao receptor da interleucina 1
JAK/STAT	<i>Janus tirosina-kinases / signal transducer and activator of transcription</i>

JAK1	Janus Kinase 1
JAKs2	Janus tirosina-kinases 2
LAM	Lipoarabinomanano
LB _{Regs}	Linfócitos B reguladores
LILR	Receptores de leucócitos com domínio tipo imunoglobulina
LM	Lipomannano
LPS	Lipopolissacarídeos
LT $\gamma\delta$	Linfócitos T gama-delta
LT _{Reg}	Linfócitos T reguladores
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MAL	Adaptador análogo ao MyD88 (MyD88-adapter-like)
ManLAM	Complexo lipoarabinomanana nanosilados
MB	Multibacilar
MHC I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
MHC III	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe III
MKK3	Proteínas quinase 3 ativadoras de mitose
MKK6	Proteínas quinase 6 ativadoras de mitose
MNC	Minociclina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	Proteína adaptadora fator de diferenciação mieloide 88
NC	Número de condições
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OFX	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial de Saúde
p38	Proteína quinase ativada por mitógenos
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF-BB	Fator de crescimento BB derivado de plaquetas
PEA	População economicamente ativa
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGL-1	Glicolípido-Fenólico-1
PILAM	Lipoarabinomanana fosfoinosítido
PIM	Fosfatidil-inositol-manose
PQT	Poliquimioterapia
PQT/MB	Poliquimioterapia / Multibacilar
<i>pε</i>	Efeito residual
qPCR	PCR em Tempo Real
RAK-4	Quinase 4 associadas ao receptor da interleucina 1
RFM	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RP105	Proteína radioprotetiva de 105kDa
RR	Reação reversa
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa quantitativa, seguida de PCR
r_{xy}	Correlação produto momento de <i>Pearson</i> entre as variáveis X e Y
$r_{xy.z}$	Correlação parcial entre X e Y excluindo o efeito de Z
SNP	Polimorfismos de base única
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
T	Tuberculoide
TAB2	Proteína 2 de ligação-TAK1
TAB3	Proteína 3 de ligação-TAK1
TAK1	Fator de crescimento β associado a quinase 1
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta

Th1	Célula T auxiliar tipo 1
Th17	Célula T auxiliar tipo 17
Th2	Célula T auxiliar tipo 2
TIR	Receptor de interleucina-Toll (Toll/IL-1 receptor)
TIRAP	Domínio TIR contendo adaptador proteico
TLR	Toll-like receptor
TLR1-TLR2	Heterodímero de TLR1 com TLR2
TLR1	Toll-like receptor 1
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRAM	Domínio TIR contendo adaptador molecular
TRIF	Domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN- β
TYK2	Tirosina quinase 2
V	Virchowiano
VIF	Fatores de inflação da variância
WER	Weekly Epidemiological Record

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Hanseníase: Uma doença da antiguidade e da atualidade	20
1.2	Transmissão da doença dá se principalmente pela via aérea	20
1.3	Diagnóstico clínico, sinais e sintomas da doença.....	21
1.4	Diagnóstico laboratorial e eletrofisiológico da hanseníase.....	21
1.5	Formas clínicas e características peculiares	23
1.6	Poliquimioterapia padrão	25
2	Reações hansênicas: classificações, sinais clínicos e fatores de risco	27
2.1.	Reações do tipo 1.....	27
2.2	Reações do tipo 2.....	29
2.3	Tratamento das reações hansênicas	30
2.3.1	Antirreacionais para o controle da reação do tipo 1	30
2.3.2	A terapêutica na reação do tipo 2.....	31
2.3.3	Alternativas medicamentosas no controle das reações hansênicas	32
2.4	A imunidade inata na hanseníase	33
2.4.1	Os receptores de <i>TLR1</i> e <i>TLR2</i> na hanseníase	34
2.5	O <i>Mycobacterium leprae</i> e seus componentes antigênicos	42
2.5.1	O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) e a ocorrência de estados reacionais	42
2.5.2	A lipoarabinomanana (LAM) e a sua relação com as reações hansênicas	45
2.6	A expressão de citocinas na hanseníase e nas reações hansênicas.....	47
2.7	IL-10 e a inibição de citocinas pró-inflamatórias	53
2.8	IFN- γ e mecanismos de transcrição gênica.....	56
3	JUSTIFICATIVA	59
4	OBJETIVOS	60
4.1	Objetivo Geral.....	60
4.2	Objetivos específicos	60
5	METODOLOGIA.....	61
5.1	Tipo de estudo e local da coleta de dados	61
5.2	Universo, amostra e delineamento do estudo	61
5.2.1	Grupo reacional	62
5.2.2	Grupo controle (não reacional)	62

5.2.3	Cálculo para o tamanho da amostra	62
5.3	Crítérios de inclusão/exclusão	63
5.3.1	Dados epidemiológicos e clínicos	63
5.3.2	Dados laboratoriais.....	64
5.3.3	Coleta de sangue periférico para dosagem de anticorpos	65
5.4	Dosagem de anticorpos por ELISA.....	65
5.5	Coleta de sangue periférico para extração de RNA.....	65
5.5.1	Extração de RNA de sangue total.....	66
5.5.2	Quantificação do RNA por espectrofotometria de densidade óptica.....	67
5.5.3	Síntese de cDNA utilizando transcriptase reversa.....	68
5.5.4	PCR da β -Microglobulina	68
5.5.5	Eletroforese de DNA em gel de Agarose 1,5%	69
5.5.6	Expressão de mRNA por PCR em tempo Real	69
5.6	Aspectos éticos da pesquisa.....	70
5.7	Análises estatísticas.....	70
5.7.1	Análise das variáveis clínicas e epidemiológicas	71
5.7.2	Identificação das variáveis laboratoriais caracterizadoras	71
5.7.3	Análise multivariada	72
5.7.4	Análise de variância um critério (<i>Anova One-way</i>).....	72
5.7.5	Correlação simples e correlação parcial.....	72
5.7.6	Diagnóstico de multicolinearidade	73
5.7.7	Análise de trilha (<i>path analysis</i>).....	74
6	RESULTADOS	77
6.1	Caracterização clínica e epidemiológica	77
6.2	Os marcadores de carga bacilar	81
6.3	Expressão gênica	83
6.4	Análise de trilha nos grupos reacionais	87
6.4.1	Análise de trilha no grupo com reação tipo 1.....	89
6.4.2	Análise de trilha no grupo com reação tipo 2.....	94
6.5	Análise de trilha no grupo controle (não reacional).....	97
7	DISCUSSÃO	101
7.1	Dados clínicos e epidemiológicos	101
7.2	Os níveis de anti-PGL-1 e anti-LAM nos grupos reacionais e controle.....	104

7.3	A expressão de IL-10 nas reações hansênicas	106
7.4	A expressão de IFN-γ no grupo controle	108
7.5	Análises de trilha nos grupos reacionais e controle	109
8	APLICAÇÕES PRÁTICAS.....	115
9	CONCLUSÕES.....	116
	REFERÊNCIAS.....	118
	ANEXOS.....	140
	APÊNDICES.....	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase: Uma doença da antiguidade e da atualidade

Hanseníase, uma doença infecciosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e descoberta pelo notável pesquisador Gerhard Armauer Hansen no ano de 1873, é conhecida desde a antiguidade com citações em textos bíblicos que a denominava como lepra, cujos registros em papiros de Ramsés II datam de 4.266 a.C no Egito antigo (JOPLING; McDOUGAL, 1991). Contudo na modernidade autores questionam o termo lepra relatando que esse substantivo não equivale exclusivamente a hanseníase, mas a um conjunto de doenças cutâneas que ao longo do tempo foram sendo classificadas e desvinculadas do termo lepra (CURY, 2010).

Mesmo com o passar dos anos, a hanseníase consiste ainda em uma doença da atualidade pela sua presença em diversos países do mundo, além de representar um desafio para os programas de saúde pública nos países em desenvolvimento como o Brasil, que ocupa o segundo lugar no mundo em número de casos novos da doença.

Foram reportados 211.973 casos novos da doença no mundo em 2015 (2,9 casos por 100.000 habitantes), conforme dados da Organização Mundial de Saúde (WER, 2016). Quanto ao Brasil, registrou-se 26.395 casos novos da moléstia no 2015 sendo que desse total 17.913 foram classificados como multibacilares o que demonstra a presença do diagnóstico tardio (WER, 2016).

1.2 Transmissão da doença dá se principalmente pela via aérea

Estudos fundamentados em análises histológicas da pele e do epitélio nasal de pacientes multibacilares não tratados sugeriram no passado, que tanto a pele quanto mucosa nasal desses pacientes, poderiam dispersar o *M. leprae* no ambiente intra-domiciliar ocasionando risco de transmissão da doença (JOB et al., 2008).

No entanto, um estudo recente de Araujo et al. (2016) envolvendo a análise do DNA por meio da qPCR de amostras das biópsias de concha nasal, *swabs* nasais e da sorologia de pacientes e contatos, comprovou e sistematizou que a via aérea é a principal envolvida na transmissão e disseminação bacilar, que por sua vez favorece a persistência da doença no contexto epidemiológico.

1.3 Diagnóstico clínico, sinais e sintomas da doença

O diagnóstico da hanseníase é basicamente clínico-epidemiológico relacionado com a história, condições de vida do indivíduo e exame dermato-neurológico, cujos principais sinais cardinais da doença são descritos como: lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo (s) periférico (s), com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; e baciloscopia positiva do esfregaço dérmico não podendo excluir aqueles casos com baciloscopia negativa e nem incluir nessa análise casos curados com sequelas (BRASIL, 2016).

Os principais sinais e sintomas da doença de um modo geral estão associados com o acometimento dos nervos periféricos e secundariamente da pele, ocasionando principalmente lesões neurais nos olhos, membros superiores e membros inferiores manifestando-se por alterações na sensibilidade térmica como hiperestesia, hipoestesia e posteriormente anestesia; perda da sensibilidade dolorosa e tátil (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). Quanto as manifestações clínicas tardias, ocorrerá o comprometimento neural a nível troncular havendo parestesias e parestesias acarretando sinais característicos da fase avançada da moléstia como “mão em garra”, “mão caída”, “pé caído”, correspondendo a lesão nos nervos ulnares, radiais e fibulares, respectivamente, o que corresponde a incapacidades físicas e sequelas nos indivíduos (TRINDADE; NEMES, 1992).

1.4 Diagnóstico laboratorial e eletrofisiológico da hanseníase

Por motivos de confusão devido as semelhanças clínicas entre várias formas da doença como ocorre entre os indivíduos tuberculoides e dimorfos-tuberculoides ou entre dimorfo-virchowianos e virchowianos são necessárias o uso de ferramentas tradicionais e outras sofisticadas para definir com maior certeza um caso de hanseníase, ou até mesmo a determinação da forma clínica correta para fins de classificação e eficaz tratamento (FLEURY, 1989).

Os exames mais comuns para auxiliar no diagnóstico da hanseníase são: teste de intradermorreação (Mitsuda), baciloscopia, histopatologia, sorologia, reação de imunoistoquímica, identificação molecular e eletroneuromiografia.

O teste de Mitsuda indica o grau de imunidade do indivíduo ao contato com o antígeno (*M. leprae*) após injeção intradérmica de 0,1 mL desse antígeno, utilizando seringa de insulina na face anterior do antebraço direito distando 3 cm abaixo da dobra antecubital (MITSUDA, 1953). Quanto a interpretação do teste, verifica-se uma reação precoce em 72 horas,

caracterizada por eritema e endureção local (reação de Fernandez), e uma reação tardia, denominada reação de Mitsuda, que após 28 dias, o local de administração do antígeno apresentará características conforme foram definidos no Congresso internacional de Tóquio (1948) interpretados como resultados em: teste de Mitsuda negativo, observando-se ausência de qualquer sinal no local de inoculação antigênica ou nódulo menor que 5 mm de diâmetro; teste de Mitsuda positivo, com presença de nódulo maior ou igual a 5 mm de diâmetro (EICHELMANN et al., 2012).

O exame baciloscópico, considerado aquele de maior utilidade no diagnóstico, é realizado após raspado dérmico das lesões preconizadas pelo Ministério da Saúde (lóbulo das orelhas, cotovelos, joelhos e lesão suspeita) detectando-se o número de bacilos por campo microscópico e indicando-se o índice baciloscópico do indivíduo (IB), expresso por meio de uma escala logarítmica que varia entre 0 e +6 (BRASIL, 2010). O resultado é dado pela média desses índices denominado positivo, maior que zero, como ocorre em indivíduos multibacilares (MB), ou negativo, índice igual a zero, ocorrendo em indivíduos paucibacilares (PB) sendo esses resultados acompanhados pelo índice morfológico que indica o percentual de bacilos íntegros contidos no total de bacilos analisados (BRASIL, 2016).

A histopatologia, realizada em biópsias de pele ou nervo, identifica o bacilo, corado pelos métodos de hematoxilina-eosina e Faraco-fite. Cada forma clínica expressa uma característica histológica, como por exemplo a forma tuberculoide que tem como achados os granulomas tuberculoides, células epitelioides e células gigantes de Langhans cercadas por linfócitos, já a forma virchowiana apresenta escassos linfócitos e a presença de granulomas histiocitários ricos em bacilos (PIRIS; LOBO; MOSCHELLA, 2010).

Outro exame bastante solicitado é a sorologia para hanseníase, que desde a década de 80 utiliza indicadores dos níveis de anticorpos, cujo glicolípido fenólico-1 (PGL-1) é utilizado com maior expressividade por ser o componente antigênico específico do *M. leprae* (MOURA et al., 2008). Elevação de IgM anti-PGL-1, indica presença do antígeno em indivíduos não tratados, exposição recente a indivíduos MB, reação hansênica ou resistência terapêutica. No entanto, os níveis baixos estão presentes nos paucibacilares ou indivíduos tratados com boa resposta terapêutica (LYON et al., 2008).

Os exames moleculares vêm sendo bastante empregados no diagnóstico como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e a PCR em tempo-real, ambas aumentando a sensibilidade diagnóstica, amplificando as sequências do genoma bacilar por meio de técnicas que interferem na taxa de detecção (MARTINEZ, 2014). O estudo de Siwakoti et al. (2016) comparou as técnicas de baciloscopia e PCR na detecção do bacilo em

amostras do esfregaço dérmico de indivíduos MB e PB evidenciando uma sensibilidade expressivamente maior com o uso da PCR em comparação a baciloscopia, permitindo diagnóstico precoce, até mesmo nas formas iniciais da doença (PB).

A eletroneuromiografia analisa a função do sistema nervoso periférico diagnosticando a presença de lesões, a localização e confere informações da patologia (axonal, desmielinizante, mista) se aguda ou crônica, auxiliando no diagnóstico das formas neurais primárias da hanseníase, na evolução da terapêutica nos estados reacionais e nos diagnósticos diferenciais diante de outras neuropatias periféricas (GARBINO, 2007; VERAS, 2012).

Ainda auxiliando no diagnóstico precoce da hanseníase, tem-se a reação de imunoistoquímica, que utiliza anticorpos contra o *M. leprae*, como proteínas, carboidratos e o PGL-1 (BARBOSA et al., 1994).

1.5 Formas clínicas e características peculiares

As manifestações clínicas da hanseníase apresentam relação com o grau de imunidade que o indivíduo, expressa diante do agente etiológico, o que permitiu uma categorização simplificada da doença conhecida como classificação de Madri em 1953 e outra mais completa, a classificação Ridley e Jopling (1966), embasada nas características clínicas, imunológicas e histopatológicas dos pacientes com a presença da forma indeterminada (I) e a divisão em dois grupos polares, sendo o polo tuberculoide (T) com resposta imune celular, resistente ao bacilo, e outro polo o virchowiano (V), com resposta humoral sem resistência ao bacilo, permitindo a proliferação da micobactéria (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Descreve-se ainda um grupo intermediário instável imunologicamente, que são os dimorfos, subdivididos em dimorfo-tuberculoide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowianos (DV), com características similares a cada um dos grupos polares (RIDLEY; JOPLING, 1966). Também estão inclusas, na classificação das formas clínicas, o tuberculoide secundário e virchowiano sub-polar revisados por Ridley e Jopling em 1971 e citadas em estudos após essa revisão (SANABRIA et al., 1979; SADHU; PANJA, 1987).

A hanseníase indeterminada (HI) pode evoluir com cura espontânea, desenvolver-se lentamente, ou ressurgir tardiamente com características de outras formas clínicas do espectro da hanseníase (PFALTZGRAFF; BRYCESON, 1985). Caracteriza-se pela presença de lesão macular hipocrômica (ou eritematosa na periferia da lesão), tamanho variável de 1 cm a 4 cm ou mais, forma anular, localizada na face, membros, tronco e nádegas, com quantidade variável sendo única ou até 3 apresentando distúrbio de sensibilidade ramuscular com anidrose (ou hipohidrose), queda de pelos e sem comprometimento de tronco neural. A

baciloscopia é negativa, Mitsuda positivo ou negativo, biópsia com infiltração de filetes nervosos (com presença de bacilos no seu interior) em que a evolução desta forma para as demais dependerá das características imunológicas do indivíduo levando em média dois anos para evoluir em direção à forma tuberculoide e 5 anos para a virchowiana (OPROMOLLA, 2000).

No polo de resistência imunológica ao bacilo, a forma T mostra-se com lesão única em placa ou em pequena quantidade, com bordas pronunciadas (pápulas periféricas), de tamanho que varia desde a dimensão da “cabeça de um alfinete” a tamanhos diversos, formas anulares ou circulares bem delimitadas apresentando distúrbio de sensibilidade do tipo anestésico, existindo frequentemente um nervo comprometido de modo intenso ocorrendo abscessos de nervo. A baciloscopia nessa forma clínica é negativa, Mitsuda positivo acima de 10 mm com ulceração, biópsia de pele identificada pela formação de granulomas tuberculoides (SOUZA, 1997; OPRMOLLA, 2000).

Quanto aos dimorfos, subdivididos em DT, DD e DV que apresentam alta instabilidade imunológica (OPROMOLLA, 2000).

Os DT se assemelham aos T, porém apresentam lesões em placa com bordas pouco delimitadas surgindo lesões satélites decorrentes das reações tipo 1 (downgrading), lesão de nervo é assimétrica e intensa, Mitsuda positivo, baciloscopia negativa, mas com positividade em um pequeno número e histologia predominando granulomas tuberculoides (SOUZA, 1997).

Sobre os DD, esses representam os verdadeiros dimorfos da classificação de Madri (1953), identificados clinicamente pela presença de lesões de contornos irregulares, tonalidade ferruginosa com centro plano, liso, circular com periferia infiltrada e borda espessa de característica “foveolar” também denominada de “lesões em queijo suíço”. O comprometimento neural é intenso e extenso, baciloscopia positiva, Mitsuda negativo e histologia com traços tuberculoides (OPROMOLA, 2000).

O grupo DV são análogos aos V, uma vez que apresentam numerosas lesões infiltradas de tom acastanhado observando-se nódulos (hansenomas). Essa forma clínica contém poucas lesões neurais, mas há comprometimento visceral, Mitsuda é negativo e a histologia é análoga a dos virchowianos (OPROMOLA, 2000). Há também um grupo intermediário entre os DV e V conhecidos como virchowianos sub-polares (SADHU; PANJA, 1987).

O grupo V manifesta lesões difusas com infiltração cutânea formando pápulas, tubérculos, nódulos (hansenomas), placas de aspecto ferruginoso, acometimento de vários órgãos e externando diversos sinais e sintomas como fácies leonina, madarose caudal,

perfuração de septo nasal, lesões osteoarticulares (lesões líticas), lesões periodontais, laringite (rouquidão e dispneia), acometimento hepático, esplênico, testicular e dentre outros. O comprometimento neural é extenso, mas pouco intenso, baciloscopia sempre positiva, Mitsuda negativo, biópsia de pele com presença de infiltrado histiocitário com numerosos bacilos e escassos linfócitos (OPROMOLA, 2000).

1.6 Poliquimioterapia padrão

Para fins terapêuticos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu no ano de 1988 os critérios para o tratamento da hanseníase estabelecendo uma classificação operacional que subdivide os pacientes em PB (indivíduos com até 5 lesões cutâneas e/ou um nervo periférico acometido e baciloscopia negativa) e MB (indivíduos com mais de 5 lesões cutâneas e/ou mais de um nervo periférico acometido e baciloscopia positiva) (MOSCHELLA, 2004). No Brasil adota-se a Portaria nº 149 de 3 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016) que aprova as diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, definindo os critérios para tratamento conforme classificação operacional e normas da OMS.

A Poliquimioterapia (PQT) padrão consiste na associação de 3 antibióticos que serão administrados de modo supervisionado a cada 28 dias e diariamente (dose autoadministrada) em até 9 meses para casos PB (alta por cura após 6 doses mensais) e até 18 meses para MB (alta por cura após 12 doses mensais) (BRASIL, 2016).

A medicação de ação bactericida é a rifampicina, enquanto que dapsona e clofazimina são bacteriostáticos. A associação desses antimicrobianos pode ocasionar efeitos adversos e impossibilidade de administração desses medicamentos em que a conduta deverá ser o encaminhamento do paciente aos centros de referência (centros especializados) (GONÇALVES et al., 2006).

A rifampicina, um composto semissintético produzido a partir da rifampicina B, é mais potente que seu precursor inibindo a RNA polimerase dependente de DNA nas células procariotas, bloqueando enfim, a síntese de RNA mensageiro e a produção de proteínas essenciais a multiplicação bacteriana (FLOSS; YU, 2005). Na hanseníase, observa-se que em poucos dias após administração da rifampicina não haverá bacilos viáveis em lesões cutâneas ou mucosa nasal por microscopia. Destaca-se a ocorrência de efeitos adversos à rifampicina como a síndrome pseudogripal, insuficiência renal, alterações hepáticas e hematológicas (SILVA et al., 2009).

A dapsona é um medicamento bacteriostático cujo mecanismo de ação é basicamente impedir a síntese do ácido fólico bacteriano pela competição com o ácido paraminobenzóico por uma enzima denominada di-hidropteroato sintetase (ZUIDEMA; HILBERS-MODDERMAN; MERKUS, 1986). Os efeitos adversos mais comuns desse medicamento são anemia hemolítica, metahemoglobinemia e a síndrome sulfona caracterizada por um quadro grave acompanhado de febre, hepatomegalia, icterícia e exantema populoso e dentre outros sinais e sintomas (KUMAR; KUMAR; THAPPA, 1998).

Outra medicação do esquema padrão é a clofazimina de ação bacteriostática e anti-inflamatória (YAWALKAR; VISCHER, 1979). O seu mecanismo de ação consiste na inibição da replicação e crescimento bacteriano, pois o fármaco liga-se ao DNA micobateriano, em específico nas sequências contendo à base guanina (KOROLKOVAS, 2005).

Os efeitos adversos à clofazimina são a xerodermia ictiosiforme, hiperpigmentação da pele, mucosa; dor abdominal e diminuição da peristalse (CASTORINA-SILVA, 2013).

Os indivíduos PB são submetidos a doses supervisionadas durante 6 meses de Dapsona (DDS) na dose de 100mg (1 comprimido) e Rifampicina (RFM) na dosagem de 600mg (2 comprimidos de 300mg) com doses diárias de dapsona de 100mg por dia (BRASIL, 2016).

Os indivíduos MB são manejados com esquemas de tratamento diferente envolvendo o acréscimo da Clofazimina (CFZ) e aumento no tempo de duração da terapêutica que nesse caso serão de 12 meses com doses supervisionadas a cada 28 dias de Rifampicina (600mg, 2 comprimidos de 300mg), clofazimina (300mg, 3 comprimidos de 100mg) e dapsona (100mg, 1 comprimido de 100mg) e dose diária de clofazimina (50mg, 1 comprimido) e dapsona (100mg, 1 comprimido) (BRASIL, 2016).

Existem esquemas alternativos para tratamento da hanseníase indicados na portaria nº 149 de 3 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016), para casos especiais relacionados a transtornos mentais, uso de álcool e/ou outras drogas, situações como resistência medicamentosa e intolerância aos fármacos tradicionais da PQT. Os antibióticos mais comuns incorporados são a ofloxacina (OFX), minociclina (MNC) e nos casos de resistência aos antibióticos tem-se utilizado a claritromicina todos disponibilizados apenas nos serviços de referência (JI et al., 1996).

2 Reações hansênicas: classificações, sinais clínicos e fatores de risco

2.1. Reações do tipo 1

Durante o período que compreende desde antes, durante ou após o tratamento, os pacientes podem ser surpreendidos por alterações no sistema imunológico que se manifestam clinicamente com a presença de lesões na pele e nervos periféricos de modo exacerbado, tal qual são denominadas reações hansênicas, classificadas como reações do tipo 1, reações do tipo 2 ou pela presença concomitante de ambas reações (reação mista) (LIENHARDT; FINE, 1994; FOSS et al., 2005).

Os episódios reacionais podem acometer todas as formas clínicas da doença, exceto aquela inicial conhecida como hanseníase indeterminada (HI) (BRASIL, 2002; FOSS, 2003).

A reação do tipo 1 é de hipersensibilidade tardia ou hipersensibilidade, tipo IV de Gell & Coombs, e acomete principalmente as formas dimorfas (DT, DD, DV) e com menor frequência HT e virchowianos-subpolares (Vsp) (GEORGE et al., 2010).

As reações do tipo 1 podem ser subdivididas em reação reversa denominada *upgrading reaction* e do tipo *downgrading reaction* que são clinicamente indistinguíveis (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990). Ridley e Jopling (1962) já se referiam a ocorrência dessas reações no grupo dimorfo. A reação do tipo 1, *upgrading*, ocorre em indivíduos em tratamento, cursam com redução da carga bacilar, positividade do Mitsuda, isto é, há uma melhora da resposta imunológica com predomínio da resposta Th1 e evolução em direção ao polo T (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990; LOCKWOOD et al., 1993).

Já aquela do tipo *downgrading reaction*, ocorre naqueles pacientes não tratados, caracterizando-se pelo aumento da carga bacilar, aumento nos níveis de anticorpos, cursam com negatividade do Mitsuda, em suma, manifesta-se uma piora da resposta imunológica com expressão da resposta Th2 e evolução em direção ao polo V, instalando-se a imunossupressão nesses indivíduos, o que torna essa reação favorável à multiplicação bacilar (SHULMAN; WILKINSON; NGUYEN, 1982; GOHAR, 2014).

As manifestações clínicas da reação tipo 1 são em especial cutâneas como eritema, infiltração e edema em lesões preexistentes ou o surgimento de novas lesões dérmicas, além da presença de sinais e sintomas de dano neurológico como espessamento neural (edema), dor no nervo acometido, alterações sensitivo motoras com perda da forma muscular podendo ocorrer incapacidades físicas de forma súbita ocasionando “mão em “garra”, “pé caído” e lagofthalmia (VAN BRAKEL, 2000; BRASIL, 2016). Em relação ao acometimento sistêmico

e laboratorial, não é acentuado, não ocorrendo alterações hematológicas ou bioquímicas (NERY, 1995). Porém, sinais e sintomas como febre, mal-estar, obstrução nasal, dores ósseas, linfadenomegalias e artralgias podem estar presentes, principalmente, naqueles pacientes da forma DV (REA; MODLIN, 1989).

O perfil epidemiológico da reação tipo 1, há o predomínio do sexo masculino, faixa etária de 30 a 44 anos, com primeiro estado reacional ocorrendo durante o tratamento (TEIXEIRA; SILVEIRA; FRANÇA, 2010). Algumas literaturas citam que as reações do tipo 1 ocorre em 8% a 33% dos indivíduos (LIENHARDT; FINE, 1994), já em estudos nacionais 64,5% dos pacientes desenvolveram reação do tipo 1 durante o tratamento cuja forma clínica mais acometida foi a DT (35,1%) (ANTUNES et al., 2013).

São considerados fatores de risco para as reações do tipo 1 o grupo dimorfo, vacinação com BCG (*Bacilo de Calmett Guerrín*), gestação, uso da PQT, infecções, infestações e estresse emocional (VAN BRAKEL; KHAWAS; LUCAS, 1994; MANANDHAR; LeMASTER; ROCHE, 1999). Scollard e colaboradores (2015) associou como fatores de risco para reação do tipo 1 o sexo masculino, estado nutricional e o grupo MB.

O histopatológico da reação reversa tem como característica a presença de granulomas organizados, formados por células epitelioides e células gigantes do tipo Langhans, edema dérmico, aumento no número de linfócitos ao redor dos granulomas, diminuição na quantidade de bacilos íntegros (RIDLEY; RADIA, 1981).

Na reação do tipo *downgrading* observa-se granulomas desorganizados (afrouxamento) e aumento na quantidade de bacilos íntegros, ausência de células gigantes de Langhans, redução de linfócitos T, edema de fibras de colágeno (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990; PINQUIER, 2011).

Sob o ponto de vista imunológico, a reação do tipo *upgrading* caracteriza-se pelo aumento na contagem de linfócitos T, da atividade das células *Natural Killers* (NK), aumento da interleucina 2 (IL-2) e de seus receptores (IL-2R). Ocorre também a redução nos níveis de linfócitos B e de anticorpos IgG, (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990).

Quanto a reação tipo 1 *downgrading* observa-se aumento quantitativo de linfócitos B e nos níveis de anticorpos IgG, além da redução na contagem de linfócitos T e queda na atividade de células *NK* (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990).

2.2 Reações do tipo 2

A reação tipo 2, é sistêmica relacionada a formação de imunocomplexos no sangue e depósito desses nos tecidos, especialmente pele, rins e articulações, sendo, portanto, uma reação de hipersensibilidade tipo III de Gell & Coombs, acometendo pacientes multibacilares com elevados índices baciloscópicos em específico DV e V (JOPLING, 1970).

A apresentação clínica peculiar é o surgimento nódulos subcutâneos, eritematosos, dolorosos, quentes e moveis à palpação conceituados como eritema nodoso hansênico (ENH) que podem evoluir para necrose caracterizando o eritema nodoso necrotizante (POCATERRA et al., 2006). Uma outra manifestação cutânea é o eritema multiforme hansênico (EM) caracterizado por lesões máculo-papulares, eritemato-purpúricas com presença de vesículas e bolhas que podem necrosar após ruptura. Essa apresentação ocorre em 8% das reações e pode ser confundida com a reação do tipo 1 em especial nos DV (NERY et al., 1999). A presença de sinais e sintomas extracutâneos e sistêmicos são marcantes nesse tipo de reação hansênica, posto que, essa se trata de doença do complexo imune sistêmica causando manifestações como febre, mal-estar, hiporexia, perda de peso e acometimento de outros órgãos, ocasionando também, neuropatia periférica, orquiepididimite, glomerulonefrite, miosite, artralgias, iridociclite, hepatomegalia e enfartamento de gânglios (BRASIL, 2016). Alterações hematológicas e bioquímicas podem estar presentes na reação tipo 2 como leucocitose, neutrofilia, plaquetose, aumento das proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa, fosfatase alcalina, transaminases, fibrinogênio e elevação de imunoglobulinas das classes IgG e IgM (LANGUILLON; CARAYON, 1986; REA, 2001, 2002).

Quanto a epidemiologia da reação tipo 2, Kahawita, Walker e Lockwood (2008) descrevem que esse tipo de reação apresenta uma frequência de ocorrência variando de 19% a 26% na Ásia e de 37% no Brasil. Outros estudos enfatizam que 50% dos virchowianos e 30% dos DV são acometidos por esse tipo de reação, cuja maior frequência é no período do primeiro e segundo ano após início da PQT (PFALTZGRAFF; RAMU, 1994). O sexo de maior acometimento é o masculino na faixa de 30 a 44 anos (TEIXEIRA; SILVEIRA; FRANÇA, 2010).

Em relação aos fatores de risco para os estados reacionais do tipo 2, autores reportam a forma clínica virchowiana e índice baciloscópico maior que 4 (KAHAWITA, WALKER; LOCKWOOD, 2008). Fatores como gestação, puberdade, estresse, vacinação e doenças intercorrentes são citados para este tipo de reação (PFALTZGRAFF; RAMU, 1994).

A histopatologia do ENH caracteriza-se pela hiperplasia epitelial com denso infiltrado inflamatório neutrofílico na derme e subcutâneo, influxo de linfócitos e leucócitos polimorfonucleares formando microabscessos, acometimento dos capilares observando-se edema das células endoteliais, infiltração do endotélio por células mononucleares, espessamento da camada elástica, dilatação vascular, congestão e angiogênese com presença de bacilos fragmentados e granuloses (FLEURY, 2000).

2.3 Tratamento das reações hansênicas

As reações hansênicas constituem uma situação de urgência necessitando de intervenção medicamentosa e terapêutica multiprofissional no controle desse evento, pois o curso evolutivo dos estados reacionais acarreta lesão neural, infecções secundárias e conseqüentemente incapacidades físicas/sequelas que perpetuam o estigma relacionado a doença e ocasiona mortalidade.

2.3.1 Antirreacionais para o controle da reação do tipo 1

Diagnosticada a reação hansênica do tipo 1, recomenda-se a utilização de um potente agente anti-inflamatório, um glicocorticoide, especificamente a prednisona, de administração oral cuja dose recomendada é de 1 a 1,5mg/kg/dia, com redução inicial da dose em 10 mg a cada 15 dias e ao alcançar a dose de 20 mg, a redução passa a ser de 5 mg a cada 15 dias (BRASIL, 2016).

O mecanismo de ação consiste basicamente no processo de difusão do glicocorticoide através da membrana celular (molécula lipofílica) ligando-se a receptores no citoplasma e formando um complexo que sofre transformação estrutural que favorece a entrada desse no núcleo celular, que por sua vez, se liga a regiões promotoras de certos genes induzindo a síntese de proteínas anti-inflamatórias como a lipocortina-1 (envolvida na síntese de prostaglandinas pela inibição de fosfolipase A2). Posteriormente, um mecanismo genômico denominado transrepressão, em que o complexo glicocorticoide-receptor associa-se a fatores de transcrição como proteína ativadora 1, promovendo inibição do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), reduzindo enfim, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e prostaglandinas (VAN DER VELDEN, 1998).

Ao prescrever a corticoterapia, deverão ser administrados em conjunto medicamento antiparasitário específico para *Strongiloides stercoralis* (tiabendazol 50 mg/kg/dia, em 3 tomadas por 2 dias; ou 1,5 g em dose única; ou Albendazol na dose de 400 mg/dia durante 3 a 5 dias consecutivos) e profilaxia da osteoporose (cálcio 1.000 mg/dia associado à vitamina D 400-800 UI/dia e/ou Bifosfonatos) (BRASIL, 2016). Todavia estudos recentes recomendam o uso de ivermectina em dose única variando de ½ comprimido a 3 comprimidos conforme escala de peso (MENDES et al., 2017).

Os principais efeitos adversos causados pelo uso corticoterapia são hipertensão intracraniana, distúrbios do humor, catarata, glaucoma, hipertensão arterial, edema, insuficiência cardíaca congestiva, infarto agudo do miocárdio, esofagite, gastrite, úlcera gastroduodenal, osteoporose, miopatia, necrose da “cabeça” do fêmur e úmero, hiperglicemia (diabetes), elevação do colesterol e triglicérides, hipopotassemia, leucocitose, estrias, acne, hirsutismo, equimoses, púrpuras, eritema facial e fâcies de lua cheia (síndrome de Cushing) (LONGUI, 2007).

Outras ações como manter a PQT (não a reintroduzindo em pacientes pós alta); imobilização do membro caso esse seja afetado por neurite; avaliação da função motora e sensitiva antes da corticoterapia, redução do corticoide conforme resposta terapêutica e realizar ações de prevenção de incapacidades (BRASIL, 2016).

Neurites de difícil controle e pacientes reacionais que não respondem ao tratamento convencional, deverão ser encaminhados aos serviços de referência para pulsoterapia em ambiente hospitalar (BRASIL, 2016).

2.3.2 A terapêutica na reação do tipo 2

O medicamento indicado para controle da reação tipo 2 é a talidomida na dose de 100 a 400 mg/dia de acordo com a gravidade do caso clínico e laboratorial (BRASIL, 2016).

A talidomida foi sintetizada na Alemanha em 1954 e introduzida no mercado em 1956 naquele mesmo país para ser utilizada como sedativo (STIRLING; SHERMAN; STRAUSS, 1997). No entanto, na década de 60 surge a associação dessa droga com a deformidade fetal (teratogenicidade/focomelia) após uso desse medicamento por gestantes obrigando a retirada do mesmo do mercado mundial (MELCHERT; LIST, 2007).

Em 1965 no estado de Israel pacientes da hanseníase passam a utilizar a talidomida para fins sedativos quando se observa a melhora clínica daqueles pacientes afetados pelo ENH, o que acarretou ao longo dos anos sua liberação em 1998 pelo órgão americano *Food*

and Drug Administration (FDA) restringindo o medicamento a casos especiais como o citado anteriormente (RADOMSKY; LEVINE, 2001). No Brasil a Lei nº 10.651, de 16 de abril de 2003, no artigo 1º, inciso III, exige que a embalagem e o rótulo exibam de forma clara a proibição de seu uso por mulheres grávidas ou sob risco de engravidar.

O mecanismo de ação da talidomida no auxílio do controle do ENH são o imunomodulador e anti-inflamatório pela inibição do TNF- α , interleucina 8 (IL-8), interleucina 12 (IL-12), regulação negativa da expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II e aumentando a expressão de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5) suprimindo também a produção de anticorpos da classe IgM (WU et al., 2005).

Os principais efeitos adversos relacionados ao uso da talidomida são: sonolência, vertigem, alterações de humor, bradicardia, trombose venosa profunda, edema periférico, hipo e hiperglicemia, hipotireoidismo, náuseas, constipação, eritema palmar, prurido, xerose, diminuição da libido, menstruação irregular e teratogenicidade (TSENG et al., 1996).

Além do uso da talidomida, são necessárias medidas associadas ao tratamento medicamentoso para controlar a reação do tipo 2, como: manutenção da PQT (não reintroduzindo nos pacientes em situação de alta); associar corticosteroide em casos de comprometimento neural; imobilizar membro afetado, se houver acometimento neural; avaliar a função sensitivo e motora; redução da dose medicamentosa consoante resposta terapêutica; realizar ações de prevenção de incapacidades; profilaxia para tromboembolismo (AAS 100 mg/dia associada a talidomida) (BRASIL, 2016).

Pacientes que apresentam contraindicações ao uso da talidomida (gestantes), presença de lesões oculares, hiperemia conjuntival, embaçamento visual (com ou sem manifestações cutâneas), mãos e pés reacionais (presença de edema nos membros), glomerulonefrite, orquiepididimite, artrite, vasculite, neurite e eritema nodoso necrotizante deverá utilizar corticoides para controle desses agravos (BRASIL, 2016).

2.3.3 Alternativas medicamentosas no controle das reações hansênicas

Existem algumas alternativas consideradas como medicamentos de segunda linha para o tratamento das reações do tipo 1 e 2, sendo de extrema importância citá-los, embora o uso desses fármacos não sejam uma realidade prática na rotina dos serviços públicos de saúde, sendo eles a azatioprina, metotrexato, ciclosporina, pentoxifilina e inibidores de fator de necrose tumoral.

A azatioprina é uma droga imunossupressora análogo sintético da purina e inibe a proliferação linfocitária apresentando uma boa eficácia quando associado a prednisolona nas reações do tipo 1 (BARSHEES; GOODPASTOR; GOSS, 2004). Seu uso isolado nas reações do tipo 1 e 2 não apresentaram bons resultados segundo alguns estudos, assim como o metotrexato também não apresentou resultados satisfatórios no tratamento das reações do tipo 2 quando administrado isoladamente (MARLOWE et al., 2004).

Já a ciclosporina, um potente supressor da imunidade celular, bloqueia a transcrição de IL-2 e outras citocinas de ação pró-inflamatória, podendo esse agente atuar nas reações do tipo 2, cuja imunidade mediada por célula esteja envolvida, visto que, nesse tipo de reação, a imunidade celular não seja a principal característica (KIANI; RAO; ARAMBURU, 2000).

A pentoxifilina tem ação semelhante a talidomida reduzindo os níveis de TNF- α circulante dos pacientes com reação do tipo 2, ainda que este fármaco não tenha a efetividade da talidomida (KAR; RABU, 2000).

O infliximabe e o etanercepte são inibidores de fator de necrose tumoral existindo estudos relatando o sucesso no tratamento da reação do tipo 2, no entanto, há estudos que reportam uma possível evolução da hanseníase em pacientes com doença ativa em tratamento para artrite reumatoide, já que, TNF- α é um dos agentes imunológicos responsáveis pela manutenção do granuloma evitando a disseminação da doença (SCOLLARD; JOYCE; GILLIS, 2006).

2.4 A imunidade inata na hanseníase

De maneira conceitual, o sistema imunológico se divide em duas funções, imunidade inata e imunidade adaptativa. O sistema imune inato descreve os mecanismos de defesa preexistentes, inespecífico e limitado agindo por meio de barreiras físicas, químicas e biológicas além da função de reconhecimento de patógenos pela ação de células efetoras, cujas principais são: células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células NK (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

O *M. leprae* ao interagir com o hospedeiro entra em contato com a primeira barreira física, o epitélio nasal, imunoglobulina A (IgA) e secreções, além de desencadear a liberação de citocinas que estimulam a diferenciação de células dendríticas, macrófagos e vias antimicrobianas (MODLIN, 2010).

Uma das primeiras células a ter contato com o bacilo são as células dendríticas que o reconhece como um padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) por meio de

receptores de lectina tipo C como o CD206, um receptor de manose, desencadeando a produção de TNF- α e ativação da via microbicida do macrófago (VASCONCELOS et al., 2011).

As células dendríticas (DCs) são estratégicas ao sistema imune inato e adaptativo, pois elas são responsáveis pela ligação entre ambos devido a sua função de captura, processamento e apresentação de fragmentos peptídicos do antígeno aos linfócitos T CD4 e T CD8 desencadeando respostas adaptativas (BANCHEREAU et al., 2000). Outro receptor que se liga a lipoarabinomanana é o receptor de lectina tipo C expresso em células dendríticas o DC-SIGN (dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin) também conhecido como CD209, responsável pela inibição da maturação de DCs e indução da produção de IL-10 (BARREIRO et al., 2006).

Outro componente importante desse sistema é o macrófago, cujas funções primordiais são a de fagocitose e apresentação antigênica via molécula de MHC, resultando em ações microbicidas, tumoricidas secretando citocinas pró-inflamatórias, reparo tecidual via IL-4 e reguladora com a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófagos ao fagocitar o *M. leprae*, por meio de receptores de lectina-C e receptores de complemento (1, 3 e 4) que se ligam ao PGL-1, expõe o bacilo aos componentes do fagolisossomos (reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio) para degradar os componentes do patógeno em sequências peptídicas e expô-las em sua superfície associada ao MHC classe II para os receptores de células T *naive*. No entanto, o *M. leprae* apresenta um mecanismo de escape desencadeado pelo PGL-1 que inibe ânions superóxido favorecendo a persistência do bacilo no interior do macrófago (THANGARAJ, 1990).

Como mencionado, existem diversos receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes principalmente na membrana de células efetoras do sistema imune inato que reconhecem diferentes tipos de ligantes, porém aqueles de maior interesse na hanseníase e nessa pesquisa são os receptores do tipo *toll*, conhecidos como *toll-like receptors* (TLRs) especialmente o *TLR1* e *TLR2* nas suas formas homodiméricas ou heterodiméricas *TLR1-TLR2* (KAWAI; AKIRA, 2009).

2.4.1 Os receptores de *TLR1* e *TLR2* na hanseníase

A proteína *Toll* foi descoberta na década de 90 em insetos do gênero *Drosophila* após evidências da ação importante dessas moléculas na proteção contra infecções fúngicas

(ROEDER et al., 2004). Foi identificada no ano 1997, proteína homóloga ao *Toll* em seres humanos, nomeada de *Toll-like receptor* sendo atualmente identificados 10 tipos delas exercendo ação contra patógenos e essencial ativação dos sistemas da imunidade inata e adaptativa (PANDEY; KAWAI; AKIRA, 2014).

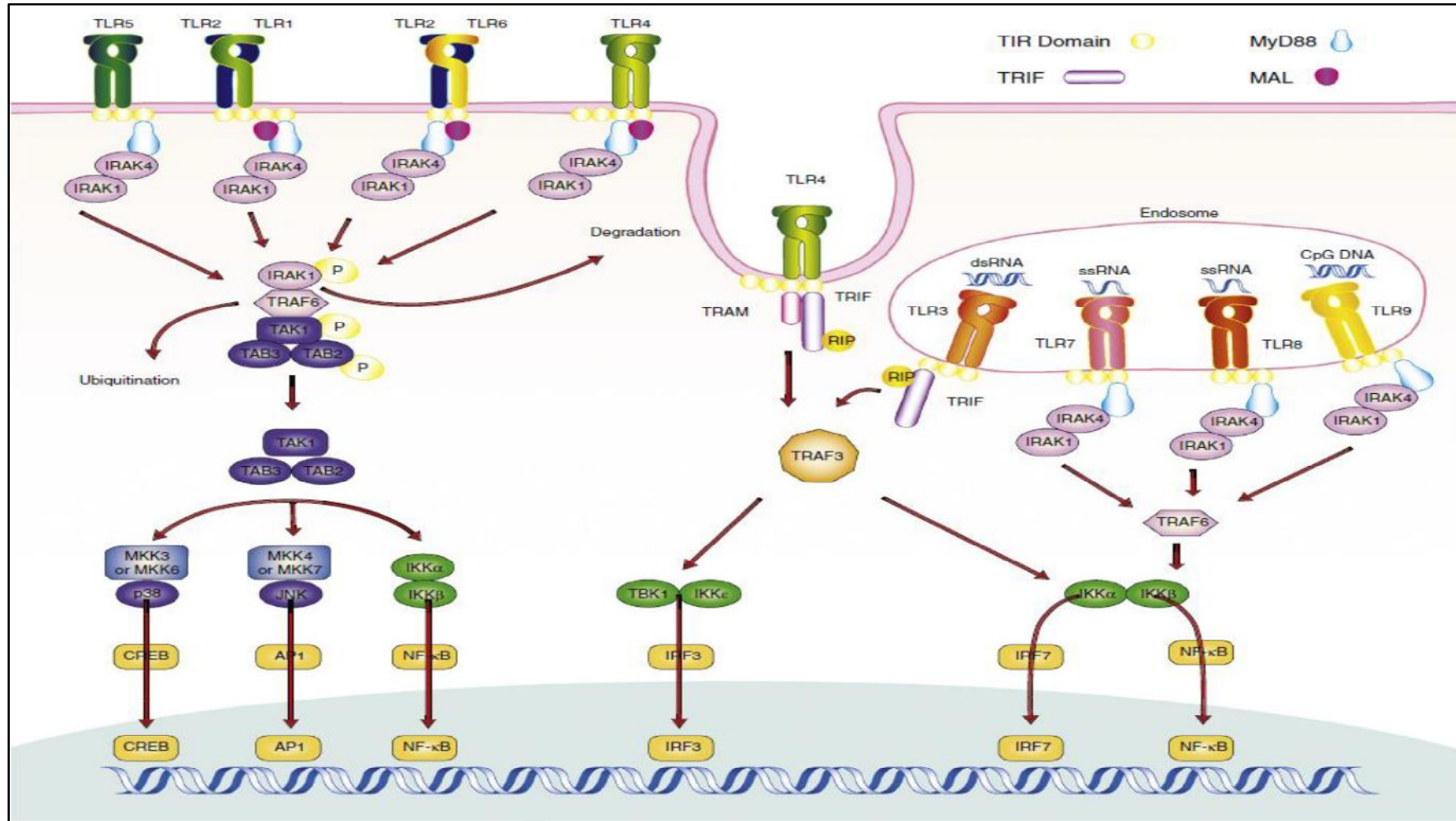
Os *TLRs* estão localizados em diferentes sítios, em células efectoras como macrófagos e DCs. Os *TLRs* 1, 2, 4, 5 e 6 localizam-se na membrana plasmática, apresentando dois domínios, um extracelular envolvido no reconhecimento de diferentes PAMPs (rico em repetições ricas em leucina) e outro domínio intracelular composto por proteínas do tipo *Toll/IL-1 receptor (TIR)*, *myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88)*, *TIR-domain-containing adaptor protein inducing beta interferon - β (TRIF)*, *TIR-domain-containing adaptor protein (TIRAP)*, e *TIR-domain-containing adaptor molecule (TRAM)* importantes na iniciação de sinais intracelulares. Quanto aos *TLRs* 3, 7, 8, 9, 10 estão presentes no endossomo (OZINSKY et al., 2000).

Cada *TLR* apresenta diferentes ligantes, assim o *TLR1* reconhece lipopeptídeos de micobactérias, *TLR2* liga-se ao lipoarabinomanana de micobactérias, lipoproteínas, lipopetídeos, zymosan de fungos, glicolipídeos e dentre outros. O *TLR3* tem como ligante RNA viral de cadeia dupla, *TLR4* liga-se a lipopolissacarídeos de bactérias gran-negativas, *TLR5* a flagelina, *TLR6* reconhece micoplasmas, *TLR7* e *TLR8* RNA de cadeia simples, *TLR9* ao DNA não metilado (bacteriano) e o *TLR10* às moléculas não identificadas em bactérias (JIMENEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2016).

Os *TLRs* apresentam vias de sinalização diferenciadas, porém basicamente há semelhança em diversos mecanismos. Assim, quando algum PAMP é reconhecido os *TLRs* recrutam as moléculas adaptadoras *MyD88* e *MAL (MyD88-adaptor-like)* para seus domínios *TIR (Toll/IL-1 receptor)* (SATO; AKIRA, 2016). *MyD88* recruta as proteínas quinases 1 e 4 associadas ao receptor da interleucina 1 (IRAK-1 e IRAK-4), que ativarão o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) formando um complexo com IRAK1 que posteriormente serão fosforilados sofrendo dissociação em um complexo proteico formado pelo fator de crescimento β associado a quinase 1 (TAK1), Proteína 2 de ligação-TAK1 (TAB2) e Proteína 3 de ligação-TAK1 (TAB3) que por sua vez também sofrerão fosforilação ativando o TAK1 que conduz a ativação do complexo complexo de quinase I κ B (IKK) formado pelas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e regulatória IKK γ . O complexo IKK degrada I κ B ligado ao NF- κ B que passa a ser liberado e translocado ao núcleo realizando funções como a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (JIMENEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2016). O fator de transcrição CREB

(proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc) também pode ser conduzido ao núcleo após degradação de MKK3 (proteínas quinase 3 ativadoras de mitose) ou de MKK6 (proteínas quinase 6 ativadoras de mitose) que ativam a p38 (proteína quinase ativada por mitógenos) induzindo a produção de IL-10 pelos macrófagos (SANIN; PRENDERGAST; MOUNTFORD, 2015).

Figura 1 - Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll.



Fonte: JIMENEZ-DALMARONI et al. (2016).

O *M. leprae* apresenta dentre os principais componentes na sua parede celular a lipoarabinomanana (LAM) e na sua cápsula o PGL-1 que contém um grupo fenólico glicosilado, ambos ligantes lipídicos reconhecidos pelos receptores *TLR2* (homodímero) e pelo heterodímero *TLR2-TLR1* que desencadeiam vias para matar micro-organismos intracelulares, influenciando componentes da imunidade inata e adaptativa estimulando linfócitos T ou B (THOMA-USZYNSKI et al., 2001; KRUTZIK et al., 2003);

A expressão dos receptores *TLR2* e *TLR1*, designados como CD282 e CD281 respectivamente, foram bastante estudadas na hanseníase. Tapping e Tobias (2003) reportaram a ação dos *TLR1* e *TLR2* (heterodímero) mediando forte ativação de NF-kB no reconhecimento de componentes micobacterianos como o ara-LAM.

Pesquisando a expressão de *TLR1* e *TLR2* nas lesões das formas polares da hanseníase Krutzik et al. (2003) verificou que esses receptores estavam fortemente presentes nas lesões de pacientes tuberculoides quando comparado aos virchowianos, no entanto, a expressão do receptor *TLR2* em monócitos circulantes foram similares em ambas as formas clínicas e o *TLR1* foi indetectável.

Devido a sua importante função na detecção das lipoglicanas, lipomananas e lipoarabinomananas das micobactérias e na ativação de macrófagos durante a infecção pelo *M. leprae*, nos últimos anos, os autores têm-se dedicado a investigar se a presença de mutações e ou polimorfismos podem acarretar susceptibilidade, seja a doença ou a ocorrência de reações hansênicas. Mutações são alterações em uma ou mais bases no DNA ocasionando síntese de novas proteínas, podendo ser deletérias ao indivíduo ou neutra, cuja sua frequência de ocorrência é menor que 1% e os principais tipos são de substituição (transição e transversa), inserção ou deleção (TAWATA; AIDA; ONAYA, 2000). Embora os cromossomos homólogos sejam bastante similares dentro de uma espécie, poderá variar em determinadas localizações do cromossomo onde estão presentes os genes (loci), em uma frequência superior a 1%, e essa variação é conceituada como polimorfismo (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Os polimorfismos, em várias espécies, determinam variação fenotípica não acarretando nenhum malefício, no qual o exemplo é a fenotipagem sanguínea ou podem influenciar no desfecho de doenças, comportando-se como fatores de risco ou fatores de proteção para diferentes doenças (OLSSON et al., 2001).

Mutação (P816H) no gene do receptor *TLR2* foi reportada e relacionada a inibição de TNF- α em pacientes infectados por micobactérias (*M. tuberculosis*) os tornando susceptíveis a disseminação desses patógenos (UNDERHILL et al., 1999).

Kang e Chae (2001) encontraram associação entre mutação (Arg677Trp) no gene do *TLR2* e a forma clínica virchowiana, evidenciando ainda baixa produção de TNF- α e IFN- γ após estimular células mononucleares desses pacientes portadores da mutação com antígenos do *M. leprae*, relatando também, limitação na produção de linfócitos e susceptibilidade a proliferação bacilar nesses doentes.

Bochud, Hawn e Aderen (2003) utilizando células cultivadas provenientes de cobaias (ratos) portadores da mutação (Arg677Trp) no gene do *TLR2*, observaram que após estímulo com PGL-1 não foi observado ou detectado TNF- α , mencionando que este gene polimórfico não foi capaz de mediar a ativação do fator de transcrição NF-kB.

Em outros estudos, Kang et al. (2004) mencionaram novamente a presença da mutação (Arg677Trp) no gene do *TLR2* em paciente virchowianos ocasionando queda na produção de IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ e aumento de IL-10 em sobrenadante de células desses pacientes portadores da mutação após estímulo com antígenos do *M. leprae* quando comparados a virchowianos e outras formas clínicas não mutantes.

A relação acarretando risco entre a forma clínica virchowiana e o polimorfismo no alelo marcador microssatélite 282 bp do gene de *TLR2* foi relatada por Bochud et al. (2008) quando comparados com pacientes tuberculoides, ocasionando, susceptibilidade a disseminação bacilar.

Analisando a influência do polimorfismo microssatélite no intron 2 do gene de *TLR2*, Suryadevara et al. (2013) compararam portadores do genótipo/alelo com longas repetições de GT e portadores do genótipo/alelo com curtas repetições de GT demonstrando a relação de susceptibilidade à hanseníase àqueles portadores dos genótipos/alelos longos (maior frequência entre os doentes) e evidenciando ainda baixa expressão de mRNA de *TLR2* e altos níveis de IL-10 em PBMCs de indivíduos portadores de repetições longas de GT e estimulados com antígenos suluveis do *M. leprae*.

Johnson et al. (2007) apontaram associação entre o polimorfismo I602S no alelo 602S do *TLR1* e proteção contra a hanseníase ao encontrar maior frequência desse alelo no grupo controle saudável.

Misch et al. (2008) confrontando as formas clínicas polares T e V quanto a associação com polimorfismos de base única (SNP) do *TLR1* (T1805G, Trs5743563C, Ars5743565G dentre outros) e avaliando a frequência de alelos e genótipos, não evidenciaram tal achado que justificasse susceptibilidade ou resistência as formas disseminadas da doença, no entanto, ressaltam a associação da forma V com os genótipos GG e TG.

Pesquisando o perfil de susceptibilidade para hanseníase, Wong et al. (2010) compararam pacientes com controles saudáveis quanto a presença do polimorfismo *rs5743618* no gene de *TLR1*. Os autores encontraram maior frequência do genótipo homozigoto 602S na população saudável mostrando a ocorrência de fator de proteção contra a hanseníase.

Marques et al. (2013) reportaram que o polimorfismo N248S (*rs4833095*) nos genótipos 248SS e 248NS do gene do *TLR1* foram associados a susceptibilidade à hanseníase em estudo de caso controle verificadas a expressão gênica por sequenciamento genético. Ainda nesse mesmo estudo, sobrenadantes de células estimuladas com antígenos do *M. leprae* foram analisadas quanto ao perfil de citocinas evidenciando queda na resposta imune dos indivíduos portadores dos genótipos 248SS e 248NS do *TLR1* quando comparadas aos não portadores desse alelo.

2.4.2 A associação das reações hansênicas com os receptores do tipo *toll*

Em um estudo de caso e controle, o *TLR2* nas suas formas polimórficas, alelo microsatélite marcador-280bp e o alelo 597C→T foram associados ao risco elevado para desenvolvimento de reação do tipo 1, ao compararem indivíduos reacionais àqueles não reacionais (BOCHUD et al., 2008).

Misch et al. (2008) pesquisando a presença de SNP *TLR1* T1805G e sua associação com a reação do tipo 1, foi atribuída relação do alelo 1805G como fator de proteção contra a reação do tipo 1. No entanto, nesse mesmo estudo os autores relatam que o polimorfismo *Trs574392C* no gene do *TLR1* apresentou maior frequência alélica no grupo com reação tipo 1 acarretando assim maior risco para ocorrência da reação reversa. A presença de associação entre polimorfismos no gene do *TLR1* e reações do tipo 2 não foram observadas em nenhum alelo analisado nesse mesmo estudo de Misch et al. (2008) que envolvesse susceptibilidade a esse evento.

Schuring et al. (2009) observou associação entre a expressão de SNP N248S no gene de *TLR1* em pacientes com reação do tipo 1 e 2 quando comparados àqueles indivíduos não reacionais, identificando o alelo S248 conferindo risco a reação tipo 1 e proteção para a reação tipo 2.

O quadro 1 apresenta um resumo da revisão de literatura envolvendo os receptores *TLR1* e *TLR2*

Quadro 1 - Revisão da literatura envolvendo os principais achados sobre *TLR1* e *TLR2*.

Principais estudos	Principais achados	Referências
Estudos mostrando o mecanismo de sinalização dos <i>TLRs</i>	"ativação do fator de transcrição NF-kB e síntese de citocinas pró-inflamatórias"	(AKIRA; TAKEDA, 2004; HEMMI; AKIRA, 2005; KAWASAKI; KAWAI, 2014)
<i>TLR2</i> (modulação)	"a sinalização de <i>TLR2</i> é crucial para a indução da produção de IL-10 por macrófagos (imunomodulação) "	(JANG et al., 2004; HU et al., 2006)
<i>TLR2</i> (modulação)	"Estimulação de <i>TLR2</i> conduz a uma rápida liberação de IL-10 (imunomodulação), sugerindo <i>Cross-talk</i> entre <i>TLR2</i> , <i>TLR3</i> e 4"	(BENKHART et al., 2000; RE; STROMINGER, 2004)
<i>TLR 1</i> e <i>TLR2</i>	"Pacientes da forma T expressam mais <i>TLR1/TLR2</i> nas lesões cutâneas quando comparados a forma V, porém no sangue circulante não há diferenças entre as formas clínicas citadas quanto a expressão de <i>TLR2</i> "	(KRUTZIK et al., 2003)
<i>TLR 1</i> e <i>TLR2</i> (Heterodímero)	"A formação do heterodímero <i>TLR-TLR2</i> potencializou o reconhecimento do LAM (<i>M. tuberculosis</i>) induzindo resposta imune celular, resposta de <i>TLR2</i> sem a formação do heterodímero induziu ativação de NF-kB, mas em baixa intensidade"	(TAPPING; TOBIAS, 2003)
<i>TLR1</i> e <i>TLR2</i> (Heterodímero)	"Utilizando macrófagos (<i>TLR1</i> ^{-/-}) ou (<i>TLR2</i> ^{-/-}) autores demonstraram que o heterodímero interage no reconhecimento de triacil-lipoproteínas e que a ausência de um desses receptores causou dano na ativação do fator NF-kB; O macrófago do tipo selvagem (<i>TLR1-TLR2</i>) produz TNF- α de modo dose dependente em relação ao ligante"	(TAKEUCHI et al., 2002)
<i>TLR2</i> - polimorfismo	"SNP 597C->T proteção contra RR, alelo microsatelite 280bp, elevado risco para RR, Alelo microsatelite 282bp risco para forma disseminada (V), Alelo microsatelite 288bp proteção contra forma V"	(BOCHUD et al., 2008)
<i>TLR2</i> - mutação	" Mutação Arg677Trp ocasiona aumento de IL-10, redução IL-2, IL-12 e IFN- γ "	(KANG et al., 2004)
<i>TLR2</i> - mutação	"Susceptibilidade a infecção pelo <i>M. leprae</i> , queda nos níveis de IFN- γ "	(KANG; CHAE et al., 2001)
<i>TLR2</i> - polimorfismo	"Macrófagos <i>knock-out</i> (<i>TLR2</i> ^{-/-}) apresentam falha no mecanismo de ativação do fator NF-kB assim como ocorre em pacientes com polimorfismo no gene de <i>TLR2</i> que apresentam baixos níveis de TNF- α "	(BOCHUD; HAWN; ADEREM, 2003)
<i>TLR2</i>	" A formação de organelas lipídicas induzidas pelo <i>M. leprae</i> , promoveu a síntese de PGE ₂ e IL-10 com via dependente da sinalização de <i>TLR2</i> e 6"	(ALMEIDA et al., 2009; MATTOS et al., 2010, 2011; ELAMIN; STEHR; SINGH, 2012)
<i>TLR1</i> - Polimorfismo	"Polimorfismo no alelo 248S risco para RR (p-valor não significativo) e fator de proteção contra ENH (p-valor significativo); genótipo heterozigoto S248S fator de proteção para ENH e risco para RR (p-valor não significativo); Genótipo S248N risco para ENH e proteção contra RR (p-valores não significativos)"	(SCHURING et al., 2009)
<i>TLR1</i> - Polimorfismo	"Polimorfismo no alelo 602S acarretou proteção contra hanseníase"	(JOHNSON et al., 2007)
<i>TLR1</i> - Polimorfismo	"SNP (Trs5743592C) alelo dominante acarretou risco para reação tipo 1; haplótipos TG e TATTAG associaram a proteção contra reação tipo 1; SNP T1805G conferiu proteção contra a reação tipo 1"	(MISCH et al., 2008)
<i>TLR1</i> - Polimorfismo	"SNP (rs5743618) foi mais frequente na população saudável acarretando fator de proteção contra hanseníase em estudos de caso e controle em diferentes países"	(WONG et al., 2010)
<i>TLR1</i> - Polimorfismo	"SNP (N248S) nos genótipos homozigoto (NN) e heterozigoto (NS) e alelo S promovem risco para adoecer de hanseníase..";	(MARQUES et al., 2013)

2.5 O *Mycobacterium leprae* e seus componentes antigênicos

O *M. leprae*, um parasita intracelular obrigatório, pertence a ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*, mede aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro. Predomina no interior de macrófagos formando aglomerados ou globias, reproduz por divisão binária de forma bastante lenta, aproximadamente de 11 a 13 dias, mantendo-se viável em fragmentos de biópsias por até 10 dias a 4°C e em secreção por 7 dias na temperatura de 20°C (KATOCH; SHARMA, 2000).

O bacilo é uma bactéria gram-positiva álcool-acido-resistente quando submetido a coloração de Ziehl-Neelsen devido a alta concentração de lipídeos em especial o ácido micólico, presente na parede celular das micobactérias (SHEPARD, 1960; BRASIL, 2010).

A viabilidade bacilar é pesquisada desde o século XIX por Hansen e Looft (1895) e com o avanço da microscopia óptica e eletrônica foi possível observar em amostras obtidas por esfregaço dérmico e biópsias o bacilo granulado ou fragmentado corado de forma irregular correlacionando esse achado com a morte bacilar. Por outro lado, o bacilo pode estar viável caso essa coloração esteja íntegra (TRUMAN; KRAHENBUH, 2001).

O índice morfológico pode avaliar a viabilidade bacilar, e alguns estudos têm encontrado pacientes submetidos a 12 doses de PQT com positividade no índice morfológico (LASTÓRIA et al., 2006). Cabe ressaltar que o uso da microscopia eletrônica, não isenta de subjetividade a interpretação de exames que dependem da observação humana.

Quanto aos componentes antigênicos do *M. leprae*, sua parede celular é rica em peptídeoglicanos, ácidos micólicos e lipopolissacarídeos como a lipoarabinomanana (LAM) um potente imunomodulador, enquanto que a capsula bacilar é composta pelo PGL-1, o antígeno específico desse patógeno, que também apresenta atividades imunossupressoras (SIBLEY et al., 1988; SPENCER et al., 2011). A análise desses componentes nos estudos da hanseníase tem sido bastante explorada, principalmente pelonexo causal entre antígenos do *M. leprae* e o potencial de desencadear os estados reacionais, seja antes, durante ou após o tratamento (OPROMOLLA, 1994; WILKINSON; LOCKWOOD, 2005).

2.5.1 O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) e a ocorrência de estados reacionais

Dentre os diversos antígenos precipitantes das reações hansênicas, um dos mais citados como marcador de risco para os estados reacionais é o glicolípido fenólico I (PGL-1). Desde a

descoberta da estrutura química desse componente em 1981, ocorreram grandes avanços em pesquisas na hanseníase (HUSSAIN et al., 1990).

O PGL-1 foi um dos primeiros antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* a ser isolado, sendo considerado o principal glicolípido presente na parede celular do bacilo, e composto por um trissacarídeo único, o 3,6-di-O-metila- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-metila- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-metila- α -L-ramnopiranosose, cujo determinante antigênico é a última porção di- e trissacarídica da molécula, pois utilizando-se anticorpos monoclonais, foi possível analisar com mais precisão o componente antigênico, uma vez que a remoção de ácidos graxos da molécula do PGL-1 ocasionou a perda de ligação desse componente com anticorpos possibilitando a síntese do açúcar PGL-1 conjugado a albumina bovina e posteriormente a humana para emprego na sorologia da hanseníase (HUNTER; FUJIWARA; BRENNAN, 1982; YOUNG et al., 1984).

Atualmente, o PGL-1 tem sido utilizado em muitos estudos e na rotina profissional em diversas condutas como auxiliar no monitoramento de contatos (indicador de exposição passiva a caso índice), auxílio ao diagnóstico, classificação das formas clínicas, monitoramento da terapia, diferenciação entre reação e recidiva (VAN BEERS; DE WIT; KLATSER, 1996).

O *M. leprae* por meio do PGL-1 promove um mecanismo complexo de imunorregulação apresentando características diferentes nas diversas formas clínicas. O PGL-1 facilita o processo de fagocitose desencadeado pelos macrófagos e DCs conduzindo a menor produção de citocinas pró-inflamatórias impedindo a fusão do fagossomo com o lisossomo (FREHEL; RASTOGI, 1987). Quando o bacilo é processado via MHC e expresso na membrana celular de DCs infectadas, o sistema complemento é ativado promovendo a deposição do componente C3 que é reconhecido pelo receptor CD46, presente na membrana celular de linfócitos, que secretam IL-10, além de estimular outras citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β propiciando uma resposta Th2 inibidora da atividade antimicrobiana (GOULART et al., 1996; GOMES et al., 2008).

A sorologia anti-PGL-1 mostrou-se eficiente na diferenciação das classificações operacionais mostrando soropositividade nos indivíduos com elevados níveis desse antígeno específico do *M. leprae* quando comparado àqueles com baixos níveis antigênicos (VAN DER VLIET et al., 1996).

Analisando os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 durante o tratamento, Silva et al. (2007) demonstraram novamente que esse antígeno pode diferenciar os pacientes MB e PB, além da eficácia terapêutica, pois observou-se decréscimo dos níveis antigênicos ao longo do

tratamento daqueles pacientes não reacionais, por meio do monitoramento da sorologia ELISA (*clearance bacilar*).

Um estudo clássico realizou o monitoramento sorológico dos anticorpos IgM anti-PGL-1 em pacientes virchowianos ao longo do tratamento e constataram a redução dos níveis desse anticorpo comparando a sorologia do início e final do tratamento, no entanto esse desfecho não foi observado naqueles pacientes com ENH (DOUGLAS et al., 1988).

Pacientes que cursaram sem reações hansênicas, apresentaram decréscimos nos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 quando monitorados os índices desse anticorpo antes e após tratamento, como observou Zenha, Ferreira e Foss (2009) ao avaliarem 3 grupos de pacientes, sob diferentes regimes terapêuticos divididos conforme número de doses em 24 doses (MB), 12 doses (MB) e 6 doses (PB), cujo desfecho foi a presença de depuração da carga bacilar em todos os grupos.

Pacientes do polo virchowiano apresentam maior quantidade de IgM contra o PGL-1, com soropositividade variando entre 80 a 100%, já o outro polo, o tuberculoide, que devido a sua imunidade contém pouco antígeno e conseqüentemente baixos níveis de IgM anti-PGL-1 teve positividade entre 30 a 60% (PARKASH et al., 2008).

Estudos demonstraram indícios da influência antigênica do PGL-1 no desencadeamento de reações hansênicas, assim o índice baciloscópico (IB) e a sorologia ELISA anti-PGL-1 expressam o quantitativo antigênico dos pacientes, pois indivíduos com $IB > 2$ e sorologia anti-PGL-1 positivos no diagnóstico terão risco elevado ocorrência de reações pós alta (BRITO et al., 2008).

A comparação sorológica dos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 e IgG anti-LAM entre aqueles pacientes que desenvolveram reação do tipo 1 e não reacionais foi significativamente diferente, evidenciando maiores níveis de antígenos naqueles indivíduos com reação tipo 1, caracterizando maior risco para reação nesse grupo (ROCHE; THEUVENET; BRITTON, 1991).

Outra forte evidência do antígeno PGL-1 como potencial fator de risco nas reações hansênicas, neste caso em específico, a reação reversa, é a positividade da PCR de amostras de biópsias de pele coletadas no diagnóstico mostrou-se um marcador de reação tipo 1 naqueles indivíduos com uma lesão de pele (SOUSA et al., 2007).

Na reação tipo 2, o PGL-1 é indicado como forte fator preditivo para ocorrência desse desfecho, uma vez que pesquisas demonstraram que $IB > 4$ e presença de infiltração na pele, mostraram-se bons marcadores de risco para reações do tipo ENH (MANANDHAR; LEMASTER; ROCHE, 1999).

Os níveis de anticorpo IgG e IgM anti-PGL-1 foram analisados naqueles pacientes reacionais, encontrando maiores quantidades de IgG anti-PGL-1 no grupo com reação tipo 1 e maiores níveis da classe IgM anti-PGL-1 reação tipo 2 (LEVIS et al., 1986; LYONS et al., 1988).

Silva et al. (2007) pesquisando os níveis de IgM anti-PGL-1 nas diversas formas clínicas da hanseníase e estados reacionais, constataram que na reação tipo 2 houveram maiores níveis desse anticorpo quando comparado ao grupo MB não reacional.

Para reforçar, pesquisas verificaram que após a primeira dose de PQT na média de 3,2 meses, a maioria dos pacientes apresentam o primeiro estado reacional (reação do tipo 2, no estudo citado), que esteve associado a ação microbicida da PQT sobre o bacilo, ocasionando liberação de antígenos e formação de imunocomplexos que desencadeiam a reação do tipo ENH (POCATERRA et al., 2006).

A positividade do anticorpo IgM anti-PGL-1 do diagnóstico foi analisada quanto fator preditivo para reações hansênicas durante o tratamento demonstrando risco elevado (*Odds ratio* >4), o que demonstra a grande proporção de indivíduos com sorologia positiva no grupo reacional e a forte associação da carga bacilar com esse desfecho (ANTUNES et al., 2013).

2.5.2 A lipoarabinomanana (LAM) e a sua relação com as reações hansênicas

O lipoarabinomanano, designado LAM, está presente na parede celular de micobactérias, tendo como clássicos exemplos o *M. leprae* e o *M. tuberculosis*, cuja principal função dessa molécula nesses patógenos frente ao hospedeiro é inativar reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (vias antimicrobianas desencadeadas por macrófagos) conferindo sobrevivência desses patógenos no interior do fagócito e escape da ação linfocitária (SIBLEY et al., 1990).

O LAM é o principal constituinte da parede celular das micobactérias sendo reportada em diversos estudos a sua função na patogênese da imunidade humoral mediando a sua interação com o macrófago e promovendo a inibição do IFN- γ , bloqueando a resposta de base imune celular eficaz no controle das infecções bacterianas (SIBLEY et al., 1988).

O LAM é sintetizado por meio da adição de resíduos de manose ao fosfoinositol por uma série de manosiltransferases para produzir o fosfatidil inositol-manose (PIM) e lipomanano (LM) (KORDULAKOVA et al., 2002). PIM e LM são então glicosilados para formar o LAM, conhecida por apresentar três classes, sendo eles o complexo lipoarabinomanana nanosilados (ManLAM) uma molécula anti-inflamatória que inibe a

produção de TNF- α e IL-12 por células dendríticas humanas e macrófagos (GUERARDEL et al., 2007). Outra classe é a lipoarabinomanana com arabinose (AraLAM) que induz a transcrição do mRNA para citocinas como TNF- α , IL1- α , IL1- β , IL-6, IL-8 e IL-10 caracteristicamente produzidos por macrófagos (GUERARDEL et al., 2007). E o terceiro componente é o lipoarabinomanana fosfoinositideo (PILAM) que poderá induzir a ativação de uma cascata de sinalização intracelular que ativa fatores de transcrição que induzem síntese de citocinas pró-inflamatórias (CHAN et al., 1991; GUERARDEL et al., 2007).

Roche et al. (1995) pesquisando o efeito oposto do IFN- γ e IL-10 em cultura de macrófagos não humanos, após estímulo com lipopolissacarídeos (LPS) e LAM, verificaram principalmente que a interação Ara-LAM e macrófagos promoveu a expressão de IL-10 por essas células nas primeiras 6 horas mostrando o potencial papel do LAM na sobrevivência do bacilo.

Analisando os níveis de IgG e IgM anti-LAM em diferentes formas clínicas, Levis et al. (1986) relataram maiores níveis desses anticorpos em V, DV e DD reportando correlação entre a carga bacilar (IB dos esfregaços dérmicos) e o LAM nesses pacientes.

Beuria et al. (1998) verificaram a expressão das subclasses da IgG anti-LAM nas formas clínicas da hanseníase, constatando que os níveis de IgG₁ e IgG₂ foram elevados naqueles indivíduos das formas clínicas DV e V quando comparados aos T e DT, além das maiores concentrações desses anticorpos naqueles com doença ativa, em tratamento, quando relacionados àqueles já tratados.

Outro estudo Verhagen et al. (1999), analisando a presença de antígenos do *M. leprae* em amostras extraídas de biópsias de pele utilizando anticorpos monoclonais, identificaram por meio de imunohistoquímica, elevada expressão de LAM e PGL-1 nas lesões de DV e V. Ainda os mesmos autores informaram, ao analisar as biópsias de pele antes, durante e após tratamento, que o antígeno LAM persiste por mais tempo nos tecidos averiguados quando comparado ao PGL-1, ou seja, apresenta *clearance* bacilar lento em relação ao PGL-1.

Estudos mais recentes demonstraram novamente a expressão do anti-LAM nas formas clínicas da hanseníase, de modo que, os níveis desse anticorpo se mostrou elevado nas formas DV e V (não abordando os DD na pesquisa) mesmo quando comparado a proteínas recombinantes do *M. leprae* em amostras de soro (SPENCER et al., 2011). Ao caracterizar anticorpos e citocinas enquanto marcadores para dano neural e reações hansênicas, foi descrita associação entre as formas DV e V e elevados níveis de IgG₁ e IgG₃ anti-LAM (JADHAV et al., 2011).

Considerando a atividade do antígeno LAM nos estados reacionais, Levis et al. (1986), ao detectarem os níveis de expressão de anticorpos nos soros de pacientes acometidos pelas reações hansênicas, reportaram que a IgM e IgG anti-LAM estão envolvidas na patogênese do ENH, visto que nesse tipo de reação há maiores níveis desses anticorpos.

Na reação tipo 2, os níveis de IgG₁ anti-LAM foram maiores que naqueles expressos em pacientes MB (DD, DV e V) e conseqüentemente maior que nos indivíduos PB (DT e T) ambos não reacionais, inferindo que este antígeno seja o maior imunógeno envolvido na resposta imune humoral e na reação mediada por imunocomplexos na hanseníase. (DHANDAYUTHAPANI et al., 1992).

A soropositividade para IgG anti-LAM nas reações do tipo 2 foi descrita por Beuria et al. (1998) em níveis mais elevados quando confrontadas informações daqueles indivíduos MB após tratamento e similares àqueles MB em tratamento. Nessa mesma pesquisa, os autores dosaram os níveis das diferentes classes de IgG (1, 2, 3 e 4) anti-LAM comparando os mesmos nas duas reações da hanseníase, verificando que a IgG (1, 2 e 4) na reação tipo 2 tiveram valores maiores quando comparadas à reação tipo 1.

Na pesquisa para marcadores de danos neurais e reações hansênicas, pacientes reacionais e não reacionais foram comparados quanto aos níveis de IgG₁ e IgG₃, não encontrando diferenças quantitativas entre esses anticorpos, todavia, o grupo reacional não foi estratificado quanto ao tipo de reação (tipo 1 e tipo 2), visto que estudos anteriores apontam a relação entre LAM e ENH (JADHAV et al., 2011).

2.6 A expressão de citocinas na hanseníase e nas reações hansênicas

A comunicação entre os sistemas imune inato e adaptativo ocorre pela ação das células dendríticas, cujas principais funções são a captura de antígenos e a apresentação desses aos linfócitos T. Essa apresentação ocorre via MHC, que conforme as proteínas codificadas podem ser chamadas de classe I, classe II ou classe III (ABBAS; JANEWAY, 2000).

Previamente, DCs presentes nos tecidos (pele, fígado, intestino) reconhecem o antígeno, que por sua vez serão fagocitados por macrófagos, e posteriormente envolvidos pelo endossomo que se fundirá com os lisossomos que por ação enzimática, fragmentará o patógeno em moléculas peptídicas. Esses fragmentos peptídicos se ligarão ao MHC classe II e serão expressos na membrana celular da célula apresentadora de antígeno e reconhecidos pelo linfócito T CD4 por meio do receptor de célula T (TCR) (SHORTMAN; LIU, 2002).

Após ativação por células dendríticas, as células T CD4 são estimuladas a proliferar por ação das citocinas como a IL-2, um fator de crescimento, e posteriormente a célula T CD4 expressará receptores de IL-2 (IL-2R) e produzirão IL-2 de ação autócrina e parácrina (WAN, 2010). Depois da proliferação, a célula T CD4 se diferencia em células T *helper* (Th), cujos principais tipos são Th1, Th2 e Th17 envolvidas em diferentes respostas imunes mediadas por célula (WAN, 2010). São diversos os fatores que direcionam o tipo diferenciado de resposta celular via produção de citocinas, no qual um dos principais consiste na interação entre os receptores de reconhecimento padrão e seus ligantes (componentes antigênicos) (WATERHOUSE et al., 2004).

Essa interação pode gerar padrões distintos de citocinas que pela ligação aos receptores específicos na célula T CD4 poderá induzir uma diferenciação para via Th1, promovida pela IL-12 e IFN- γ (sintetizando IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β); via Th2, induzida pela IL-4 e IL-13 (produzindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) ou Th17, realizada por IL-6 (promovendo indução de IL-17, IL-17F e IL-22) podendo ocorrer uma resposta mista, no entanto um tipo de padrão predominará (WATERHOUSE et al., 2004).

São observadas outras subpopulações de linfócitos T provenientes do precursor Th0 como os linfócitos T reguladores (LT_{Reg}), produtor de citocinas imunossupressoras como IL-4, IL-10, TGF- β ; linfócitos T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) responsáveis pela ativação de DCs e linfócitos B, produzindo IFN- γ e IL-4; dentre outros tipos celulares (CRUVINEL et al., 2010).

As respostas que não envolvem anticorpos são denominadas de respostas mediadas por células ou imunidade celular, com participação de células T CD 8 citotóxicas, além de células do sistema imune inato como células *NK*, monócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos (ABBAS; JANEWAY, 2000).

A resposta de hipersensibilidade tardia, tipo IV de Gell & Coombs, geradas contra patógenos que vivem dentro de macrófagos ou em outros tipos celulares, tais como, células endoteliais e células de *Schwann*, são mediadas por linfócitos, macrófagos, histiócitos e monócitos que se deslocam até o local da infecção orientados por citocinas presentes no local da reação migrando também com auxílio das moléculas de adesão (L-PAM, L-Selectina) (ABBAS; JANEWAY, 2000).

O dano tecidual direto é causado por linfócitos T citotóxico (CD8), enquanto que os linfócitos T auxiliares (CD4) irão secretar citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-2 que recrutam monócitos que se diferenciam em macrófagos tornando-os mais potentes na ação microbicida via atividade aumentada de óxido nítrico, radicais de oxigênio e secreção de enzimas proteolíticas, sendo também responsável pela formação do granuloma (ABBAS;

LICHTMAN, 2003). Esse tipo de reação ocorre na hanseníase sendo nomeada de reação hansênica do tipo 1.

A imunidade humoral é aquela mediada por anticorpos, que são glicoproteínas produzidas e expressas na membrana celular do linfócito B, cuja função primordial é o reconhecimento de antígenos por meio da ligação ao epítopo antigênico conduzindo a ações que eliminarão o patógeno por mecanismos de neutralização, aglutinação, opsonização, ativação de complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (JANEWAY et al., 2002). A neutralização é um processo cuja imunoglobulina ocupa o receptor do patógeno impedindo-o de se ligar a receptores nas membranas celulares evitando sua ação (JANEWAY et al., 2002). Na aglutinação, o anticorpo se liga a um grupo de antígenos tornando-os aglutinados e susceptíveis as células fagocíticas (JANEWAY et al., 2002). As imunoglobulinas também podem atuar como opsoninas ligando antígenos a células fagocíticas, promovendo a fagocitose e desencadeando a morte do patógeno por mecanismos lisossomo-dependente (geração de produtos do cloro, defensinas e enzimas proteolíticas) ou lisossomo-independente (vias dos radicais de oxigênio e do óxido nítrico) (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

Outro meio de atuação do sistema imune humoral no controle de patógenos é pelo sistema complemento, que consiste em ativar uma séria de proteínas precursoras inativas que se tornam ativadas sequencialmente, cujas ações finais consistem na opsonização, lise de patógenos, quimiotaxia, síntese de mediadores inflamatórios e eliminação de complexos imunes pelas vias clássica, alternativa e via de lectina (WALPORT, 2001).

A citotoxicidade celular dependente de anticorpos é uma importante atividade efetora do sistema imune humoral, pois células *killers* (macrófagos/monócitos, *natural killer*, eosinófilos, neutrófilos) possuem receptores Fc (FcRs) em suas membranas que permitem a ligação na porção Fc do anticorpo, já acoplado ao antígeno promovendo a morte do patógeno (WALPORT, 2001). A citotoxicidade celular dependente de anticorpos, não ocorre por fagocitose, uma vez que o patógeno é muito grande, esse processo desencadeia morte extracelular via liberação de agentes tóxicos como peroxidases e proteínas catiônicas (WALPORT, 2001).

A hipersensibilidade do tipo III de Gell & Coombs, é causada por complexos imunes de antígenos e anticorpos, podendo ser locais ou sistêmicas, envolvendo apenas imunoglobulinas que podem ativar complemento como IgM, IgA e todas as subclasses de IgG com exceção de IgG₄. Esses complexos antígeno e anticorpo (complexo Ab-Ag) são depositados no endotélio de pequenos vasos sanguíneos presentes principalmente no rim,

fígado, pele e articulações conduzindo uma resposta inflamatória resultante da doença do complexo imune (CRUVINEL et al., 2010) A formação do complexo Ab-Ag ativa o primeiro componente da via clássica do sistema complemento, C1 por meio da porção Fc do anticorpo, processo conhecido como fixação do complemento. Resumidamente a solubilização e eliminação do complexo imune necessitará da formação de C3b (após clivagem de C3 pela enzima C4b2a) que interage com o complexo Ab-Ag limitando o seu tamanho e evitando que se tornem insolúveis e depositados nos capilares sanguíneos. Assim C3 se liga ao complexo imune e posteriormente ao receptor CR1 nos eritrócitos que transportarão esses complexos até o fígado e baço onde os macrófagos reconhecem e captam o complexo Ab-Ag removendo-os, permitindo aos eritrócitos de circularem novamente pelos vasos sanguíneos (MALGORZEWICZ et al., 2014). Sintomas como febre, mal-estar, artralgias, eritema nodoso, glomerulonefrite e hepatomegalia são decorrentes da interação entre os complexos Ab-Ag e os componentes C3a e C5a do complemento, pois esses ativam basófilos que produzem aminas vasoativas (histamina) ocasionando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Esses componentes, C3a e C5a, também ativam neutrófilos que liberam enzimas e, por conseguinte, degradam a membrana basal, além de mediadores inflamatórios que ativarão macrófagos. Esse tipo de reação pode ser observada naquela do tipo 2, que acomete indivíduos DV e V (TOMIMORI-YAMASHITA et al., 1999). A elevação de IL-10 nas reações imune-humoral pode ser explicada pela sua atividade estimuladora da proliferação e diferenciação de células B que por sua vez secretam imunoglobulinas em sua membrana (ITOH et al., 1994; GIRNDT, 2002).

Na hanseníase os principais achados observaram associações entre as formas clínicas e os perfis de citocinas Th1, Th2 e Th17. No entanto, outras subpopulações de células T podem estar envolvidas na polarização da doença e nos estados reacionais como as respostas envolvendo células T_{Reg} e Th9.

Mensurando a expressão do mRNA de citocinas presentes em amostras de biópsias cutâneas, distintos padrões foram encontrados nas formas T e V. Na forma T existe o predomínio da resposta Th1 com a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12, IL-18, IL-23 e linfotóxina- α , observando um granuloma nas lesões contendo dentro linfócitos T CD4⁺ e na parte externa linfócitos T CD8⁺ com intensa atividade do macrófago conduzindo a morte bacilar (BARNES et al., 1992). Quanto ao grupo V houve o perfil Th2 intenso com expressão de IL-4, IL-5 e IL-10, estimulação e proliferação de linfócitos B, com escassa formação de granuloma nas lesões, cujo predomínio é de linfócitos T CD8⁺ (MEHRA; MODLIN, 1990; YAMAMURA et al., 1991). Elevada presença de TGF- β

nas lesões de pacientes DV e V pôde ser constatada, além da elevada carga antigênica de LAM e PGL-1 responsáveis pela atividade imunossupressora nessas formas clínicas (GOULART et al., 1996).

Comparando o espectro clínico da doença, estudos descrevem o perfil de citocinas presentes nas lesões de pacientes da hanseníase utilizando amostras sorológicas mensuradas pelo método ELISA o que permitiu observar que os níveis de IFN- γ é maior nas formas T e DT e reduzida nos V, enquanto que a expressão de IL-10 é maior nos V, DV e DD decrescendo à medida que se aproximam do polo T. O TNF- α foi elevado na forma T, e nas demais formas não houve diferença na expressão (MOUBASHER et al., 1998).

O paralelo entre os polos T e V utilizando culturas de PBMC quanto a expressão de citocinas após tratamento com estímulos de diversos antígenos micobacterianos, permitiu notar que pacientes T expressaram maiores níveis de IFN- γ quando comparado aos V. Em relação a IL-10, não houve diferença na expressão dessa citocina ao comparar T e V. O tipo de antígeno interferiu na produção de citocinas, visto que outros antígenos micobacterianos não induziram a produção de IFN- γ naqueles pacientes do estudo (MACHADO et al., 1998).

Com a finalidade de pesquisar a atividade das células T_{Reg} e Th17 nos diferentes polos da doença, culturas de PBMC foram estimuladas com antígeno do *M. leprae*. As células T_{Reg} foram maiores nos pacientes DV e V com maior produção da citocina imunossupressora IL-10, que também apresentou correlação negativa com a citocina IL-17 (Th17) em pacientes desse grupo. Quanto aos pacientes T e DT, esses apresentaram perfil Th17 com produção de elevados níveis de CD4⁺CD45RO⁺ e IL-17 (envolvidas na produção de citocinas inflamatórias) quando comparados ao grupo DV e V (SADHU et al., 2016).

Ainda sobre o perfil Th17, culturas de PBMC de pacientes das formas T, V e grupo controle, estimuladas com antígenos de *M. leprae*, tiveram o sobrenadante avaliado quanto a expressão de citocinas da subpopulação Th17. A IL-17 e IL-21 tiveram maiores níveis nos controles e pacientes T em conjunto com o perfil Th1 quando comparados com a forma V, que apresentaram baixas expressões de citocinas Th17 e elevada presença de citocinas Th2 (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

O perfil Th9, cuja principal citocina é a IL-9 de atividade pró-inflamatória, foi analisado comparando amostras de biópsias de pele de pacientes T e V. Assim, análises imunohistoquímicas revelaram que a IL-9 apresentou maior expressão em lesões do grupo T, já as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β tiveram maiores níveis nas lesões cutâneas dos V além da correlação negativa dessas citocinas com a IL-9 (DE SOUSA et al., 2016).

Em relação ao perfil de citocinas nos estados reacionais, muitas pesquisas foram conduzidas sobre esse desfecho.

Análises de cultura celular permitiram verificar a expressão de mRNA de citocinas expressas em PBMC de pacientes DV e V com reação tipo 1 e tipo 2, antes e após tratamento com estímulo antigênico (*M. leprae*). A presença de IFN- γ foi predominante na reação tipo 1, independente do estímulo com *M. leprae* (LAM ou PGL-1), no entanto a presença de IL-10 foi preponderante na reação do tipo 2 antes e após estimulação, sendo que alguns pacientes com reação do tipo 1 expressaram IL-10 após estimulação (SREENIVASAN et al., 1998).

O perfil sorológico de citocinas daqueles pacientes com reação tipo 2 quando comparados aos controles não reacionais (DV e V), foram favoráveis a maiores níveis de IL-10, IFN- γ e IL-1 β . Os níveis de IFN- γ e IL-1 β no grupo com reação tipo 1 também foram elevados quando comparados ao seu grupo controle, formado por pacientes (T, DT, DD, DV) (MOUBASHER et al., 1998).

Comparando paciente com reação tipo 1 e tipo 2 por meio de amostras sorológicas, IFN- γ , IL-10 e IL-1 β foi maior na reação tipo 2 quando comparados àqueles com reação tipo 1, com diferença significativa encontrada apenas referente aos níveis de IL-10. O TNF- α , importante na formação do granuloma, foi mais elevada na reação tipo 1, enquanto que a IL-10 esteve elevada na reação tipo 2 o que caracterizou sua atividade indutora de células B na resposta imune humoral (MADAN; AGARWAL; CHANDER, 2011).

Análise comparativa do mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias daqueles pacientes com reação hansênica do tipo 1 e do tipo 2 utilizando amostras de biópsias de pele, mostrou a expressão de IL-10, IL-12, IL-6 e TNF- α em ambos os tipos de reação. Contudo, o IFN- γ esteve presente em maiores níveis na totalidade daqueles pacientes com reação reversa (MORAES et al., 1999).

Uma pesquisa sobre biomarcadores plasmáticos envolvendo pacientes de ambas as reações hansênicas (tipo 1 e tipo 2) utilizando citocinas e quimiocinas encontrou novas associações envolvendo a expressão de CXCL10 e IL6 com a reação tipo 1 e a relação entre IL-7 e o fator de crescimento BB derivado de plaquetas (PDGF-BB) como potenciais marcadores laboratoriais da reação tipo 2 (STEFANI et al., 2009).

O interesse pela ação das células do perfil Th17 também foi despertado nas reações hansênicas, especialmente naquelas do tipo 2. Utilizando amostras de biópsias cutâneas de pacientes antes e após uso da talidomida, pesquisou-se a expressão de mRNA de citocinas do perfil Th17 e sua influência nesse tipo de reação e ação do fármaco sobre essas citocinas, tendo como resultado a expressão de IL-17A antes e após uso do medicamento, e aumento do

fator de transcrição para diferenciação de células T reguladoras (FOXP3 - forkhead box P3) e IL17C (IL-21) relacionando a presença dessa resposta imunológica com a patogênese da reação tipo 2 (MARTINIUK et al., 2012).

Outro estudo pesquisou a influência da resposta Th17 nas reações do tipo 1 e tipo 2 comparando-os com os respectivos controles DT e V não reacionais por meio de culturas de PBMC estimuladas com antígenos de *M. leprae*. As citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23 estiveram elevadas nos grupos reacionais e houve uma redução na expressão de FOXP3 e TGF- β notando-se uma atividade pró-inflamatória nessas reações (SAINI et al., 2016).

2.7 IL-10 e a inibição de citocinas pró-inflamatórias

A interleucina 10 (IL-10), também conhecida como fator inibidor da síntese de citocinas, apresenta importantes funções imunomoduladoras e propriedades anti-inflamatórias que influenciam as atividades de vários tipos celulares do sistema imunológico. IL-10 é secretada principalmente por linfócitos T ativados, monócitos, macrófagos, DCs, células NK e linfócitos B (SEKI et al., 1998).

Após a síntese de citocinas pró-inflamatórias, a IL-10 é secretada ligando-se a subunidade alfa do receptor de IL-10 (IL-10R-alfa) que conduz à fosforilação de *Janus Kinase 1* (JAK1) associada ao IL-10R-alfa, bem como a fosforilação da tirosina quinase 2 (TYK2) ligada a subunidade beta do receptor de IL-10 (IL-10R-beta) (KOTENKO et al., 1997). Estas quinases fosforilam os resíduos de tirosina (Y446 e Y496) localizados no domínio intracelular de IL-10R-alfa. Posteriormente os resíduos fosforilados atuam como locais de ancoragem temporários para o transdutor de sinal e activador de transcrição-3 (STAT3) (DONNELLY et al., 1999). JAK1 promove a fosforilação de STAT3, que então se transloca para o núcleo inibindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 consoante figura 2 (LEVY; BROUET, 1994).

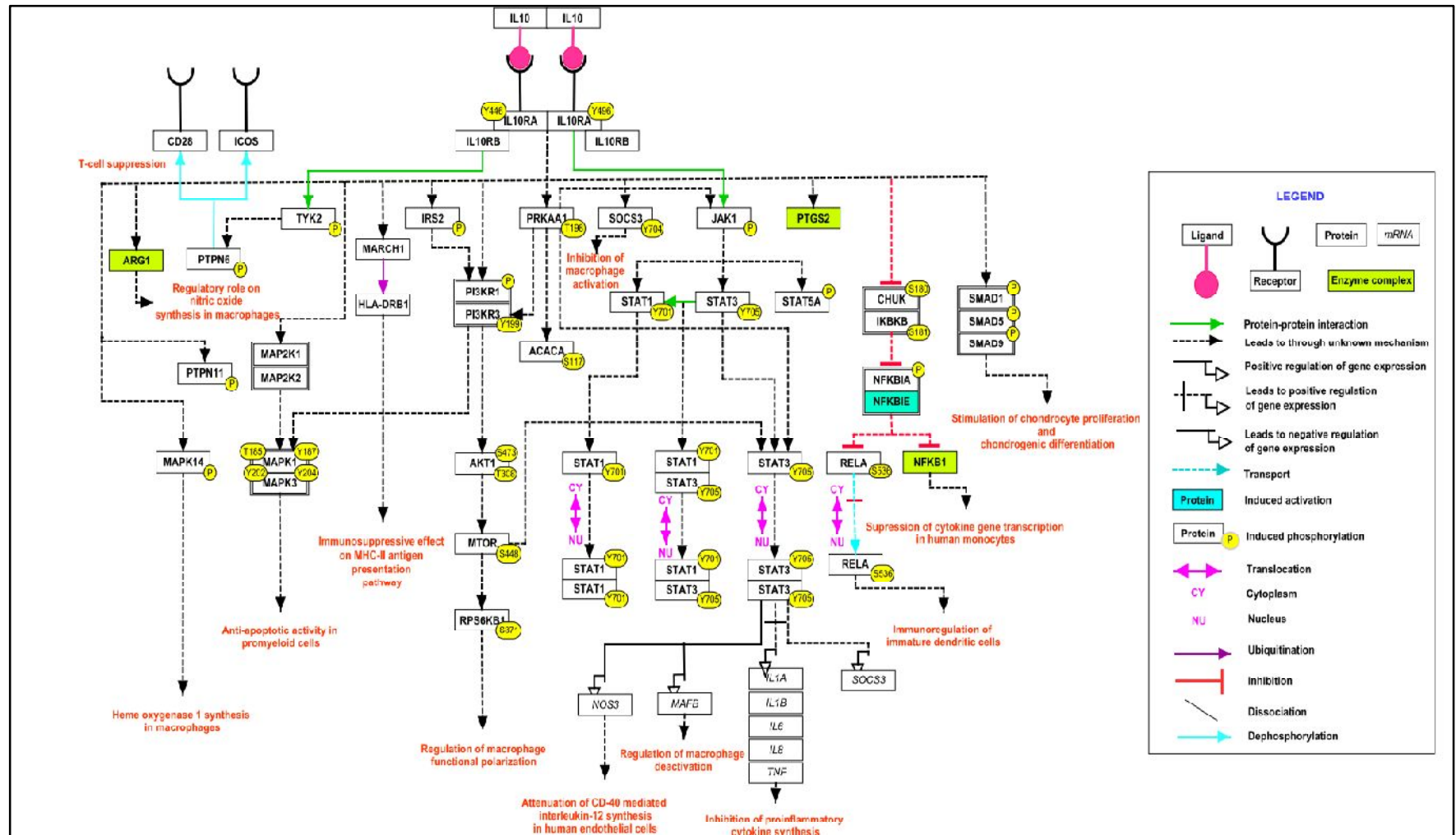
Na ação contra patógenos, as células do sistema imunológico produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-1 (DE WAAL et al., 1991). A atividade dessas citocinas auxilian na eliminação de patógenos e desencadeiam, no local da infecção, por ação prolongada, danos teciduais, febre, inflamação e morte em casos extremos (DINARELLO, 2000). Contudo a IL-10 modula a atividade de citocinas pró-inflamatórias amenizando os danos aos tecidos locais (CASSATELLA et al., 1993).

A citocina IL-10 desenvolve uma função primordial na sobrevivência e persistência dos patógenos intracelulares, tais como o *M. leprae* e o *M. tuberculosis*, posto que, esses

bacilos desenvolveram vários mecanismos para estimular a produção dessa citocina para manter sua sobrevivência (SIBLEY, et al., 1990; HIGGINS et al., 2009; MATTOS et al., 2011). Estudos indicaram que o *M. leprae* promove biossíntese de organelas lipídicas que induzem a biogênese de Prostaglandia E₂ (PGE₂) e IL-10 perpetuando a viabilidade do bacilo (ALMEIDA et al., 2009; MATTOS et al., 2010, 2011, 2012).

Outras pesquisas reportaram que a IL-10 tem um grande potencial em regular moléculas co-estimuladoras como CD86 e a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM1) tornando as células incapazes de apresentar antígenos na superfície celular (CHANG et al., 1995; SPITTLER et al., 1995).

Figura 2 - Mecanismo de sinalização das reações induzidas pela interação de IL-10 com seus receptores.



Fonte: VERMA et al. (2016)

2.8 IFN- γ e mecanismos de transcrição gênica

Os interferons são classicamente subdivididos em duas famílias, aqueles do tipo I que abrange os subtipos interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β), Interferon ômega (IFN- ω) e Interferon tau (IFN- τ), e o tipo II que compreende apenas o IFN- γ , o qual se liga ao seu receptor (IFN- γ R) (SCHRODER et al., 2004).

Os IFN- γ são produzidos principalmente por linfócitos T e por outros tipos celulares como os linfócitos B, células NK e APCs (YOUNG, 1996).

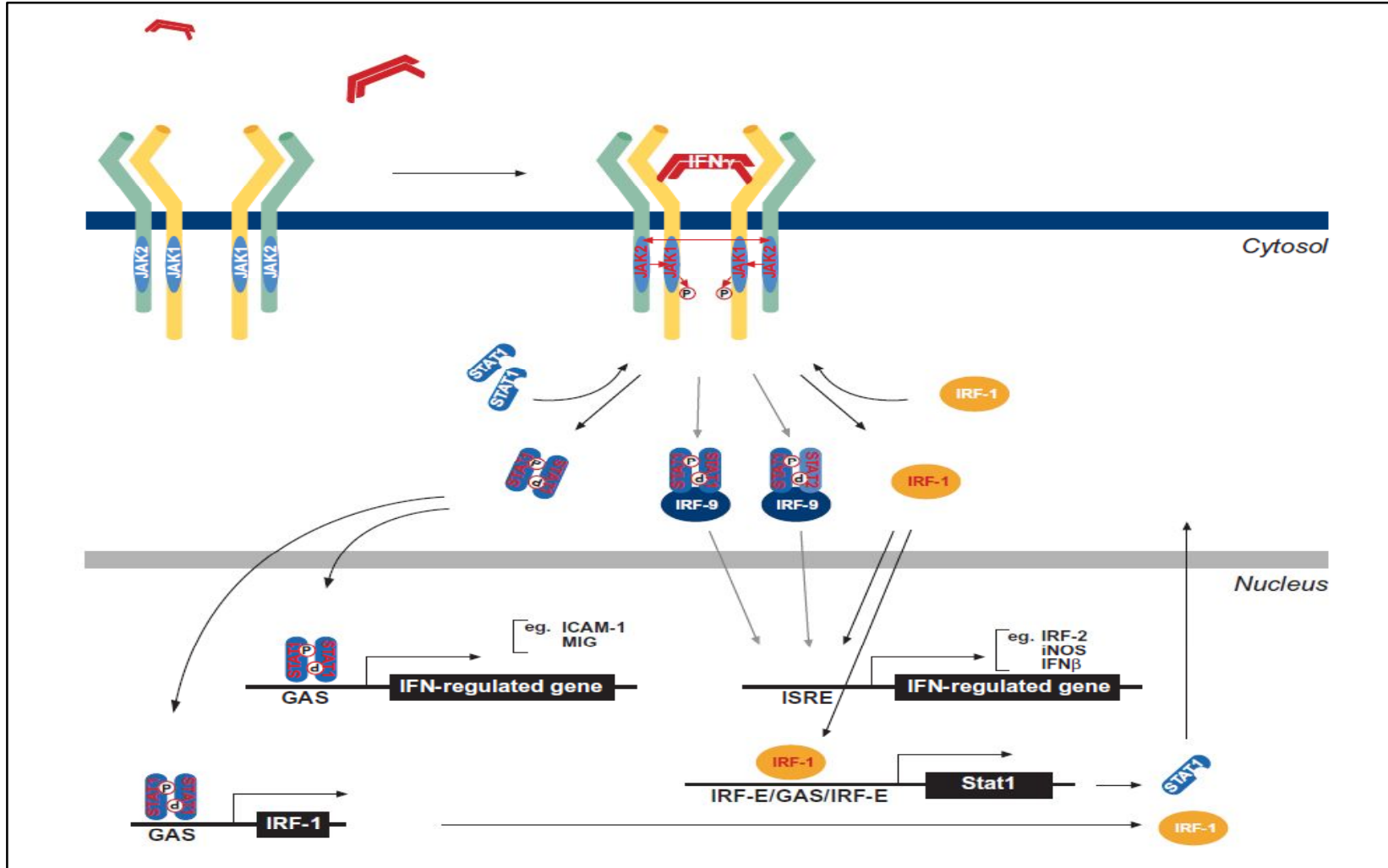
No reconhecimento de patógenos pelas APCs ocorre indução de citocinas e quimiocinas que atraem células NK dentre outras para o local da infecção (SALAZAR-MATHER; HAMILTON; BIRON, 2000). A IL-12, em conjunto com a IL-18, induzem a produção de IFN- γ pelas células NK e promovem a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ naive em células da linhagem Th1, que posteriormente, produzem citocinas pró-inflamatórias (BOEHM et al., 1997; DINARELLO, 1999). De modo concomitante, o IFN- γ inibe a diferenciação de células T CD4⁺ naive em Th2 por meio da inibição da produção de IL-4 secretada por macrófagos e consequentemente inibindo a indução de IL-10 e IL-13 (GAJEWSKI; FITCH, 1988).

O IFN- γ utiliza a via *Janus tirosina-kinases / signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) para sinalização, cuja ativação desta pelo IFN- γ , especificamente, causa uma mudança conformacional em seu receptor heterodimérico IFN- γ R (duas cadeias de IFN- γ R1 e duas cadeias de IFN- γ R2) de forma que as tirosino quinases, *Janus tirosina-kinases 2* (JAKs 2), ancoradas na porção intracelular de cada cadeia de IFN- γ R2, tornam-se ativadas por autofosforilação (SCHRODER et al., 2004). Uma vez fosforiladas as JAKs2, consequentemente, ativam as tirosinas quinases, *Janus tirosina-kinases 1* (JAKs1), ancoradas na porção intracelular de cada cadeia de IFN- γ R1, induzindo fosforilação cruzada.

As JAKs1, ativadas, fosforilam as tirosinas do resíduo 440 de cada cadeia de IFN- γ R1, promovendo a formação de sítios de ligação para domínios SH2 de STATs1 latentes. Enfim, a fosforilação das STATs, cada uma acoplada a uma JAK, permite a formação dímeros STAT1-STAT1 (SCHRODER et al., 2004). O homodímero STAT1-STAT1 migra para o núcleo e se liga ao promotor da ativação do IFN- γ (GAS – local de ativação de interferon-gama) conduzindo a inibição ou transcrição de diferentes genes reguladores do IFN- γ conforme ilustrado na figura 3 (MERAZ et al., 1996).

A resposta Th1 que tem como um dos principais agentes no controle da patologia, o IFN- γ , confere resistência a infecção e progressão de doenças como a hanseníase (SIELING; MODLIN, 1994).

Figura 3 - Mecanismo de sinalização e regulação para síntese de IFN- γ .



Fonte: SCHRODER et al. (2004).

3 JUSTIFICATIVA

As reações hansênicas, eventos agudos de etiologia imunológica, acometem mais da metade dos pacientes durante e após PQT tendo como desfecho final o dano neural, cuja não intervenção resulta em incapacidades físicas, sequelas e infecções secundárias que cursam com a morte do indivíduo.

Embora trabalhos anteriores tenham demonstrado por meio de cálculo do *odds ratio*, fatores de risco ou de proteção para adoecimento ou desenvolvimento de reações hansênicas associados a polimorfismos nos genes de *TLR1* e *TLR2*, mediadas de associação e os coeficientes de correlação simples entre essas variáveis não permitem que sejam tiradas conclusões sobre a relação de causa e efeito entre elas. Assim propomos com esse estudo investigar não apenas essas interações, mas quantificar as relações causais e seus efeitos sobre as vias de interação entre antígenos de *M. leprae*, receptores do tipo *Toll* e produção de citocinas supressoras e antimicrobianas, o que permite avanços em pesquisas futuras sobre esse e outros mecanismos que compõem a relação causa e efeito nos estados reacionais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estabelecer relações causais entre os antígenos de *M. leprae* (LAM e PGL-1) e receptores *Toll-like* 1, 2 e seus efeitos na expressão de citocinas IFN- γ e IL-10 nas reações hansênicas.

4.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar os níveis de LAM, PGL-1 e a expressão de mRNA dos genes de receptores *Toll-like* 1 e 2, IFN- γ e IL-10 nos grupos reacionais e controle;
- b. Utilizar a análise de trilha para descrever as interações que envolvem os *TLR1*, *TLR2* e seus agonistas antigênicos, LAM e PGL-1;
- c. Demonstrar os efeitos dessas interações sobre a expressão IFN- γ e IL-10 nos grupos reacionais e controle, por meio da análise de trilha.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo e local da coleta de dados

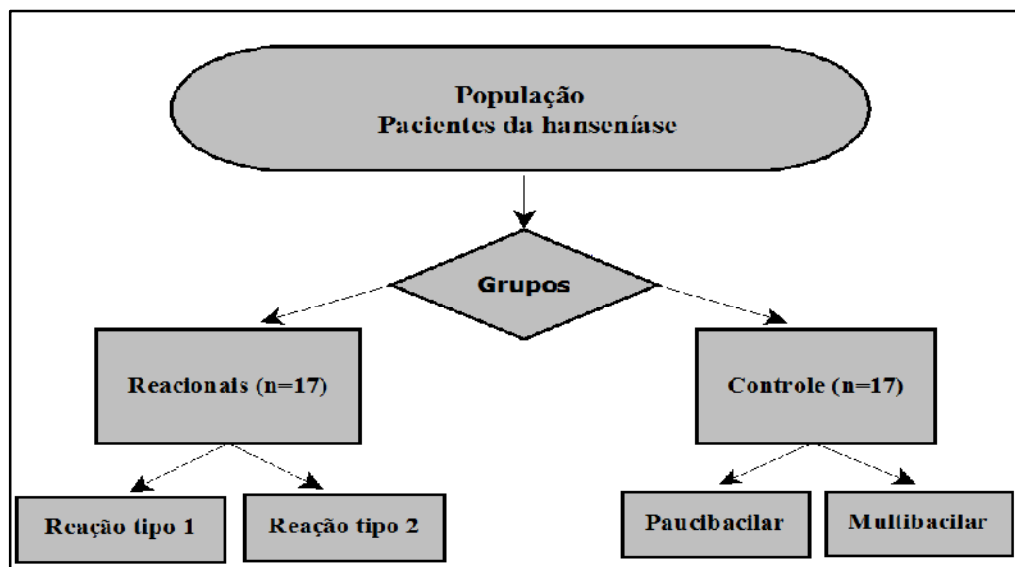
Trata-se de um estudo epidemiológico de natureza observacional, de abordagem quantitativa (descritiva e analítica), cujos procedimentos técnicos foram fundamentados na pesquisa documental e laboratorial, e o delineamento (desenvolvimento no tempo) do tipo caso-controle, investigando a ocorrência de exposição a um determinado fator e se sua frequência foi maior ou menor entre os casos ou controles.

A coleta de dados ocorreu no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (Credesh / HCU-UFU).

5.2 Universo, amostra e delineamento do estudo

Esse estudo de caso-controle, teve como universo aqueles pacientes atendidos no (Credesh/ HCU-UFU), cuja amostra foi composta por uma parcela de indivíduos acometidos pelas reações hansênicas (caso) e aqueles portadores de hanseníase não acometidos pelos estados reacionais (controle). O critério de seleção das amostras foi por conveniência, uma vez que não se pode prever a ocorrência de estados reacionais com precisão.

Figura 4 - Delineamento do estudo de Caso-Controle



Fonte: (ANTUNES, 2016).

5.2.1 Grupo reacional

O grupo reacional foi composto por pacientes que desenvolveram reação do tipo 1 (downgrading ou upgrading) e/ ou reação do tipo 2 (Eritema nodoso hansênico) no momento da coleta de material biológico, nos períodos antes, durante ou após tratamento da PQT, sendo captados de forma aleatória no momento do surto reacional, observados critérios de inclusão/exclusão e posteriormente selecionados para fazerem parte do citado grupo.

Ressalta-se que dentre aqueles pacientes reacionais, a maior parcela foi daqueles indivíduos que sofreram reação antes e após PQT, visto que um dos principais critérios de exclusão dos sujeitos da pesquisa foi a condição de que os pacientes não estivessem sobre uso de prednisona e/ou talidomida, já que esses medicamentos inibem a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e modula a síntese de outras. Assim, a baixa frequência de pacientes apresentando reação durante o tratamento foi devido a dificuldade de encontrar indivíduos que satisfaziam os critérios relatados acima, uma vez que, existe uma grande proporção de indivíduos com estados reacionais durante o tratamento, no entanto, devido ao acompanhamento intenso estão bem monitorados e sob uso de prednisona e/ou talidomida, seja em doses baixas, seja em doses elevadas.

5.2.2 Grupo controle (não reacional)

Quanto ao grupo controle, este foi composto por pacientes agrupados segundo a classificação operacional paucibacilar e/ ou multibacilar que não haviam iniciado a poliquimioterapia para tratamento da hanseníase e não estavam em reação hansênica no momento da coleta do material biológico. Conforme observado em registros clínicos, esses indivíduos não apresentaram este evento até o presente período de janeiro de 2017.

5.2.3 Cálculo para o tamanho da amostra

A análise estatística exige do pesquisador o cálculo do tamanho da amostra, número de sujeitos, que serão necessários para encontrar a verdadeira diferença estatística com resultados precisos e de validade para inferências. Este estudo trata-se de um estudo descritivo e analítico, no entanto, predominantemente analítico. Por meio de um programa estatístico (Bioestat 5.3®) calculou-se o tamanho da amostra pelo método da correlação linear utilizando-se o coeficiente de correlação de 0.47 obtido da relação entre o índice

baciloscópico e índice ELISA IgM anti-PGL-1 de um estudo piloto, o poder do teste foi de 0.8 (80%) e o nível de significância alfa escolhido foi 0.05 (5%). O tamanho da amostra reportada pelo programa foi de 34 indivíduos, subdivididos em 17 indivíduos em cada grupo.

5.3 Critérios de inclusão/exclusão

Os critérios de inclusão para formação dos grupos caso e controle, foram:

- Indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos;
- Pacientes portadores de hanseníase acometidos pelas reações hansênicas do tipo 1 e/ou tipo 2, antes, durante o tratamento ou até 5 anos após completado esquema da PQT MB ou PB;
- Pacientes sem evidências clínicas e/ou laboratoriais de reações hansênicas para formação do grupo controle.

Sobre os critérios de exclusão, esses consistiram em:

- Pacientes reacionais sob uso de talidomida e/ ou corticoterapia (prednisona);
- Pacientes reacionais sob uso de imunoterapia, imunobiológicos e análogos que poderiam afetar a atividade do sistema imunológico;
- Indivíduos portadores de outras doenças crônicas ou agudas com exceção da hanseníase, como cardiopatias, pneumopatias, nefropatias, hepatopatias, doenças inflamatórias crônica de origem auto-imune, doenças dermatológicas, infecções crônicas (Leishmaniose visceral/cutânea, Doença de Chagas, dentre outras), infecções agudas (Dengue, Zika vírus, Chicungunya, Sarampo, Rubéola, Herpes Zóster e outras);
- Demais afecções que potencialmente afetariam os parâmetros clínicos e imunológicos das análises laboratoriais dessa pesquisa.

5.3.1 Dados epidemiológicos e clínicos

Os principais dados clínicos e epidemiológicos abordados nessa pesquisa foram:

- A forma clínica da doença com base na classificação de Ridley e Jopling (1966) subdivididos em Indeterminado (I), Tuberculoide (T), Dimorfo-Tuberculoide (DT), Dimorfo-Dimorfo (DD), Dimorfo-Virchowiano (DV), Virchowiano (V);

- Utilizou-se a classificação operacional (CO) paucibacilar e multibacilar fundamentada nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e demais características clínicas, imunológicas e histológicas;

- Tipo de reação (reação tipo 1 e 2), conforme classificação clínica, imunológica e laboratorial;

- Período de manifestação e ocorrência da reação no momento da coleta.

- Quantidade de nervos afetados no diagnóstico;

- Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico;

- Grau de incapacidade da doença no diagnóstico (GID);

- Sexo;

- Faixa etária.

Todas essas informações foram obtidas pela coleta de dados que constavam em prontuários de cada sujeito da pesquisa.

Destaca-se que para conclusão diagnóstica de cada forma clínica e classificação operacional (PB e MB), os pacientes são submetidos ao exame clínico epidemiológico, sorologia ELISA IgM anti-PGL-1, raspado dérmico de 7 sítios padronizados para fins de baciloscopia, biópsia de pele no local da lesão cutânea, biópsia de nervo para casos reservados (hanseníase neural), teste de Mitsuda, exame neurológico simplificado, qPCR do sangue, da biópsia de pele e do raspado dérmico além de estudos para investigar resistência do bacilo à PQT. Enfim, somente após investigação diagnóstica expressiva realizou-se a definição da forma clínica conforme descrita anteriormente.

5.3.2 Dados laboratoriais

Os dados laboratoriais utilizados nesse estudo foram aqueles de interesse na pesquisa de anticorpos contra os componentes antigênicos da parede celular do *M. leprae* tais como:

- IgM anti-PGL-1;

- IgG anti-LAM;

Analisou-se a expressão de 4 genes de interesse a partir do material de sangue periférico, sendo eles:

- *Toll-like receptor 1*;

- *Toll-like receptor 2*;

- IFN- γ ;

- IL-10.

5.3.3 Coleta de sangue periférico para dosagem de anticorpos

Foram utilizadas amostras de soro de 17 casos e 17 controles para determinação dos níveis de citocinas e anticorpos IgG e IgM, conforme citados na seção anterior.

Coletou-se sangue venoso por meio de punção venosa periférica para obtenção de soro utilizando-se os tubos BD Vacutainer® SST® II Advance® que contém ativador de coágulo na sua parede interna, cujo volume de material para cada amostra foi de 3,5 a 5 mL, conforme especificações do fabricante para cada tamanho de tubo.

5.4 Dosagem de anticorpos por ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com antígenos específicos (PGL-1 ou LAM) em tampão carbonato-bicarbonato e incubadas por 1 hora a 37°C e *overnight* à 4°C.

No dia posterior, lavou-se as placas com tampão lavagem (PBS, 0,05% Tween), promoveu-se bloqueio das mesmas com BSA 5% e essas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em outra etapa, executou-se nova lavagem e adicionou-se o soro dos pacientes diluídos (1:100) incubando-se novamente por 1 hora uma temperatura de 37°C.

Passados esse período, as placas foram lavadas por 3 vezes e adicionou-se o anticorpo de detecção (anti-IgG para LAM, e anti-IgM para o PGL-1) marcado com peroxidase e ocorreu nova incubação a 37°C por 1 hora. Enfim, as placas foram novamente submetidas a lavagem por 3 vezes e posteriormente a reação foi revelada pela adição do substrato contendo tampão citrato, cromógeno OPD e água oxigenada por 7 minutos.

Para interrupção da reação utilizou-se ácido sulfúrico 2N e as placas foram lidas a 492nm com o auxílio de um espectrofotômetro da marca *SpectraMax® Plus 384* da *molecular devices* determinando a intensidade da coloração e, por conseguinte, os níveis de anticorpos em cada grupo para determinados antígenos descritos e analisados nesse estudo.

5.5 Coleta de sangue periférico para extração de RNA

As amostras foram coletadas por meio de punção venosa (2,5mL de sangue periférico por paciente) utilizando-se tubos PAXgene® (PreAnalytix, Suíça) (que protege as moléculas de RNA da ação das RNases) e em seguida armazenados em freezer a -20°C para uso posterior na extração de RNA.

5.5.1 Extração de RNA de sangue total

A extração de RNA de sangue total foi realizada com o kit PAXgene® Blood RNA (PreAnalytix, Suíça) consoante instruções do fabricante.

Inicialmente, antes do procedimento de extração de RNA, os tubos PAXgene (BRT) contendo as amostras, foram incubados a temperatura ambiente (25°C) sobre a bancada por 2 horas (garantir lise completa das células sanguíneas) e posteriormente os tubos PAXgene® (BRT) foram centrifugados durante 10 minutos a 5000xg utilizando-se um rotor de balanço externo com adaptadores de tubo com base redonda.

Finalizada a centrifugação, removeu-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta e adicionou-se 4 mL de água livre de RNase ao *pellet*. Misturou-se a amostra no agitador (Vórtex) até a dissolução visível do pellet e centrifugou-se durante 10 minutos a 3000-5000xg. Logo em seguida adicionou-se 350 µL de tampão de ressuspensão do kit (BR1) e agitou-se no vórtex até que o *pellet* estivesse visivelmente dissolvido.

As amostras foram pipetadas para um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL (MCT). Adicionou-se 300 µL de tampão de ligação (BR 2) e 40 µL de proteinase K (PK). Misturou-se no vórtex durante 5 segundos e incubou-se durante 10 minutos a 55°C empregando um agitador-incubador a 400-1400 rpm. O material lisado foi transferido diretamente para uma coluna de rotação do homogeneizador PAXgene (PSC; lilás) introduzido em um tubo de processamento (PT) de 2 mL e centrifugou-se durante 3 minutos a velocidade máxima (mas não excedendo 20.000xg). Posteriormente, transferiu-se cuidadosamente a totalidade do sobrenadante da fração residual para um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL (MCT).

Foram adicionados 350 µL de etanol (96-100%, grau de pureza p.a.) e misturou-se no agitador centrifugando durante breves instantes (1-2 segundos a 500-1000x g). Logo em seguida pipetou-se 700 µL de amostra para a coluna de rotação de RNA PAXgene (PRC, vermelho) colocada em um tubo de processamento de 2 mL e centrifugou-se durante 1 minuto em uma rotação de 8000 a 20.000xg. A coluna de rotação (PRC) foi colocada em um tubo de processamento de 2 mL novo e descartando-se o tubo de processamento antigo contendo produto residual. Procedeu-se a pipetagem de 350 µL de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna de rotação de RNA PAXgene e posteriormente centrifugou-se durante 1 minuto a 8000-20.000xg colocando uma coluna de rotação dentro de um tubo de processamento novo de 2 mL.

Foi pipetada uma mistura de incubação de DNase I (80 µL) diretamente para a membrana da coluna de rotação de RNA permanecendo por 15 minutos a temperatura

ambiente (20-30 °C), e posteriormente pipetou-se 350 µL de tampão de lavagem 1 (BR3) na coluna de rotação de RNA, e centrifugou-se durante 1 minuto a uma rotação de 8000-20.000xg colocando-se a coluna de rotação em um tubo de processamento novo de 2 mL. A seguir, pipetou-se 500 µL de tampão de lavagem 2 (BR4) na coluna de rotação de RNA e centrifugou-se por 3 minutos a uma rotação de 8000-20.000xg, e logo após esse procedimento, pipetou-se 40 µL de tampão de eluição (BR5) diretamente na membrana da coluna de rotação e centrifugou-se durante 1 minuto a 8000-20.000 xg para eluir o RNA.

Finalmente, incubou-se o produto eluído durante 5 minutos a uma temperatura de 65°C no agitador-incubador sem agitar. Depois da incubação, adicionou-se imediatamente o material no gelo, e as amostras foram armazenadas a -70°C.

5.5.2 Quantificação do RNA por espectrofotometria de densidade óptica

A quantificação da concentração de RNA, dada pela razão ng/uL foi realizada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop® selecionando um comprimento de onda de 260nm, referente aquele cujos ácidos nucleicos absorvem a luz.

Previamente, limpou-se as superfícies superior e inferior óptica do sistema de retenção de micro volume do aparelho pipetando 2mL de água deionizada para limpar a superfície inferior óptica; em seguida, fechou-se a alavanca permitindo que o pedestal superior entre em contato com a água deionizada; depois, limpou-se as superfícies ópticas com papel limpo e seco; posteriormente iniciou-se o software NanoDrop®, selecionou-se o aplicativo ácido nucléico, calibrando o aparelho em seguida, utilizando uma pequena quantidade da solução (1,5 µL), cujo RNA está diluído, neste caso, utilizamos o tampão BR5 por ser o diluente das amostras utilizadas, abaixou-se a alavanca do aparelho, selecionou-se a função branco (blank) na aplicação citada e após completar a medição em branco, limpou-se novamente as superfícies ópticas. Realizado o procedimento anterior, escolheu-se a constante apropriada a ser mensurada (RNA), depositou-se 1,5 µL das amostras de RNA total na superfície óptica inferior, fechou-se a alavanca, selecionou-se *Measure* no *software* e obteve-se a concentração em ng/uL para cada volume da amostra de RNA depositada e registrada em banco de dados para procedimentos posteriores.

5.5.3 Síntese de cDNA utilizando transcriptase reversa

A conversão do RNA em cDNA foi realizada utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Assim, para cada amostra, foram empregados componentes na preparação do *Mix* para reação RT, utilizando enfim, 2 μL de 10xRT *Buffer*, 0,8 μL de 25xdNTP *Mix*, 2 μL de 10x*Random Primers*, 1 μL de Multiscribe (*Reverse Transcriptase* 50U/ μL), 1 μL de inibidor de RNase e 3,2 μL de nuclease *free* RNA totalizando 10 μL por reação. Posteriormente, as amostras de RNA foram adicionadas individualmente em cada microtubo de 200 μL , sendo para cada amostra, 10 μL de RNA e 10 μL do *Mix* efetuando homogeneização cuidadosa e realocadas no gelo até a transferência ao termociclador.

Os microtubos contendo o RNA e o *Mix*, foram colocados no termociclador para promoção da transcrição reversa por meio de 4 ciclos em função do tempo e temperatura conforme especificações do *kit* e como segue abaixo:

- 1° Ciclo com temperatura de 25°C e tempo de 10 minutos;
- 2° Ciclo com temperatura de 37°C e tempo de 120 minutos;
- 3° Ciclo com temperatura de 85°C e tempo de 5 minutos;
- 4° Ciclo com temperatura de 4°C e conclusão da reação;

Após conclusão dos ciclos, armazenou-se as amostras a -20°C.

5.5.4 PCR da β -Microglobulina

Com a finalidade de verificar se houve síntese de cDNA, realizou-se reação de PCR, com *primers* que amplifiquem um fragmento conhecido, utilizando-se a beta-2-microglobulina, uma proteína de membrana de baixo peso molecular, presente na membrana de todas as células nucleadas, principalmente linfócitos. O *Mix* da reação foi preparado para 12 reações utilizando 24 μL de tampão 10x, 9,6 μL de MgCl, 4,8 μL de dNTP 10 Mm, 12 μL de *primer* 5pmol, 2,4 μL de Taq, 164,4 μL de H₂O e 24 μL de cDNA.

Em seguida, adicionou-se 18 μL do *Mix* em cada tubo eppendorf misturando 2 μL de cDNA em cada microtubo correspondente. Homogeneizou-se levemente com a pipeta, adicionando uma gota de óleo mineral e colocaram-se as amostras no termociclador estabelecendo 6 ciclos com funções de tempo e temperatura, conforme seguem:

- 1° Ciclo com temperatura de 95°C e tempo de 5 minutos;
- 2° Ciclo com temperatura de 95°C e tempo de 40 segundos;

- 3° Ciclo com temperatura de 59°C e tempo de 50 segundos;
- 4° Ciclo com temperatura de 72°C e tempo de 50 segundos;
- 5° Ciclo repetição por 34 vezes os ciclos 2° e 4° por 1 hora e 40 minutos;
- 6° Ciclo com temperatura de 72°C e tempo de 10 minutos.

Concluído o processo, preparou as amostras para testar a qualidade da amplificação da molécula de DNA em gel de agarose 1,5%.

5.5.5 Eletroforese de DNA em gel de Agarose 1,5%

Com a finalidade de analisar a qualidade da amplificação da molécula de DNA, empregou-se o gel de agarose 1,5%.

O princípio baseia-se em imergir uma solução contendo a molécula de DNA em um gel (agarose) submetido a um campo elétrico. O DNA, por sua vez, apresenta carga negativa e conseqüentemente, esse migra em direção ao polo positivo (ânodo). Sendo a matriz a agarose, nota-se visualmente, fragmentos de DNA que se pretende separar, migrando para o polo positivo.

O preparo consistiu basicamente em adicionar 1,5g de agarose, um polissacarídeo extraído de uma alga marinha vermelha, a 100mL de água MiliQ; uniu por meio aquecimento em micro-ondas por 30 segundos; deixou a solução esfriar, preparou-se o suporte do gel selando as laterais para evitar extravasamento do gel; adicionou-se 2 μ L do brometo de etídio à solução e foi misturado levemente; adicionou-se o gel no suporte evitando formação de bolhas; encaixou-se o pente de espessura desejada, aguardando a solidificação da solução e formação de poços no gel; transferiu o suporte com o gel na cuba de eletroforese e adicionou-se o tampão TBE 1X até cobrir o gel (1mm acima); acrescentou-se 3 μ L de cada amostra de DNA e aplicadas cada amostra em poços formados no gel, reservando 2 poços para utilização de um padrão de corrida; Foi ajustada uma voltagem de 100V por 10 minutos; tiradas fotos dos resultados após transcorrido o tempo estabelecido.

5.5.6 Expressão de mRNA por PCR em tempo Real

Foi utilizada a qPCR em tempo real para fins de análise da expressão gênica, utilizando o kit *TaqMan* Universal PCR *Master Mix* para a quantificação de *TLR1*, *TLR2*,

IFN- γ e IL-10 presentes em amostras de sangue periférico total de pacientes reacionais e não reacionais por meio do termociclador *ABI PRISM 7300* (Applied Biosystems, USA).

A reação foi desenvolvida com um volume final de 12 μ L, adicionando-se em uma placa de qPCR, 6 μ L do *Master Mix*; 0,2 μ L da sonda específica e 5 μ L da amostra (cDNA) e 0,8 de água destilada *free* RNase. As condições de amplificação foram aquelas recomendadas pelo fabricante: 50°C durante 2 minutos; 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos à 95°C durante 15 segundos; 60°C durante 45 segundos e 72°C durante 30 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicata, cujas sondas utilizadas foram: *TLR1*: Hs00413978_m1; *TLR2*: Hs01014511_m1; *IL-10*: Hs00961619_m1; *IFN- γ* : Hs00989291_m1 e o controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH): Hs03929097_q1.

As expressões relativas dos mRNA foram calculadas por meio do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e abordada como nível relativo de expressão (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

5.6 Aspectos éticos da pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o respaldo do parecer número: 633.052 observando os princípios Éticos previstos na Resolução 466/2012 que segundo suas disposições preliminares, incorpora sob a ótica do indivíduo e das coletividades, fundamentos bioéticos como: autonomia, beneficência, não maleficência, justiça entre outros promovendo direitos e deveres da comunidade científica, sujeitos da pesquisa e Estado. O termo de consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE A**) obedeceu a todos os requisitos pertinentes exigidos por essa resolução, tais como, linguagem acessível, justificativas, objetivos, procedimentos, métodos, direitos dos sujeitos da pesquisa, dentre outros.

5.7 Análises estatísticas

Com um total de 34 pacientes (17 reacionais e 17 não reacionais) este estudo foi conduzido por análises estatísticas bivariadas e multivariadas com objetivo de obter o estudo da análise de trilha (modelo alicerçado na regressão múltipla).

Para cada teste estatístico foram estabelecidos o mesmo nível de significância α e hipóteses nulas e alternativas, conforme serão descritos a seguir.

Previamente testou se a normalidade das amostras pelo teste de *Shapiro-Wilk*, indicado para pequenas amostras e realizou se o diagnóstico de *outliers* pelo método *ROUT* (*Robust*

Regression and Outlier Removal), pois a ausência de tal análise induz erros do tipo I e tipo II. Os dados não paramétricos foram normalizados utilizando-se a transformação percentual, pois esta manteve a relação comparativa fidedigna entre os grupos, não havendo alteração na escala de dados como ocorre em algumas transformações.

5.7.1 Análise das variáveis clínicas e epidemiológicas

As variáveis clínicas, quantidade de nervos afetados no diagnóstico, quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico, GID e CO; e as variáveis epidemiológicas, sexo e faixa etária, foram analisadas quanto a associação com os grupos estudados (caso e controle) pela aplicação do teste do qui-quadrado (χ^2), e quanto a sua tendência crescente ou decrescente, identificadas pelo valor de (A) que se define como tendência crescente se $A > 0$ ou de tendência decrescente se $A < 0$. Sobre as hipóteses, para o teste do qui-quadrado, têm-se para a hipótese nula, ($H_0: O=E$) que as variáveis são independentes e, portanto, valores observados (O) são iguais aos valores esperados (E), isto é, não existe associação entre um dos grupos analisados e o fator em análise. Em relação a hipótese alternativa ($H_A: O \neq E$), existe associação entre as variáveis estudadas, isto é, entre um dos grupos analisados e o fator em análise, assumindo um nível de significância α de 5% ($\alpha = 0,05$). Empregou-se o programa *GraphPad Prism 6*®.

5.7.2 Identificação das variáveis laboratoriais caracterizadoras

A segunda análise consistiu em identificar variáveis que caracterizaram os diferentes grupos (reacional e não reacional), sejam elas variáveis básicas ou explicativas. Assim empregou-se o teste *t de Student* para amostras independentes (*teste t* não pareado) comparando as médias entre dois grupos em relação as variáveis selecionadas de maior importância como os marcadores antigênicos (anti-PGL-1 e anti-LAM) e variáveis abordadas na expressão gênica como os receptores de reconhecimento padrão (*TLR1* e *TLR2*) e das citocinas IL-10 e IFN- γ , com auxílio do programa estatístico, *GraphPad Prism 6*®, sob uso de um nível de significância α correspondente a 5% ($\alpha = 0,05$).

Para fins de testar hipóteses, aquela considerada nula ($H_0: média_A = média_B$), verifica-se que não há diferença entre as médias de dois grupos analisados quanto a um determinado fator. Quanto a hipótese alternativa ($H_A: média_A \neq média_B$), constata-se diferença entre as médias de dois grupos analisados referente a um fator de interesse.

5.7.3 Análise multivariada

A estatística multivariada foi conduzida pela análise de variância um critério (*Anova one-way*), com a finalidade de verificar a existência de diferença entre a média de 3 ou mais grupos; elaboração da Matriz de correlação (embasada na correlação produto momento de *Pearson*) envolvendo diversas variáveis, com objetivo de verificar as principais relações entre variáveis básicas (y) e explicativas (x_1, x_2, x_3, x_n) existentes nos grupos reacionais e controle. Após estabelecer os coeficientes de correlação simples, demonstrou-se os coeficientes de correlação parcial e ao final precedeu-se a análise de trilha.

5.7.4 Análise de variância um critério (*Anova One-way*)

A comparação entre 3 ou mais grupos para detectar a diferença entre médias relacionadas a uma determinada variável foi possível pelo uso da Anova um critério (apenas um fator), pois o grupo caso foi estratificado em grupo com reação tipo 1 e outro com reação tipo 2. Já o grupo controle foi dividido em grupo PB e MB. Enfim, a subdivisão totalizou em 4 grupos, os quais foi verificada a diferença entre os mesmos em relação à média atribuída a diferentes variáveis. A razão F próxima de 1 indicará que as estimativas das variâncias são semelhantes e que provem da mesma população, aceitando a hipótese nula (H_0). No entanto, caso a razão F seja um pouco maior que 1, com o valor dessa diferença maior do que seria de se esperar somente ao acaso, tal valor deve ser atribuído ao efeito dos fatores de interesse, assim a hipótese nula deverá ser rejeitada e a hipótese alternativa aceita (H_A). O teste de comparação múltipla de *Tukey* foi realizado para verificar em qual dos grupos há de fato a diferença significativa entre as médias (CALLEGARI-JACQUES, 2007). O nível de significância α correspondente foi de 5%.

5.7.5 Correlação simples e correlação parcial

Ao estabelecer os coeficientes de correlação linear de *Pearson* e a existência de relação entre as variáveis dependente (y) e independente (x) nos grupos reacional e não reacional, nada pode-se afirmar sobre a relação causa e efeito nem sobre a interferência de outras variáveis que também se relacionam com mesma variável básica (y), pois a correlação analisada de forma isolada apenas discrimina sentido e magnitude da relação entre duas variáveis. Assim, para conhecer o relacionamento entre duas variáveis isolando o efeito de

uma terceira, evitando um resultado impreciso e oculto presente na correlação linear simples (r_{xy}), faz-se necessária a aplicação da correlação parcial representada por $r_{xy.z}$ (FIELD, 2009). Portanto, nesse estudo foi calculado o coeficiente de correlação parcial daquelas relações de maior relevância e que apresentaram significância estatística em ambos os grupos estudados nessa pesquisa, consoante orienta os pressupostos sobre análise de trilha.

Os cálculos dos coeficientes de correlação simples e parcial foram estabelecidos com uso do programa estatístico *GENES* (Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética) (CRUZ, 2013), desdobrando em tabelas os valores dos coeficientes de correlação simples e parcial e respectivos *p-valores*, mostrando a clara interferência da terceira variável no coeficiente de correlação linear simples que envolve apenas duas.

5.7.6 Diagnóstico de multicolinearidade

A expressão multicolinearidade foi criada por Ragnar Frisch em 1934, conceituada como a relação linear exata entre duas variáveis independentes do modelo de regressão linear múltipla, em suma, ocorre em análises estatísticas cuja correlação entre duas variáveis independentes é alta. Quando existe multicolinearidade entre as variáveis independentes, haverá erro nas estimativas dos coeficientes de trilha, visto que esse método utiliza o modelo de regressão linear múltipla com base em matrizes de correlação, portanto a multicolinearidade impede a utilização dos estimadores pelo método de mínimos quadrados, que por sua vez determina que a diferença entre os valores observados e esperados (resíduos) da variável y seja obtido pela soma dos quadrados dessa diferença, cujo valor é o mínimo (NETER et al., 1996).

Nesse estudo realizou-se o diagnóstico de multicolinearidade com auxílio do programa estatístico *GENES*, que detecta tal problema por vários métodos (pois o uso de somente um método não é confiável). Assim processou-se a identificação de multicolinearidade pela análise da matriz de correlação; fatores de inflação da variância (VIF) e análise de autovalores e autovetores da matriz de correlação daquelas variáveis selecionadas para pesquisa. A análise da matriz de correlação, reporta quantos coeficientes de correlação maior ou igual a 0,8 existem na matriz e a presença de 1 ou mais coeficientes acima desse valor pode indicar multicolinearidade (KMENTA, 1971).

Quanto aos fatores de inflação da variância (VIF) esse valor representa o quanto da variância do coeficiente de correlação está inflacionada quando comparada ao que seria se a

variável não estivesse correlacionada com nenhuma outra variável, assim conforme Neter et al. (1996) se houver qualquer $VIF > 10$ há indícios de multicolinearidade.

O terceiro diagnóstico foi o de autovalores e autovetores da matriz de correlação proposto por Montgomery e Peck (1992), cujo diagnóstico de multicolinearidade se baseia no número de condições (NC) e esse consiste na divisão do autovalor máximo ($\lambda_{max.}$) pelo autovalor mínimo ($\lambda_{min.}$) (autovalores são elementos da diagonal da matriz de correlação). Por fim esses autores estabeleceram a seguinte classificação para detectar a multicolinearidade por esse método citado:

$$NC = \lambda_{max.} / \lambda_{min.}$$

- $NC < 100$ (multicolinearidade fraca);
- $100 < NC < 1000$ (multicolinearidade moderada a forte);
- $NC > 1000$ (multicolinearidade severa).

Esse estudo apresentou apenas uma análise com multicolinearidade que será descrita nos resultados desse estudo e consoante anexos (**ANEXO B**, **ANEXO C**, **ANEXO D**, **ANEXO E**, **ANEXO F**, **ANEXO G** e **ANEXO H**).

Detectada a presença de multicolinearidade, adota-se a análise de trilha com multicolinearidade com o objetivo de estabilizar os coeficientes de trilha, obtendo-se, pelo método da regressão em crista, uma constante k no intervalo $0 < k < 1$, cujo menor valor deve ser utilizado para obter o menor valor do estimador em crista, em que a função é obter valores de fatores de inflação da variância < 10 em cada estimador na relação entre cada variável (HOERL, KENNARD, 1970).

5.7.7 Análise de trilha (*path analysis*)

A análise de trilha, foi desenvolvida por Wright (1921), quanto método que quantifica as relações de causa e efeito presentes entre as variáveis independentes (x_1, x_2, x_n) e a variável básica (y) permitindo a visualização do desdobramento das correlações em efeitos diretos e indiretos, ou seja, mensurar o efeito direto de uma variável explicativa (independente) sobre a variável básica (dependente) obtendo-se valores referentes a estimativas por meio de equações de regressão (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Assim como demais métodos multivariados, a análise de trilha foi estabelecida e fundada no modelo linear geral (regressão linear múltipla) que consiste em realizar previsões para os valores da variável y (dependente) com base nas informações contidas nas variáveis preditoras x_1, x_2, x_3, x_4 e sucessivamente (STAGE; CARTER; NORA, 2004).

Portanto na análise de trilha e demais estatísticas multivariadas extraídas do modelo de regressão linear múltipla, busca se explicar a ocorrência do desfecho (y) por meio do relacionamento entre variáveis independentes (x_1, x_2, x_3, x_4), atribuindo fatores de ponderação (peso) para cada uma das variáveis, visto que, esses são representados pelos coeficientes de regressão angular (b_1, b_2, b_3, b_4) observados na fórmula: $y = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4 + e$, cujas letras “ a ” representa o coeficiente de regressão linear; “ b ” denomina-se coeficiente de regressão angular; “ e ” consiste no erro, ou seja, o resíduo, considerado o valor que representa todas aquelas variáveis não englobadas no modelo, mas que atuam no desfecho, isto é, o erro consiste naqueles valores que o pesquisador não consegue prever no modelo de previsão (FONTELLES, 2012).

Se o pesquisador almeja encontrar uma potencial relação de causa e efeito entre um conjunto de variáveis, deve-se implementar o estudo da análise de trilha, no entanto é necessário associar esse método com os achados na literatura específica, buscando informações sobre as inter-relações entre as variáveis pesquisadas.

Quanto as representações visuais da análise de trilha, são necessárias a formulação de uma tabela identificando os principais elementos da relação entre as variáveis e do diagrama de trilha (diagrama causal).

A tabela deve conter elementos importantes para interpretação da análise de trilha, tais como:

- A identificação das variáveis independentes (x_1, x_2, x_n) que se relacionam com a variável básica (y);
- As vias de associação, identificando os efeitos diretos (relação da variável independente com a variável básica sem interferência das demais variáveis) e indiretos (efeito relacional entre uma determinada variável denominada x_1 , por exemplo passando pela interferência de outra variável independente, x_2 , e influenciando a variável dependente y);
- Os estimadores, que são combinações de letras e números, representam os coeficientes de trilha na qual (p_{yx1}), por exemplo, identifica o efeito direto da variável x_1 sobre y ; já a representação ($p_{yx2} r_{x1x2}$) corresponde ao efeito indireto da variável independente x_1 sobre a variável básica y passando pela via de influência de uma segunda variável independente, x_2 , conforme exemplo. Assim para obter a estimativa do efeito indireto multiplica-se o valor do efeito direto (p_{yx2}) pelo pela correlação de interesse (r_{x1x2}) (ALWIN; HAUSER, 1975).

- As estimativas são representações numéricas (coeficientes de trilha) obtidos por meio da resolução de sistemas lineares de equações normais quando se calcula o efeito direto ou seu resultado pode ser o efeito indireto como descrito anteriormente (McDONALD, 1996).

O diagrama causal permite demonstrar, por meio de estimativas e estimadores, os efeitos direto e indireto das variáveis independentes sobre a variável dependente, além do efeito residual, também sobre a variável dependente, estabelecendo de maneira clara a relação entre as variáveis. A representação das setas presentes no diagrama de trilha, bem como o valor que acompanha cada uma delas, deverá ser interpretado da seguinte maneira:

- Setas unidirecionais (\leftarrow) e seus respectivos valores direcionados à variável básica (0) são o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente;

- Setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam a correlação entre duas variáveis independentes;

- A combinação de setas bidirecionais e unidirecionais ($\leftrightarrow . \leftarrow$), isto é, o produto de seus valores, indica o efeito indireto de uma determinada variável independente atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, dependente (0).

A interpretação da análise trilha segue os critérios de Singh e Chaudhary (1979) que pode ser resumido logo abaixo como:

- A variável explicativa (x) influencia a variável básica (y) apenas indiretamente, com valor causal apenas no conjunto, se o efeito direto em módulo ($|p_{yx}|$) da variável (x) for menor que o efeito residual ($p\varepsilon$) que por sua vez é menor que o efeito total (efeito da correlação r_{yx}) resumido por $|p_{yx}| < p\varepsilon < r_{yx}$;

- Ou a variável explicativa (x) pode influenciar a variável básica (y) inferindo relação causal, se o efeito direto em módulo da variável (x) for maior que o efeito residual ($p\varepsilon$) estabelecido por $|p_{yx}| > p\varepsilon$.

O cálculo estatístico da análise de trilha com estimadores e estimativas dos coeficientes e das representações gráficas (diagramas de trilha) foram processados empregando-se o programa *GENES* (Software for Experimental Statistics in Genetics) (CRUZ, 2013). O detalhamento estatístico da análise de trilha por meio de software foi descrito na seção apêndice E.

6 RESULTADOS

A população desse estudo foi constituída por pacientes diagnosticados com hanseníase e a amostra foi composta por 17 indivíduos acometidos pelas reações hansênicas (tipo 1 e tipo 2, antes, durante ou após tratamento) e 17 indivíduos portadores de hanseníase não acometidos pelos estados reacionais, constituindo, portanto, um grupo caso e outro controle.

6.1 Caracterização clínica e epidemiológica

A caracterização clínica e epidemiológica de ambos os grupos (reacionais e não reacionais) pode ser observada na tabela 1, destacando-se que existe uma associação entre a classificação operacional PB com o grupo não reacional e associação da classificação MB com o grupo reacional evidenciado pelo teste do qui-quadrado ($\chi^2 = 10,46$; $p = 0,001$). Da amostra total (34) 76,4% (26/34) eram MB, sendo que todos os pacientes do grupo reacional eram MB (100%; 17/17) e aqueles do grupo controle 53% (9/17) eram MB, em suma, 50% (17/34) dos MB apresentaram reação hansênica e 26,4% (9/34) dos MB não apresentaram reação.

Na análise do grupo reacional, 41,2% (7/17) apresentaram reação tipo 1 enquanto 58,8% (10/17) tiveram reação tipo 2, destacando-se a forma clínica virchowiana em 53% (9/17) dos casos, sendo a mais frequente na amostra. Quanto ao período do estado reacional, aqueles que ocorreram antes foi de 23,5% (4/17), durante o tratamento compreendeu 5,9% (1/17) e após o tratamento foi de 70,6% (12/17). Reporta-se que na reação tipo 1, 57,1% (4/7) dos pacientes tiveram reação antes do tratamento (*downgrading*), 14,2% (1/7) durante e 28,8% (2/7) após PQT. Na reação tipo 2, todos desenvolveram reação após alta.

Ainda na tabela 1, o período de ocorrência da reação (estratificado), observa-se que a reação após alta é mais frequente devido esse período ser mais extenso (até 5 anos), que aquele durante o tratamento que dura no máximo 12 meses (1 ano), com exceção dos casos da forma clínica virchowiana, todos tratados com PQT/MB 24 doses (2 anos), que nesse estudo não apresentou indivíduos dessa forma clínica apresentando reação durante tratamento, sendo que dos indivíduos que sofreram reação pós alta 75% (9/12) eram V reacionais.

Na tabela 2, observa-se dados referentes à clínica e epidemiologia de ambos os grupos estudados. A quantidade de nervos acometidos no diagnóstico mostrou-se como variável caracterizadora na diferenciação amostral com tendência crescente no grupo reacional ($\chi^2 = 4,14$; $A = 6,5$; $p = 0,041$). Corroborando com esse resultado, no grupo reacional, 76,5% (13/17)

apresentou maior número de nervos acometidos (mais de 2 nervos). No grupo controle, a maioria de indivíduos (64,7%; 11/17) demonstraram até 2 nervos acometidos e apenas 35,3% (6/17) desse grupo apresenta acima de dois nervos (Tabela 02).

Ainda na tabela 2, a quantidade de lesões cutâneas identificadas no diagnóstico, também auxiliou na diferenciação dos grupos, assim o maior número de lesões cutâneas tem uma tendência crescente na comparação do grupo reacional com o grupo controle, pois todos os indivíduos do grupo reacional (50%, 17/34) tiveram na inspeção 16 ou mais lesões cutâneas (tendência crescente) ($\chi^2 = 7,02$; A= 12,6; p= 0,008). No grupo não reacional, a tendência foi decrescente, visto que esse contém apenas 2,9% (1/34) com 16 ou mais lesões cutâneas e a maior parcela dos indivíduos desse grupo 32,4% (11/34) foram diagnosticados com até 5 lesões no diagnóstico, representando 64,7% (11/17) dos indivíduos com até 5 lesões cutâneas nesse grupo (Tabela 2).

Analisando o GID, na tabela 2, verificou-se novamente uma tendência comparativa crescente entre os grupos no comportamento dessa variável, posto que, à medida que o GID aumenta, o número de indivíduos no grupo reacional mantém-se maior quando relacionado com o grupo não reacional ($\chi^2 = 4,9$; A= 4,5; p= 0,026).

Ao estabelecer a associação sexo e estados reacionais, houve relação entre o sexo masculino com o grupo reacional (76,4%; 13/17 ou 38,2%; 13/34) e do feminino com o grupo não reacional (70,5%; 12/17 ou 35,3%; 12/34) estatisticamente significativa ($\chi^2 = 4,9$; p= 0,006).

A faixa etária, foi dividida em 6 estratos, conforme listados na tabela 2, e portanto, não encontrada nenhuma associação, apesar da tendência desta variável com os estados reacionais ser decrescente, ela ocorre ao acaso ($\chi^2 = 0,13$; A= -1,5; p= 0,711), destacando que tanto no grupo reacional, quanto naquele não reacional, a maior proporção de indivíduos foi aquela da faixa etária entre 35 a 44 anos de idade em ambos os grupos com 14,7% (5/34), seguidas pelo faixa de 45 a 54 com as mesmas proporções nos grupos analisados consoante tabela 2 (11,8; 4/34).

A média de idade no grupo reacional foi de 45 anos, enquanto que no grupo controle, foi de 47 anos, cuja diferença entre essas médias não foi significativa (t=0,49; p=0,745).

Tabela 1 - Variáveis clínicas e epidemiológicas dos pacientes reacionais e controle (não reacionais), segundo forma clínica, classificação operacional, tipo de reação hansênica, período e ocorrência da reação, aplicação do teste de associação qui-quadrado (χ^2) para duas amostras independentes, Uberlândia, 2017

	<i>HI/T</i>		<i>DT (PB)</i>		<i>DT (MB)</i>		<i>DD</i>		<i>DV</i>		<i>V</i>		<i>Total</i>		χ^2	<i>p</i> -valor										
	<i>Reacional</i>		<i>Controle</i>		<i>Reacional</i>		<i>Controle</i>		<i>Reacional</i>		<i>Controle</i>		<i>Reacional</i>				<i>Controle</i>									
	<i>n</i> °	%	<i>n</i> °	%	<i>n</i> °	%	<i>n</i> °	%	<i>n</i> °	%	<i>n</i> °	%	<i>n</i> °	%			<i>n</i> °	%								
Classificação Operacional																										
PB	0	0	6	100	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	47	10,46	0,001		
MB	0	0	0	0	0	0	0	0	1	20	4	80	4	80	1	20	3	60	2	40	9	53			17	100
Tipo de Reação																										
Tipo 1																										
Tipo 2																										
Período da Reação																										
Antes do tratamento																										
Durante Tratamento																										
Após Tratamento																										
Ocorrência da Reação																										
Antes do tratamento																										
Durante o tratamento																										
Durante 1° ano pós alta																										
Durante 2° ano pós alta																										
Durante 3° ano pós alta																										
Durante e após 4° ano da alta																										
Total																										
			6		2			5				5			5				11				17			

Nota: HI/T: Hanseníase indeterminada e Tuberculoide; DT (PB): Dimorfo-tuberculoide (paucibacilar); DT (MB): Dimorfo-tuberculoide (multibacilar); DD: Dimorfo-dimorfo; DV: Dimorfo- virchowiano; V: Virchowiano; χ^2 : Estatística teste do Qui-quadrado.

6.2 Os marcadores de carga bacilar

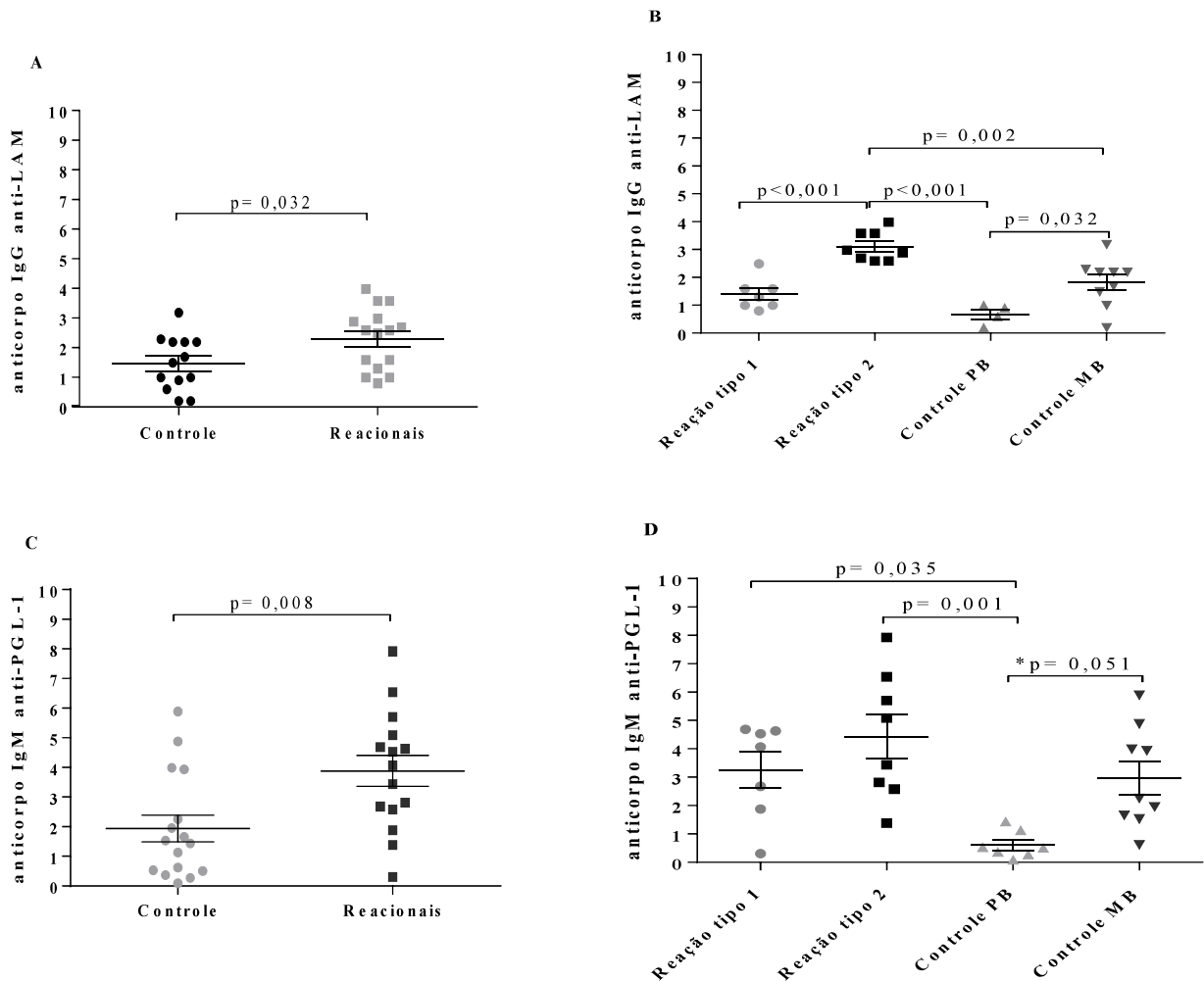
Foram verificados os níveis de anticorpos anti-PGL-1 e anti-LAM em ambos os grupos, reacional e não reacional, identificando-se por meio do *teste t de Student* independente se há 95% de chance dessa diferença não ocorrer ao acaso com objetivo de averiguar se nessa amostra os marcadores de carga bacilar podem inferir relação com os estados reacionais conforme relata a literatura nacional e internacional.

O gráfico 1 A, mostra os níveis de anticorpos IgG anti-LAM em ambos grupos, frente ao antígeno *lipoarabinomanana*, constatando-se diferença entre as médias do grupo reacional ($m= 2,3$; $EPM=\pm 0,26$) quando comparado ao não reacional ($m= 1,4$; $EPM=\pm 0,25$), determinando que a média naqueles pacientes em reação é maior que aquela encontrada no grupo controle ($t= 2,26$; $p= 0,032$). No gráfico 1 B, aplicou-se o teste da análise de variância com um critério (*ANOVA One-way*) para comparação entre os grupos com reação tipo 1 ($m=1,3$; $EPM=\pm 0,21$), reação tipo 2 ($m=3,1$; $EPM=\pm 0,18$), controle PB ($m=0,6$; $EPM=\pm 0,17$) e controle MB ($m=1,8$; $EPM=\pm 0,28$) verificando-se diferença entre as médias ($F= 15,27$; $p< 0,001$). E na comparação entre os grupos pelo teste de Tukey (*teste post hoc*) foi evidenciada diferença estatística entre os grupos com reação tipo 2 e os demais grupos, além da diferença significativa entre os grupos controle PB e MB. Já entre o grupo com reação tipo 1 e os controles PB e MB não foi encontrada diferença.

O segundo anticorpo no qual os níveis foram definidos nesse estudo, consistiu naquele que contém um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo específico para o *M. leprae* denominado IgM anti-PGL-1, cujos resultados foram semelhantes ao dado descrito anteriormente, isto é, houve maior média de anti-PGL-1 no grupo reacional ($m= 3,88$; $EPM=\pm 0,52$) quando comparado ao grupo controle ($m= 1,93$; $EPM=\pm 0,44$), consoante observa-se no gráfico 1 C, estabelecendo diferença significativa entre os dois grupos pelo emprego do *test t de Student* ($t= 2,83$; $p= 0,008$).

Estratificando novamente o grupo reacional em reação tipo 1 e reação tipo 2 além dos grupos controle PB e MB (gráfico 1 D), foi analisada a diferença entre as médias nos diferentes grupos pelo uso da *ANOVA* um critério, e do teste de *Tukey*, para analisar as diferenças entre as médias nos 4 diferentes subgrupos. Enfim, houve diferença entre as médias dos grupos reacional e controle ($F= 6,42$; $p= 0,002$) e pelo teste de *Tukey*, entre as médias, reação tipo 1 ($m=3,2$; $EPM=\pm 0,63$) versus controle PB ($m=0,6$; $EPM=\pm 0,18$) e reação tipo 2 ($m=4,4$; $EPM=\pm 0,79$) versus controle PB. A média do grupo controle MB foi de ($m=2,9$; $EPM=\pm 0,58$) com diferença quase significativa em relação ao grupo controle PB.

Gráfico 1 A - Comparação entre as médias dos níveis do anticorpo IgG anti-LAM nos grupos controle e reacional; **Gráfico 1 B** - Comparação entre as médias dos níveis de anticorpos IgG anti-LAM nos grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB; **Gráfico 1 C** - Comparação entre as médias dos níveis de anticorpo IgM anti-PGL-1 nos grupos controle e reacional; **Gráfico 1 D** - Comparação entre as médias dos níveis do anticorpo IgM anti-PGL-1 nos grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB (todas as amostras obtidas do soro de sangue periférico e analisadas por ELISA)



Nota: Aplicação do teste t de Student para comparação de médias entre os grupos controle e reacional e utilização do teste ANOVA um critério para comparação entre os grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB com uso do teste de comparação múltipla de Tukey.

6.3 Expressão gênica

A técnica da reação da transcriptase reversa quantitativa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada na detecção da quantificação relativa da expressão dos 4 genes de interesse relatados na metodologia dessa pesquisa.

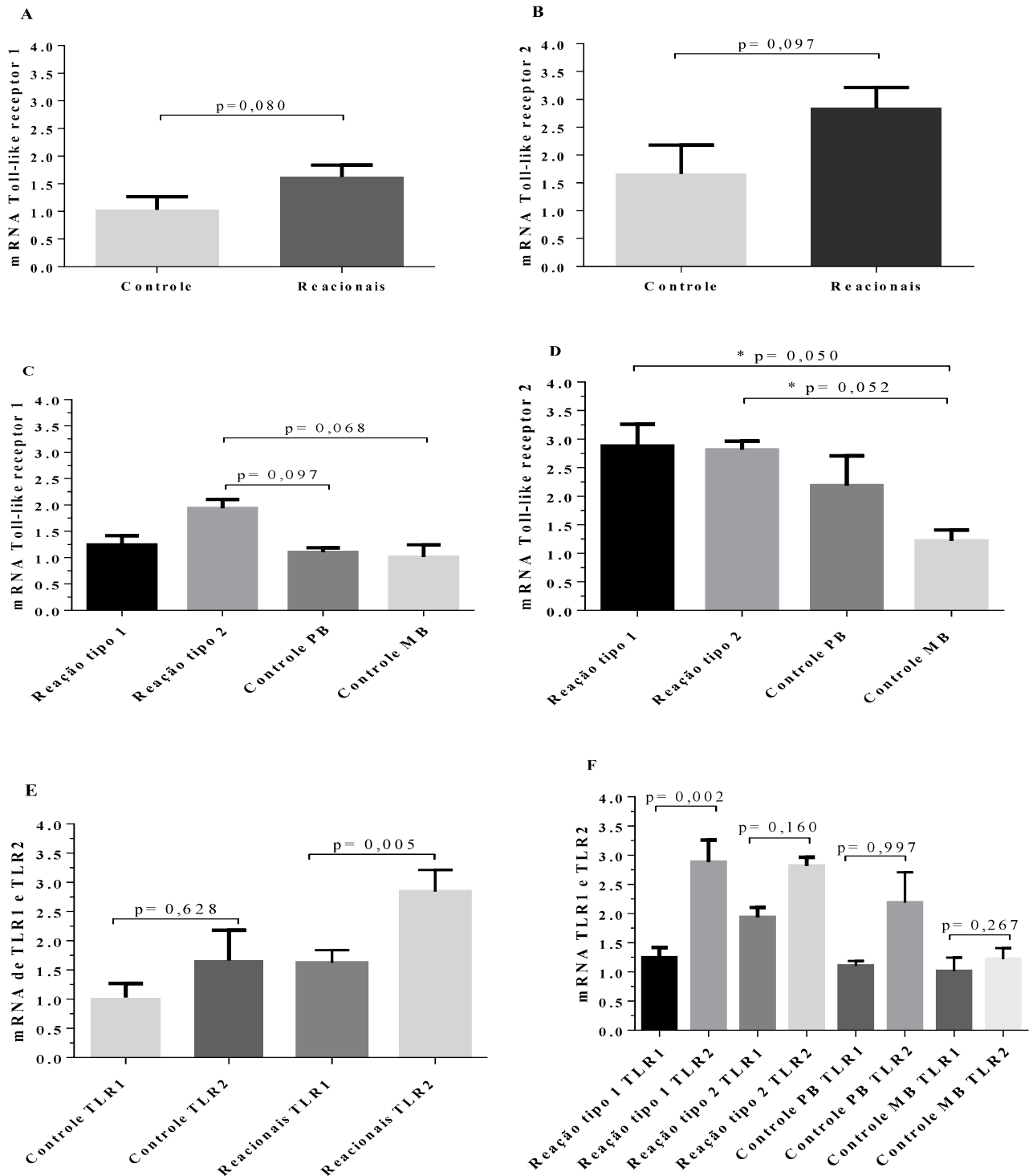
Os gráficos 2 A e 2 B, mostram respectivamente a expressão de *toll-like receptor 1 e 2*, de modo comparativo, entre os grupos reacionais e controle. Apesar de o grupo reacional apresentar maior expressão desses receptores, não houve diferença significativa entre as médias de *TLR1* ($t= 1,85$; $p= 0,080$) e *TLR2* ($t= 1,34$; $p= 0,097$) analisadas em ambos os grupos. A expressão de *TLR1* no grupo reacional teve média de 1,62 (EPM= $\pm 0,21$) e no grupo controle foi de 1,02 (EPM= $\pm 0,23$), quanto a expressão do gene de *TLR2*, a média no grupo reacional foi de 2,84; (EPM= $\pm 0,36$) quando analisada em conjunto com o grupo controle ($m=1,66$; EPM= $\pm 0,51$) ($t= 1,34$; $p= 0,097$). Sobre a divisão dos grupos principais reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2) e controle (controle PB e MB) para análise da comparação múltipla entre médias (gráfico 2 C), constatou-se ausência de diferença significativa entre as médias dos grupos ($F= 1,98$; $p= 0,154$), *TLR1* apresentou média de 1,93; (EPM= $\pm 0,17$) nos indivíduos com reação do tipo 2, já o grupo com reação tipo 1 a média foi de 1,24; (EPM= $\pm 0,17$), controle PB ($m= 1,06$; EPM= $\pm 0,08$) e controle MB ($m= 1,01$; EPM= $\pm 0,23$) tiveram médias semelhantes (gráfico 2 C).

Em relação a expressão do *TLR2* nos 4 grupos estratificados, também não houve diferença significativa entre as médias (gráfico 2 D) ($F= 0,67$; $p= 0,580$). O teste de *Tukey (post hoc)* não constatou diferença entre as médias na comparação múltipla entre os grupos com reação tipo 1 ($m=2,88$; EPM= $\pm 0,37$), reação tipo 2 ($m=2,81$; EPM= $\pm 0,15$), controle PB ($m=2,18$; EPM= $\pm 0,52$) e controle MB ($m=1,36$; EPM= $\pm 0,18$).

No gráfico 2 E verificou-se a comparação entre as médias de expressões dos *TLR1* e *TLR2* no mesmo grupo, notando-se médias de 1,02 (EPM= $\pm 0,23$) no *TLR1* e 1,66 (EPM= $\pm 0,51$) no *TLR2* no grupo controle, enquanto que no grupo reacional observou-se médias de 1,62 e 2,84 no *TLR1* (EPM= $\pm 0,21$) e *TLR2* (EPM= $\pm 0,36$) respectivamente.

Quanto ao gráfico 2 F averigua-se na reação tipo 1 diferença estatística entre as médias dos níveis de *TLR1* ($m=1,24$; EPM= $\pm 0,17$) e *TLR2* ($m=2,88$; EPM= $\pm 0,37$). Já na reação tipo 2 não houve diferença entre as médias de *TLR1* ($m=1,93$; EPM= $\pm 0,17$) e *TLR2* ($m=2,81$; EPM= $\pm 0,15$). Nos grupos controle PB e MB as médias também não foram significativas com níveis de *TLR1* ($m=1,10$; EPM= $\pm 0,08$) e *TLR2* ($m=2,18$; EPM= $\pm 0,52$) nos PB e de *TLR1* ($m=1,01$; EPM= $\pm 0,23$) e *TLR* ($m=1,22$; EPM= $\pm 0,18$) nos MB.

Gráfico 2 A - Expressão gênica de mRNA do receptor *Toll-like 1* e **Gráfico 2 B** - Expressão gênica de mRNA do receptor *Toll-like 2* nos pacientes dos grupos reacional e controle; **Gráfico 2 C** - Expressão gênica de mRNA do receptor *Toll-like 1* e **Gráfico 2 D** - Expressão gênica de mRNA do receptor *Toll-like receptor 2*, comparações entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB; **Gráfico 2 E** - Comparação entre as expressões gênicas de mRNA de *Toll-like receptor 1* e 2 nos grupos controle e reacional e **Gráfico 2 F** - Comparação entre as expressões gênicas de mRNA de *Toll-like receptor 1* e 2 nos grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e MB (todas as amostras obtidas de sangue periférico e analisadas por RT-qPCR)

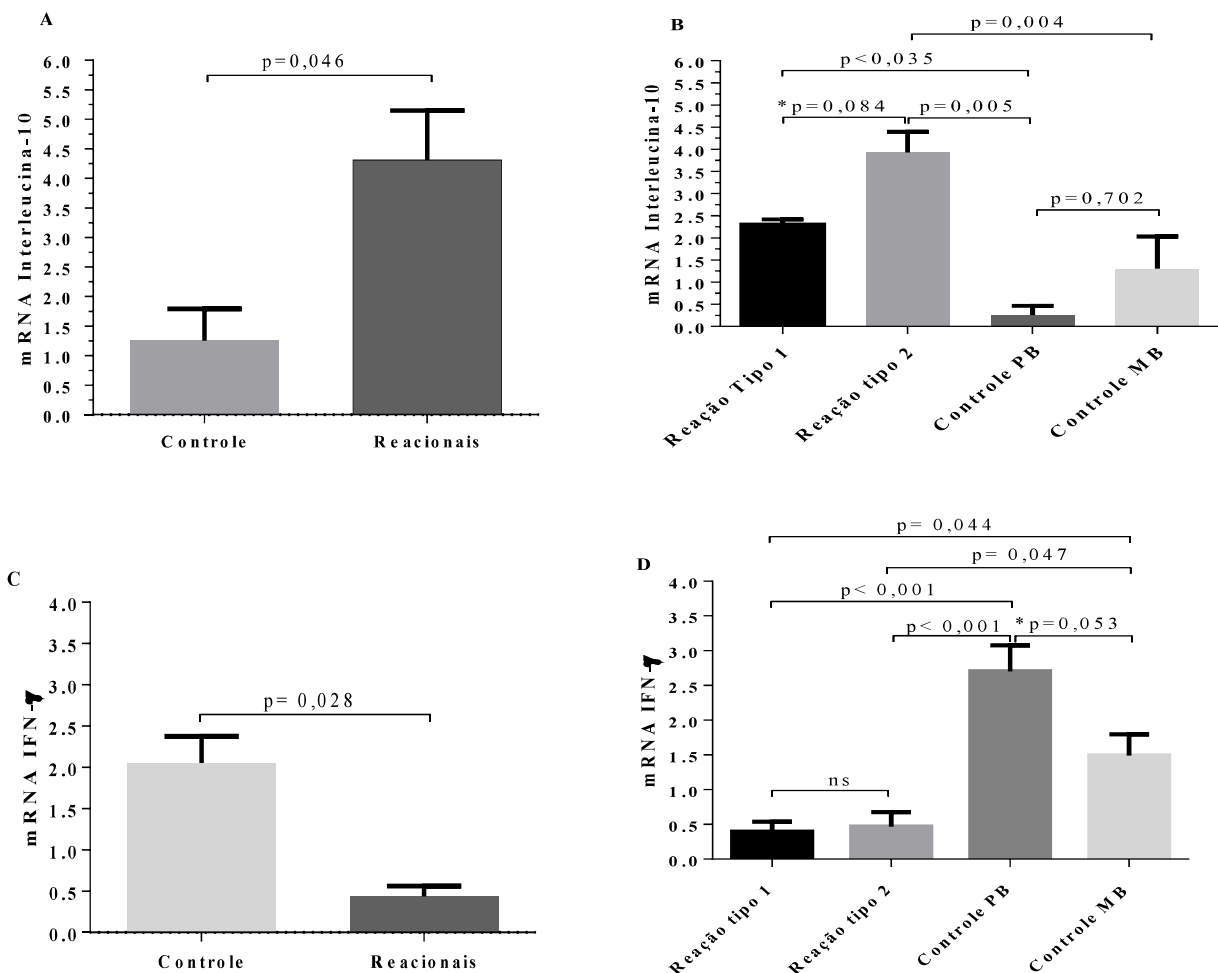


Nota: Aplicação do teste t de Student para comparação de médias entre os grupos controle e reacional e utilização do teste ANOVA um critério para comparação entre os grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB com uso do teste de comparação múltipla de Tukey.

O gráfico 3 A, demonstra expressão gênica de *mRNA* de IL-10, maior no grupo reacional ($m= 4,31$; $EPM=\pm 0,83$), quando comparada aquela do grupo controle ($m= 1,25$; $EPM=\pm 0,53$) com diferença estatística entre esses valores ($t= 2,01$; $p= 0,046$). Ao computar a diferença entre as médias nos subgrupos quanto aos níveis de expressão dessa citocina (Gráfico 3 B), observa-se presença de diferença entre eles ($F= 3,99$; $p= 0,023$); representado pelo uso do teste de *Tukey* para comparações entre o grupo com reação tipo 2 ($m=3,93$; $EPM=\pm 0,46$) e os grupos controle PB ($m=0,25$; $EPM=\pm 0,21$) e controle MB ($m=1,30$; $EPM=\pm 0,72$) respectivamente. O grupo com reação tipo 1 registrou média de 2,31 ($EPM=\pm 0,09$) com diferença significativa quando comparado ao grupo controle PB.

Conforme especificado no gráfico 3 C, a expressão de IFN- γ no grupo controle ($m=2,05$; $EPM=\pm 0,32$) foi maior que aquela encontrada no grupo reacional ($m=0,43$; $EPM=\pm 0,12$) ($t= 2,36$, $p= 0,028$). O gráfico 3 D, mostra a comparação entre médias dos níveis de expressão de IFN- γ nos grupos de pacientes com reação tipo 1, reação tipo 2 e os controles PB e MB. Houve diferença entre as médias dos 4 grupos ($F= 5,30$; $p= 0,008$), visto que, o grupo controle PB apresenta média elevada e significativa ($2,70$; $EPM=\pm 0,37$) quando confrontado com aqueles grupos de pacientes com reação tipo 1 ($m=0,39$; $EPM=\pm 0,14$) e tipo 2 ($m=0,46$; $EPM=\pm 0,20$). O controle MB ($m=1,49$; $EPM=\pm 0,30$) também apresentou média diferente e significativa quando comparado aos grupos com reação tipo 1 e tipo 2.

Gráfico 3 A - Expressão gênica de mRNA da citocina IL-10, comparação entre médias nos grupos controle e reacional; **Gráfico 3 B** - Expressão gênica de mRNA da citocina IL-10, comparação entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB; **Gráfico 3 C** - Expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ , comparação entre médias nos grupos controle e reacional; **Gráfico 3 D** - Expressão gênica de mRNA da citocina IFN- γ , comparação entre médias nos grupos com reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB (todas as amostras obtidas de sangue periférico e analisadas por RT-qPCR)



Nota: Aplicação do teste t de Student para comparação de médias entre os grupos controle e reacional e utilização do teste ANOVA um critério para comparação entre os grupos reação tipo 1, reação tipo 2, controle PB e controle MB com uso do teste de comparação múltipla de Tukey.

6.4 Análise de trilha nos grupos reacionais

A análise de trilha foi utilizada nesse estudo para verificar a relação causa e efeito entre um conjunto de variáveis já conhecidas na literatura por apresentarem associação entre elas. No entanto, as pesquisas em ciências da saúde são reacias em avançar além dos estudos de correlação linear simples, o que caracteriza uma grande limitação nesses estudos, pois quando existe relação entre diversas variáveis, e concomitantemente entre alguns pares delas há alta correlação, faz-se necessário averiguar se essa magnitude não é efeito de uma terceira variável. Assim a análise de trilha busca explicar os efeitos diretos e indiretos (influência de outras variáveis) na relação entre duas variáveis e dessas com uma terceira, quarta e sucessivamente averiguando o peso de cada fator (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Nessa pesquisa computamos a possível relação causa-efeito entre variáveis que mostraram relação estatisticamente significativa após análise multivariada pela elaboração da matriz de correlação de *Pearson*, nos grupos reacional (desmembrado em grupo com reação tipo 1 e tipo 2) e no grupo controle.

Correlacionando 17 diferentes variáveis no grupo de pacientes reacionais, a tabela 3 mostra forte relação entre a expressão de IL-10 (variável dependente) com outras 5 variáveis (independentes) naquele grupo com reação não estratificado (tipo 1 e tipo 2), portanto, observa-se que a quantidade de nervos afetados e a quantidade de lesões cutâneas ambos referentes ao diagnóstico apresentaram coeficientes de correlação linear fortes sendo respectivamente ($r= 0,62$; $p= 0,018$) e ($r= 0,69$; $p= 0,005$) o que detecta de forma pregressa ao exame clínico o estado imunológico do paciente, pois essas duas variáveis representam a resposta do hospedeiro diante do controle e disseminação bacilar.

Outra relação importante verifica-se entre a expressão de IL-10 e o *toll-like receptor 2*, um receptor que reconhece componentes lipoproteicos presentes na parede celular e cápsula de micobactérias, ocorrendo alta correlação entre essas duas variáveis ($r= 0,89$; $p= <0,001$).

Dois achados muito importantes estão descritos na tabela 3, a correlação entre IL-10 e os anticorpos anti-LAM ($r= 0,55$; $p= 0,043$) e anti-PGL-1 ($r= 0,70$; $p= 0,004$), os quais detectam e refletem os níveis antigênicos dos pacientes acometidos pela doença.

Ainda na tabela 3, o *toll-like receptor 1*, relacionou-se com duas variáveis importantes, quantidade de nervos afetados ($r= 0,72$; $p= 0,003$) e com o índice bacilos cópico ($r= 0,57$; $p= 0,032$), ambos referentes ao diagnóstico.

Demonstra-se na tabela 3, a correlação de *toll-like receptor 2* com outras variáveis: quantidade de lesões cutâneas inspecionadas no diagnóstico ($r= 0,69$; $p= 0,005$); IL-10 ($r= 0,89$; $p= <0,001$); anti-LAM ($r= 0,70$; $p= 0,004$) e anti-PGL-1 ($r= 0,68$; $p= 0,007$).

Tabela 3 - Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo Reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), fundamentada na correlação linear simples de *Pearson*, Uberlândia, 2017

Variáveis	Reacionais								
	IL-10			Toll-like receptor 1			Toll-like receptor 2		
	r_{xy}	IC (95%)	<i>p</i> -valor	r_{xy}	IC (95%)	<i>p</i> -valor	r_{xy}	IC (95%)	<i>p</i> -valor
Quantidade de Nervos afetados	0,62	0,13 – 0,87	0,018	0,72	0,32 – 0,91	0,003	0,47	-0,08 – 0,80	0,087
Quantidade de Lesões Cutâneas	0,69	0,26 – 0,90	0,005	-0,04	-0,56 – 0,50	0,887	0,69	0,26 – 0,90	0,005
GID	0,28	0,29 – 0,71	0,331	0,20	-0,36 – 0,66	0,477	0,13	-0,42 – 0,62	0,639
Sexo	0,24	0,13 – 0,87	0,403	0,09	-0,46 – 0,59	0,752	0,18	-0,38 – 0,65	0,530
Idade	-0,36	-0,75 – 0,20	0,193	0,05	-0,49 – 0,57	0,842	-0,30	-0,72 – 0,27	0,282
Etnia	0,48	-0,06 – 0,81	0,076	0,32	-0,25 – 0,73	0,254	0,34	-0,22 – 0,74	0,254
Toll-like receptor 1	0,43	-0,13 – 0,78	0,121				0,44	-0,11 – 0,79	0,109
Toll-like receptor 2	0,89	0,68 – 0,96	<0,001	0,44	-0,11 – 0,79	0,109			
IL-10				0,43	-0,13 – 0,78	0,121	0,89	0,68 – 0,96	<0,001
IFN-γ	0,05	-0,54 – 0,61	0,877	0,49	-0,18 – 0,76	0,103	0,37	0,52 – 0,94	0,233
IL-4	-0,17	-0,64 – 0,40	0,561	-0,16	-0,64 – 0,40	0,571	0,09	-0,46 – 0,60	0,747
TNF-α	-0,031	-0,55 – 0,51	0,916	0,34	-0,22 – 0,74	0,221	-0,15	-0,63 – 0,41	0,605
anti-LAM	0,55	0,03 – 0,84	0,043	0,28	-0,28 – 0,71	0,333	0,70	0,29 – 0,90	0,004
anti-PGL-1	0,70	0,08 – 0,85	0,004	0,26	-0,08 – 0,80	0,366	0,68	0,14 – 0,87	0,007
Índice Baciloscópico	0,21	-0,36 – 0,67	0,468	0,57	0,06 – 0,85	0,032	0,20	-0,36 – 0,66	0,478

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; IC (95%): Intervalo de Confiança de 95%, GID: Grau de incapacidade no diagnóstico; IL-10: Interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; IL-4: Interleucina 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral; anti-LAM: anticorpo contra antígeno lipoarabinomanana; anti-PGL-1: anticorpo contra antígeno glicolípido fenólico-I; Quantidade de nervos acometidos (dados referentes ao diagnóstico); Quantidade de lesões cutâneas (dados referentes ao diagnóstico).

As análises, referentes aos desdobramentos das associações contidas na tabela 3, que fazem referência as associações da IL-10 e demais variáveis no grupo reacional não estratificado como correlações parciais, análises de trilha e diagramas de causa e efeito estão apresentados no Apêndice C dessa presente tese.

6.4.1 Análise de trilha no grupo com reação tipo 1

Para melhor análise e compreensão das relações entre as variáveis, o grupo daqueles pacientes que desenvolveram reação hansênica foi estratificado em reação tipo 1 e tipo 2. Não houve estratificação entre PB e MB, porque todos os pacientes do grupo reacional eram MB.

A tabela 4 indica associação entre as variáveis do grupo com reação tipo 1, identificando as relações entre a expressão de IL-10, quantidade de lesões cutâneas ($r_{xy}= 0,90$; $p= 0,007$), a expressão do receptor de reconhecimento padrão *TLR2* ($r_{xy}= 0,91$; $p= 0,002$) e os níveis de anticorpos anti-PGL-1 ($r_{xy}= 0,95$; $p< 0,001$), bem como demais relações secundárias evidenciadas entre *TLR1* e *TLR2* e demais fatores.

Tabela 4 - Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo com reação tipo 1, fundamentada na correlação linear simples de *Pearson*, Uberlândia, 2017

Variáveis	Reação tipo 1								
	IL-10			Toll-like receptor 1			Toll-like receptor 2		
	$r_{x,y}$	IC (95%)	p-valor	$r_{x,y}$	IC (95%)	p-valor	$r_{x,y}$	IC (95%)	p-valor
Quantidade de Nervos Afetados	-0,11	0,09 – 0,97	0,05	0,83	-0,01 – 0,96	0,011	0,58	0,05 – 0,97	0,129
Quantidade de Lesões Cutâneas	0,90	0,46 – 0,99	0,007	0,05	-0,56 – 0,87	0,910	0,82	0,19 – 0,97	0,012
GID	0,53	-0,29 – 0,93	0,181	0,21	0,06 – 0,97	0,613	0,58	-0,31 – 0,93	0,133
Gênero	0,14	-0,69 – 0,80	0,748	-0,22	-0,91 – 0,40	0,605	0,06	-0,72 – 0,78	0,889
Idade	-0,40	-0,91 – 0,43	0,326	0,03	-0,90 – 0,45	0,937	-0,46	-0,90 – 0,46	0,256
Etnia	0,31	-0,55 – 0,87	0,454	0,49	-0,80 – 0,70	0,213	0,04	-0,67 – 0,82	0,923
Toll-like receptor 1	0,38	-0,42 – 0,91	0,349				0,36	-0,14 – 0,95	0,381
Toll-like receptor 2	0,91	0,57 – 0,99	0,002	0,36	-0,14 – 0,95	0,381			
IL-10				0,38	-0,42 – 0,91	0,349	0,91	0,57 – 0,99	0,002
IFN-γ	-0,37	-0,88 – 0,54	0,362	-0,11	-0,65 – 0,83	0,793	-0,34	-0,88 – 0,51	0,415
IL-4	-0,11	-0,78 – 0,72	0,802	-0,04	-0,33 – 0,92	0,919	0,25	-0,63 – 0,84	0,544
TNF-α	0,09	-0,74 – 0,76	0,826	0,66	-0,76 – 0,75	0,078	-0,07	-0,73 – 0,77	0,870
anti-LAM	0,25	-0,63 – 0,84	0,55	0,44	-0,46 – 0,90	0,270	0,19	-0,64 – 0,83	0,652
anti-PGL-1	0,95	-0,62 – 0,84	<0,001	0,29	-0,26 – 0,93	0,490	0,97	0,80 – 1,00	<0,001
Índice Baciloscópico	0,25	-0,62 – 0,84	0,556	0,65	-0,59 – 0,86	0,078	0,05	-0,67 – 0,82	0,901

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; IC (95%): Intervalo de Confiança de 95%, GID: Grau de incapacidade no diagnóstico; IL-10: Interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; IL-4: Interleucina 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral; anti-LAM: anticorpo contra antígeno lipoarabinomanana ; anti-PGL-1: anticorpo contra antígeno glicolípido fenólico-I ; Quantidade de nervos acometidos (dados referentes ao diagnóstico); Quantidade de lesões cutâneas (dados referentes ao diagnóstico)

Observa-se na tabela 5 que a multicolinearidade afetou o modelo da correlação parcial, posto que, as três variáveis apresentam correlação elevada com a expressão de IL-10 (>0,80). Nota-se que essas relações apresentam poder no desfecho da expressão de IL-10 quando atuam em conjunto, principalmente pela via do antígeno (PGL-1). Observou-se que a capacidade das variáveis, quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico e *TLR2*, influenciam a variação na expressão dessa citocina em apenas 7% e 12% respectivamente, conforme valores do coeficiente de determinação ajustado (Tabela 5). Constata-se ainda nessa tabela 5, que o anti-PGL-1 na reação apresentou forte associação com a expressão de IL-10 durante a reação tipo 1 ($r_{03}= 0,95$; $R^2= 90\%$; $p< 0,001$), contudo seu poder de influenciar e se relacionar com a expressão de IL-10 de maneira isolada foi afetado ($r_{03.12}= 0,78$; $R^2=60\%$; $p= 0,063$), já que a sua associação para influenciar variação na IL-10 é dependente da via do *TLR2*. Os valores não significativos dessas variáveis constatadas após aplicação da correlação parcial não indicam ausência de relação causal, posto que a multicolinearidade entre as variáveis causou esse fenômeno.

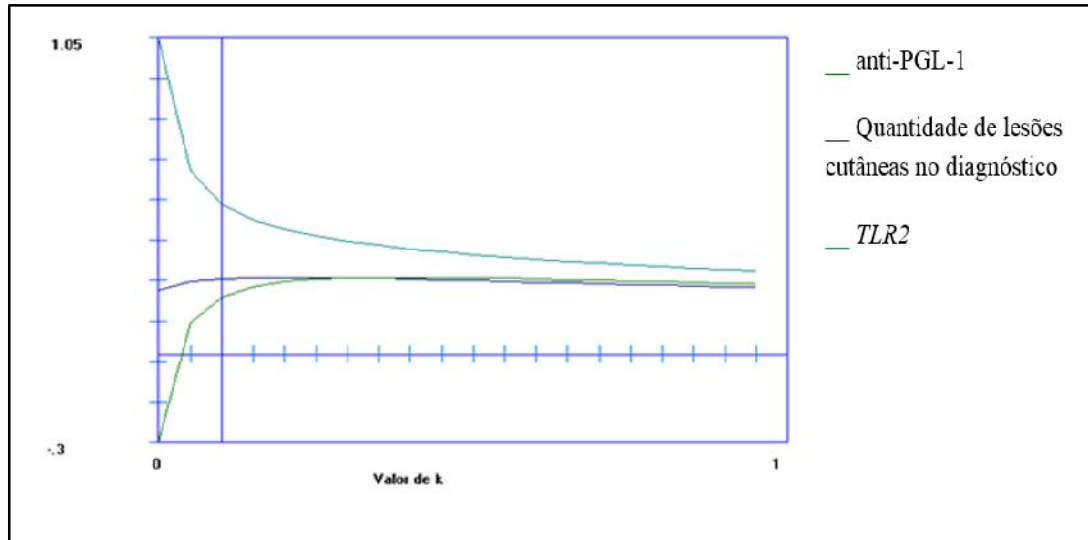
Tabela 5 - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica IL-10 e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes com reação tipo 1, Uberlândia, 2017

Variáveis	Reação tipo 1					
	Correlação Simples e Parcial (Variável Básica IL-10)					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.23}$	0,90	81	0,007	-0,28	7	0,582
$r_{02.13}$	0,91	82	0,002	0,35	12	0,488
$r_{03.12}$	0,95	90	<0,001	0,78	60	0,063

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial; IL-10: Interleucina 10; 0 (variável básica): IL-10; 1: Quantidade de lesões cutâneas; 2: Toll-like receptor 2; 3: anti-PGL-1; interpreta-se: $r_{01.23}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1 isolando o efeito das variáveis 2 e 3; $r_{02.13}$: Correlação parcial entre variável 0 e 2 isolando o efeito das variáveis 1 e 3; $r_{03.12}$: Correlação parcial entre variável 0 e 3 isolando o efeito das variáveis 1 e 2.

Conforme citado anteriormente relação entre essas 3 variáveis independentes apresentou multicolinearidade conforme ANEXO E. Assim, com a finalidade de estabilizar estimativas dos coeficientes de trilha, corrigir e averiguar as relações causais entre as variáveis, utilizou-se o menor valor da constante k (0.1002), fundamentado na regressão em crista conforme figura 5 a seguir.

Figura 5 - Gráfico do traço da crista, representando a variação nos valores dos coeficientes de regressão com diversos valores de k . Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística



A análise das estimativas dos coeficientes de trilha na tabela 6 deixa clara a dependência da expressão da IL-10 influenciada diretamente pelo efeito direto de anti-PGL-1 (0,503), maior que o efeito residual do modelo (0,364); o efeito direto de TLR2 (0,488), sobre a expressão de IL-10, maior que o efeito residual de (0,364) e a influencia indireta da quantidade de lesões cutâneas via anti-PGL-1 (0,422) sobre a IL-10, maior que o efeito residual de (0,364) (Tabela 12).

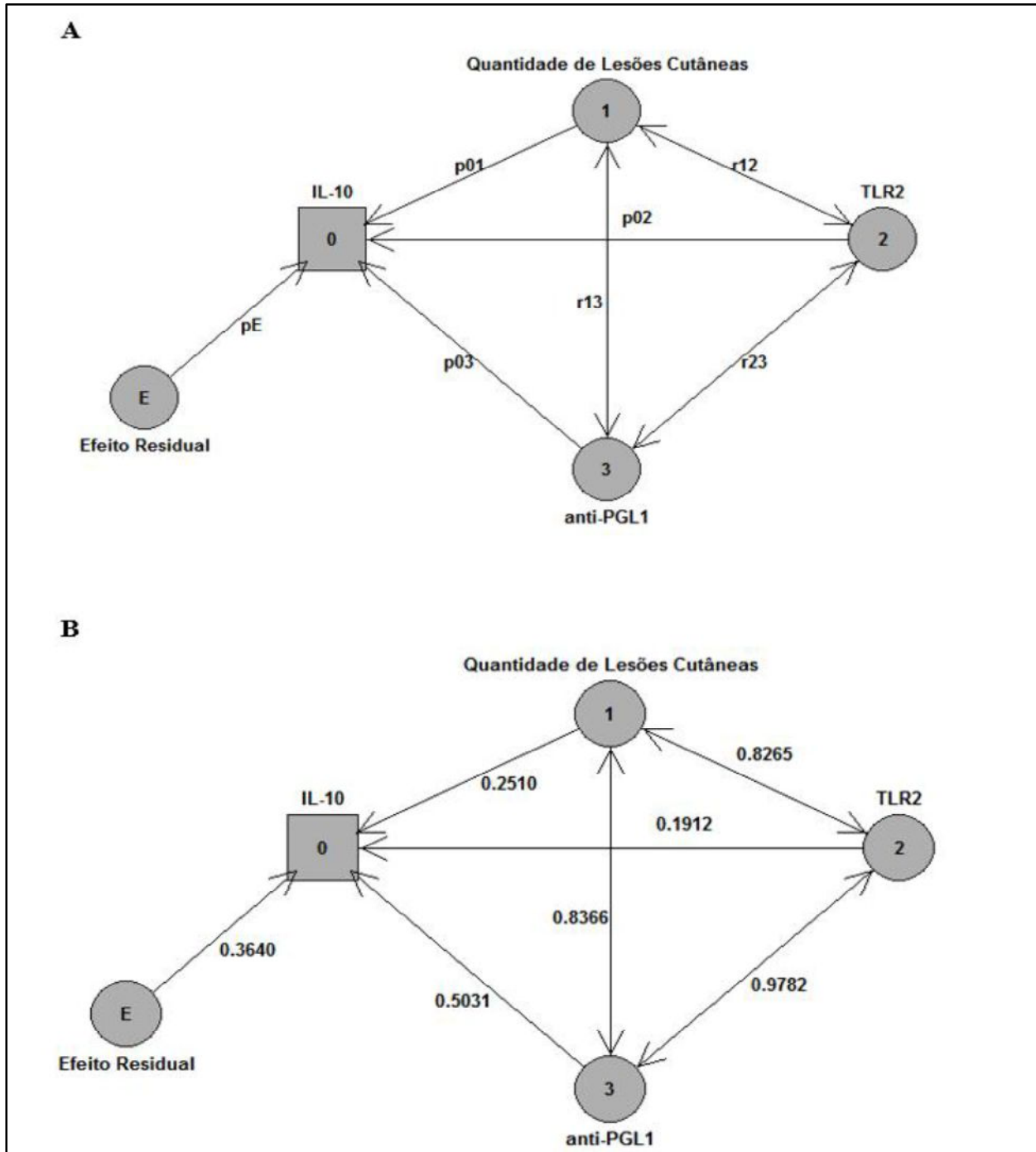
Tabela 6 - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis explicativas sobre a variável básica IL-10 no grupo com reação tipo 1 após correção da multicolinearidade, Uberlândia, 2017

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Vias de associação</i>	<i>Estimador</i>	<i>Estimativa</i>	<i>VIF</i>
<i>Quantidade de lesões cutâneas</i>	Efeito direto sobre interleucina 10	p_{01}	0,251	2,80
	Efeito indireto via toll-like receptor 2	$p_{02} r_{12}$	0,157	2,95
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{03} r_{13}$	0,422	3,19
	Efeito total	r_{01}	0,856	
<i>Toll-like receptor 2</i>	Efeito direto sobre interleucina 10	p_{02}	0,191	5,25
	Efeito indireto via Quantidade de lesões cutâneas	$p_{01} r_{12}$	0,207	1,57
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{03} r_{23}$	0,488	4,27
	Efeito total	r_{02}	0,905	
<i>anti-PGL-1</i>	Efeito direto sobre interleucina 10	p_{03}	0,503	5,50
	Efeito indireto via Quantidade de lesões cutâneas	$p_{01} r_{13}$	0,210	1,63
	Efeito indireto via toll-like receptor 2	$p_{02} r_{23}$	0,185	4,08
	Efeito total	r_{03}	0,950	
$R^2_{0.1234}$				0,867
<i>Efeito Residual (pε)</i>				0,364
<i>k</i>				0,1002

Nota: $R^2_{0.1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; k: 0.1002206; VIF: Fatores de inflação da variância, Interleucina 10; 0 (variável básica); 1: Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico; 2: toll-like receptor 2; 3: anti-PGL-1; interpreta-se: p_{01} (efeito direto da Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico sobre Interleucina 10); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto da Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico via toll-like receptor 2 sobre Interleucina 10, obtido multiplicando-se o efeito direto de toll-like receptor 2 sobre Interleucina 10 (p_{02}) pela correlação entre Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico e toll-like receptor 2 (r_{12}); r_{01} : correlação entre Interleucina 10 e Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico (mesma regra para as outras combinações do modelo).

O gráfico 4 A e B demonstraram inequivocamente o efeito direto e indireto do anti-PGL-1 sobre a expressão de mRNA IL-10 em pacientes com reação hansênica tipo 1, no qual também pode ser visualizada a forte associação entre as três variáveis independentes (anti-PGL-1, *TLR2*, quantidade de lesões cutâneas) representadas pelas setas bidirecionais com valores acima de 0,8 (multicolinearidade corrigida).

Gráfico 4 - Diagrama causal da análise de trilha no grupo com reação tipo 1, variável básica IL-10, A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017



Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado na seta indicadas entre anti-PGL-1 e IL-10; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\leftrightarrow . \leftarrow), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso a IL-10.

6.4.2 Análise de trilha no grupo com reação tipo 2

A tabela 7 mostra a matriz de correlação entre as variáveis com maiores coeficientes de correlação e *p*-valores significativos, destacando-se a relação entre IL-10 e as variáveis *TLR2* ($r_{xy}= 0,91$; $p= 0,004$) e anti-LAM ($r_{xy}= 0,95$; $p= 0,001$) indicando uma potencial via de relação causal entre antígenos do *M. leprae* (*LAM*) e o desenvolvimento de reações hansênicas do tipo 2. Resta enfatizar que o antígeno PGL-1 não apresentou associação com a expressão de IL-10 nesse grupo de pacientes ($r_{xy}= 0,19$; $p= 0,673$).

Tabela 7 - Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo com reação tipo 2, fundamentada na correlação linear simples de *Pearson*, Uberlândia, 2017

Variáveis	Reação tipo 2								
	IL-10			Toll-like receptor 1			anti-LAM		
	$r_{x,y}$	IC (95%)	<i>p</i> -valor	$r_{x,y}$	IC (95%)	<i>p</i> -valor	$r_{x,y}$	IC (95%)	<i>p</i> -valor
Quantidade de Nervos Afetados	0,30	-0,59 – 0,86	0,513	0,76	0,01 – 0,96	0,048	0,05	-0,74 – 0,77	0,91
Quantidade de Lesões Cutâneas	0,65	-0,19 – 0,94	0,109	-0,08	-0,78 – 0,72	0,872	0,67	0,09 – 0,97	0,098
GID	-0,16	-0,82 – 0,67	0,730	-0,10	-0,79 – 0,70	0,824	-0,07	-0,89 – 0,48	0,869
Gênero	0,41	-0,49 – 0,89	0,351	0,56	-0,33 – 0,92	0,187	0,20	-0,69 – 0,81	0,669
Idade	0,38	-0,88 – 0,52	0,401	0,22	0,64 – 0,83	0,64	-0,48	-0,87 – 0,57	0,273
Etnia	0,63	-0,23 – 0,94	0,126	0,43	-0,48 – 0,89	0,336	0,59	-0,30 – 0,93	0,158
Toll-like receptor 1	0,35	-0,54 – 0,87	0,433				0,19	-0,66 – 0,82	0,679
Toll-like receptor 2	0,91	0,31 – 0,98	0,004	0,27	-0,61 – 0,85	0,548	0,92	0,79 – 1,00	0,003
IL-10				0,35	0,54 – 0,87	0,433	0,95	0,31 – 0,98	0,001
IFN-γ	-0,34	-0,87 – 0,55	0,453	0,36	-0,54 – 0,88	0,429	-0,27	-0,85 – 0,61	0,556
IL-4	-0,09	-0,79 – 0,71	0,837	-0,12	-0,80 – 0,70	0,798	0,02	-0,64 – 0,83	0,966
TNF-α	-0,12	-0,80 – 0,69	0,792	0,48	-0,43 – 0,91	0,279	-0,32	-0,84 – 0,63	0,477
anti-LAM	0,95	0,31 – 0,98	0,001	0,18	-0,66 – 0,82	0,705			
anti-PGL-1	0,19	-0,65 – 0,83	0,673	0,27	-0,61 – 0,85	0,559	0,07	-0,66 – 0,82	0,871
Índice Baciloscópico	-0,17	-0,82 – 0,67	0,708	0,40	-0,50 – 0,89	0,371	0,16	-0,68 – 0,81	0,729

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; IC (95%): Intervalo de Confiança de 95%, GID: Grau de incapacidade no diagnóstico; IL-10: Interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; IL-4: Interleucina 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral; anti-LAM: anticorpo contra antígeno lipoarabinomanana; anti-PGL-1: anticorpo contra antígeno glicolípido fenólico-I ; Quantidade de nervos acometidos (dados referentes ao diagnóstico); Quantidade de lesões cutâneas (dados referentes ao diagnóstico).

Na tabela 8, a correlação simples entre o antígeno LAM e a expressão de IL-10 foi de 0,95 (r_{02}), com um poder de influenciar a variação dessa citocina em 90,2%. O modelo da correlação parcial, excluindo o efeito da influencia de *TLR2*, demonstrou que o LAM mantém a capacidade de influenciar em 77,4% a variação na expressão da citocina IL-10, o que não ocorreu entre o *TLR2* e a IL-10 (<1%).

Tabela 8 - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica IL-10 e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes com reação tipo 2, Uberlândia, 2017

Variáveis	Reação Tipo 2					
	<i>Correlação Simples e Parcial (Variável Básica Interleucina 10)</i>					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.2}$	0,91	82,8	0,004	-0,01	< 1	0,987
$r_{02.1}$	0,95	90,2	0,001	0,88	77,4	0,018

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial; 0 (variável básica): Interleucina 10; 1: Toll-like receptor 2; 2: anti-LAM; interpreta-se: $r_{01.2}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1 isolando o efeito da variável 2 (mesma regra para a outra combinação da correlação parcial).

Por meio da análise de trilha (Tabela 9) pôde ser confirmada as relações de causa e efeito entre o antígeno LAM e a expressão de IL-10 no desfecho das reações do tipo 2, visto que o efeito de anti-LAM diretamente sobre a expressão da citocina IL-10 (0,778) é maior que o efeito residual (0,208) do modelo.

O *TLR2* influencia a expressão de IL-10 associando-se ao LAM, como mostra a estimativa do coeficiente de trilha pelo efeito indireto do *TLR2* sobre IL-10 via anti-LAM (0,721) (Tabela 9).

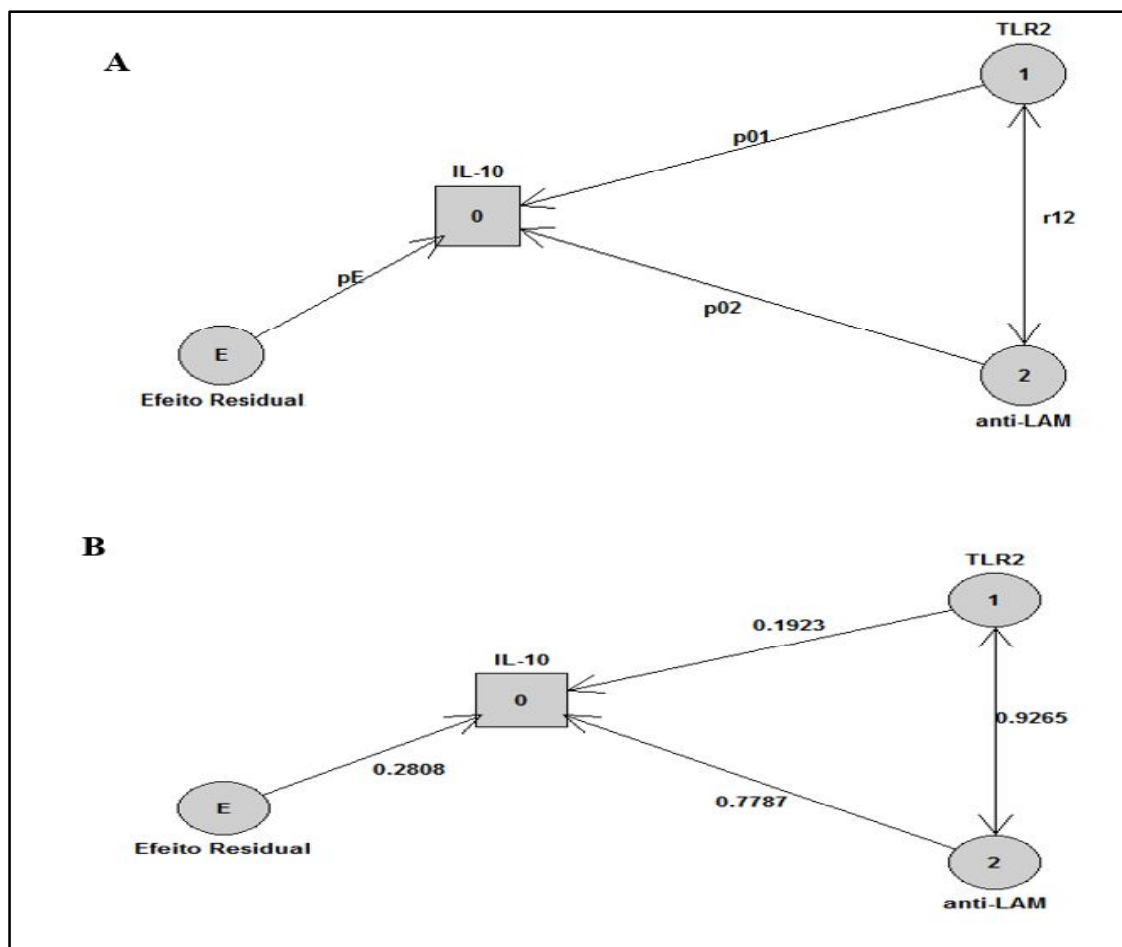
Tabela 9 - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica IL-10 no grupo com reação tipo 2, Uberlândia, 2017

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Vias de associação</i>	<i>Estimador</i>	<i>Estimativa</i>
Toll-Like receptor 2	Efeito direto sobre Interleucina 10	p_{01}	0,192
	Efeito indireto via <i>anti-LAM</i>	$p_{02} r_{12}$	0,721
	Efeito total	r_{01}	0,913
anti-LAM	Efeito direto sobre Interleucina 10	p_{02}	0,778
	Efeito indireto Toll-like receptor 2	$p_{01} r_{12}$	0,178
	Efeito total	r_{02}	0,957
$R^2_{0.12}$			0,921
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,280

Nota: $R^2_{0.12}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; 0 (variável básica): Interleucina 10; 1: Toll-like receptor 2; 2: anti-LAM; interpreta-se: p_{01} (efeito direto de *TLR2* sobre Interleucina 10); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto de *TLR2* via anti-LAM sobre Interleucina 10 obtido multiplicando-se o efeito direto de anti-LAM sobre Interleucina 10 (p_{02}) pela correlação entre *TLR2* e anti-LAM (r_{12}); r_{01} : correlação entre Interleucina 10 e *TLR2* (mesma regra para as outras combinações do modelo).

Nos gráficos 5 A e B, observa-se o diagrama de trilha com a seta unidirecional entre anti-LAM e IL-10, cujo coeficiente ($0,778$) é maior do que o efeito residual ($0,280$) demonstrando a influencia direta desse antígeno na expressão da IL-10; e uma seta bidirecional entre *TLR2* e anti-LAM mostrando alta correlação entre essas variáveis ($0,926$).

Gráfico 5 - Diagrama causal da análise de trilha, no grupo com reação tipo 2, variável básica IL-10, A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017



Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado na seta indicadas entre anti-LAM e IL-10; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais ($\leftrightarrow . \leftarrow$), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso a IL-10.

6.5 Análise de trilha no grupo controle (não reacional)

No grupo controle, envolvendo MB e PB, houve maior expressão de IFN- γ quando comparado ao grupo reacional e conseqüentemente a tabela 10 mostra a matriz de correlação entre as variáveis desse grupo, salientando-se a relação entre a expressão de IFN- γ e os receptores de reconhecimento padrão da imunidade inata *TLR1* ($r_{xy}= 0,73$; $p= 0,023$) e *TLR2* ($r_{xy}= 0,78$; $p= 0,013$).

Constata-se ainda na tabela 10, a alta correlação entre os receptores *TLR1* e *TLR2* ($r_{xy}= 0,87$; $p= 0,002$) nesse grupo não reacional, o poderia indicar atividade de reconhecimento antigênica desses receptores de modo associado.

Tabela 10 - Matriz de correlação entre variáveis básica e variáveis explicativas do grupo controle, fundamentada na correlação linear simples de *Pearson*, Uberlândia, 2017

Variáveis	Grupo não reacional								
	IFN- γ			Toll-like receptor 1			Toll-like receptor 2		
	r_{xy}	IC (95%)	p-valor	r_{xy}	IC (95%)	p-valor	r_{xy}	IC (95%)	p-valor
Quantidade de Nervos Afetados	0,04	-0,68 – 0,72	0,905	-0,20	-0,77 – 0,62	0,576	-0,18	-0,63 – 0,76	0,606
Quantidade de Lesões Cutâneas	-0,35	-0,85 – 0,47	0,265	-0,26	-0,74 – 0,67	0,473	-0,47	-0,86 – 0,43	0,142
GID	-0,06	-0,78 – 0,61	0,869	-0,09	-0,82 – 0,54	0,795	-0,11	-0,71 – 0,70	0,741
Sexo	-0,20	-0,79 – 0,60	0,572	-0,15	-0,71 – 0,70	0,688	-0,16	-0,73 – 0,68	0,647
Idade	0,24	-0,55 – 0,81	0,513	0,07	-0,64 – 0,76	0,845	-0,06	-0,62 – 0,77	0,865
Etnia	0,10	-0,65 – 0,75	0,781	0,23	-0,52 – 0,82	0,520	-0,02	-0,59 – 0,79	0,947
Toll-like receptor 1	0,73	0,03 – 0,94	0,023				0,87	0,43 – 0,98	0,002
Toll-like receptor 2	0,78	0,45 – 0,98	0,013	0,87	0,43 – 0,98	0,002			
IL-10	0,66	-0,13 – 0,95	0,053	0,32	-0,62 – 0,84	0,401	0,43	-0,55 – 0,87	0,249
IFN-γ				0,74	0,03 – 0,94	0,023	0,78	0,45 – 0,98	0,013
IL-4	-0,31	-0,85 – 0,47	0,384	-0,25	-0,84 – 0,49	0,485	-0,34	-0,86 – 0,44	0,309
TNF-α	-0,28	-0,85 – 0,45	0,426	-0,31	-0,87 – 0,38	0,386	-0,36	-0,87 – 0,41	0,279
anti-LAM	-0,29	-0,84 – 0,49	0,419	-0,28	-0,85 – 0,47	0,429	-0,28	-0,82 – 0,54	0,399
anti-PGL-1	-0,51	-0,89 – 0,31	0,132	-0,33	-0,78 – 0,62	0,357	-0,35	-0,86 – 0,42	0,294
Índice Baciloscópico	-0,45	-0,87 – 0,38	0,197	-0,38	-0,81 – 0,55	0,283	-0,74	-0,89 – 0,33	0,144

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; IC (95%): Intervalo de Confiança de 95%, GID: Grau de incapacidade no diagnóstico; IL-10: Interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; IL-4: Interleucina 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral; anti-LAM: anticorpo contra antígeno lipoarabinomanna ; anti-PGL-1: anticorpo contra antígeno glicolípido fenólico-I; Quantidade de nervos acometidos (dados referentes ao diagnóstico); Quantidade de lesões cutâneas (dados referentes ao diagnóstico).

A tabela 11 identifica a correlação simples e a correlação parcial na relação entre as variáveis independentes e a expressão de IFN- γ , além da influência de cada fator sobre essa variável principal dada pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2). Correlacionando IFN- γ com *TLR1* e excluindo o efeito de *TLR2* ($r_{01.2} = -0,17$; $p = 0,701$), por meio da correlação parcial, observou-se que o *TLR1* perdeu o seu poder de influenciar a variação na expressão de IFN- γ ; da mesma forma excluindo-se o efeito de *TLR1* ($r_{02.1} = 0,72$; $p = 0,063$), notou-se ausência de influencia do *TLR2* sobre os níveis de IFN- γ , o que permite inferir que esses receptores atuam como co-receptores influenciando na expressão dessa citocina (Tabela 11).

Tabela 11 - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica IFN- γ e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes do grupo controle, Uberlândia, 2017

Variáveis	Controle					
	Correlação Simples e Parcial (Variável Básica IFN- γ)					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.2}$	0,74	54,7	0,023	-0,17	2,9%	0,701
$r_{02.1}$	0,78	60,8	0,013	0,72	51,8%	0,063

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial; 0 (variável básica): Interferon-gama; 1: Toll-like receptor 1; 2: Toll-like receptor 2; interpreta-se: $r_{01.2}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1 isolando o efeito das variável 2; $r_{02.1}$: Correlação parcial entre variável 0 e 2 isolando o efeito das variável 1.

Ae expressões gênicas de cada um dos receptores (*TLR1* e *TLR2*), como consta na tabela 12, não tem efeito direto e indireto sobre a expressão de IFN- γ , pois as estimativas isoladas dessas variáveis ($p_{01} = 0,231$ e $p_{02} = 0,579$, respectivamente) são menores que o efeito residual ($p\epsilon = 0,612$). Todavia, observa-se que o efeito total de ambos os receptores (0,738 e 0,782, respectivamente) são maiores que o efeito residual indicando que os mesmos podem atuar em conjunto na expressão do IFN- γ (Tabela 12).

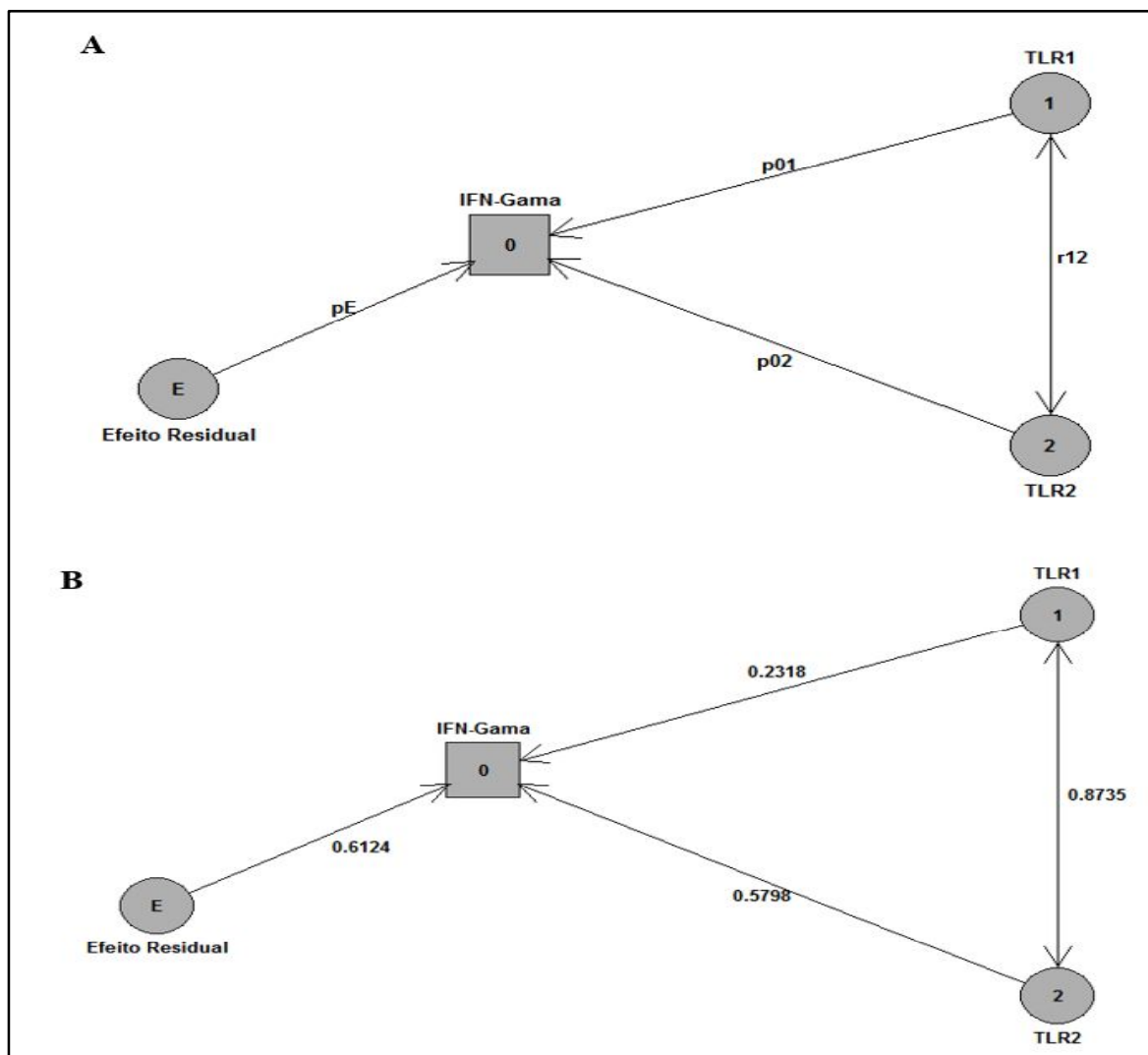
Tabela 12 - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica (IFN- γ), Uberlândia, 2017

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Vias de associação</i>	<i>Estimador</i>	<i>Estimativa</i>
<i>Toll-Like receptor 1</i>	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{01}	0,231
	Efeito indireto via <i>Toll-Like receptor 2</i>	$p_{02} r_{12}$	0,506
	Efeito total	r_{01}	0,738
<i>Toll-Like receptor 2</i>	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{02}	0,579
	Efeito indireto via <i>Toll-Like receptor 1</i>	$p_{01} r_{12}$	0,202
	Efeito total	r_{02}	0,782
$R^2_{0,12}$			0,624
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,612

Nota: $R^2_{0,12}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; **0** (variável básica): IFN- γ ; **1**: *Toll-like receptor 1*; **2**: *Toll-like receptor 2*; interpreta-se: p_{01} (efeito direto de *TLR1* sobre Interleucina 10); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto de *TLR1* via *TLR2* sobre IFN- γ , obtido multiplicando-se o efeito direto de *TLR2* sobre IFN- γ (p_{02}) pela correlação entre *TLR1* e *TLR2* (r_{12}); r_{01} : correlação entre IFN- γ e *TLR1* (mesma regra para as outras combinações do modelo)

O diagrama de trilha, exposto no gráfico 6, demonstra que a expressão de IFN- γ nesse grupo não reacional, não sofre influencia direta dos receptores *TLR1* e *TLR2*, pois o efeito residual (0,612) é maior do que essas estimativas (0,231 e 0,579), no entanto a correlação entre os receptores é bastante elevada (0,873) e conforme citado anteriormente, os efeitos total em ambas as vias (r_{01} e r_{02}) são maiores que o efeito residual, ou seja, somados esses efeitos influenciam de modo indireto a expressão de IFN- γ .

Gráfico 6 - Diagrama causal da análise de trilha, no grupo controle, variável básica IFN- γ , A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017



Nota: *interpreta-se*: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser visto na setas indicadas entre *TLR1* e IFN- γ e *TLR2* e IFN- γ ; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\leftrightarrow . \leftarrow), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso o IFN- γ .

O grupo controle foi composto por pacientes PB e MB. E para maiores elucidções dividimos esse grupo segundo as classificações operacionais citadas (dados contidos no Apêndice D). Embora a expressão de IFN- γ tenha sido relativamente maior nas formas paucibacilares como observado no gráfico 3 D da página 86, em comparação com os demais pacientes (reação tipo 1, reação tipo 2 e controle multibacilar), não houve associação significativa dessa citocina com os *TLR1* e *TLR2* no grupo controle paucibacilar, indicando

que esse achado não é dependente da condição do indivíduo ser MB ou PB. No entanto, ressalta-se que quanto mais estratificarmos a amostra menor será a probabilidade de encontrarmos associações e resultados significantes. Assim poderíamos encontrar a relação *TLR1*, *TLR2* tendo como efeito a expressão de IFN- γ se aumentarmos o número de sujeitos nas amostras PB e MB do grupo controle, o que poderia de fato mostrar que tanto a classificação PB quanto a MB apresentariam co-expressão desses receptores associando-se com a produção de IFN- γ .

7 DISCUSSÃO

7.1 Dados clínicos e epidemiológicos

Essa pesquisa partiu do estudo da associação clínica e epidemiológica de variáveis que podem influenciar a ocorrência das reações hansênicas tais como a classificação operacional (caracterizador clínico de níveis antigênicos); número de nervos afetados, número de lesões cutâneas e GID. Posteriormente, avaliou-se os níveis dos marcadores sorológicos (anticorpos contra os antígenos de *M. leprae*, PGL-1 e LAM) e principais citocinas envolvidas na disseminação e limitação do crescimento bacilar nos grupos reacional, controle e seus subgrupos. Ao final, mostramos por meio da análise de trilha, os potenciais mecanismos imunológicos imbricados nas relações causais entre essas variáveis, cujos principais resultados no grupo reacional foram a presença de uma possível associação entre *TLR2* e os antígenos do *M. leprae* cujo efeito direto foi a produção de IL-10, uma citocina relacionada à mecanismos que favorecem a multiplicação e persistência bacilar. Tal fato não ocorre no grupo controle, visto que nesses indivíduos verifica-se uma provável presença do heterodímero (*TLR1-TLR2*) induzindo a expressão de IFN- γ .

Encontrou-se nesse estudo a associação entre o grupo reacional com a classificação operacional MB e do grupo controle com a forma clínica PB, isto é, indivíduos MB são aqueles com maior potencial para desenvolver reações hansênicas independente do tipo de reação, estando esses achados compatíveis com diversos estudos já descritos anteriormente (VAN BRAKEL, 1994; CROFT et al, 1999; SAUNDERSON et al., 2000; KUMMAR; DOGRA; KAUR, 2004). Aponta-se com esse primeiro achado, reforçado pelas literaturas citadas, a associação entre indivíduos MB (indivíduos com mais de 5 lesões, segundo a OMS) e a ocorrência de reações hansênica, sendo o primeiro indicativo clínico da carga bacilar.

No presente estudo, a reação tipo 2 foi a mais frequente no grupo reacional, porque a maioria dos pacientes MB eram da forma clínica DV e V, corroborando com resultados de outros estudos (SCOLLARD et al., 1994; GALLO et al., 1997; NERY et al., 1998). Outros estudos como o de Suchonwanit et al. (2015) reportou maior frequência da reação tipo 1, pois sua amostra foi composta majoritariamente por pacientes DT.

Quanto ao período de ocorrência do estado reacional, houve maior frequência de reação pós-alta da PQT, fato esse que concordou com outros trabalhos na literatura (BECX-BLEUMINK; BERHE, 1992; GALLO et al., 1997; NERY et al., 1998). Apesar de ser um fator de risco para a reação pós-alta a presença de reação durante o tratamento, no presente estudo a maior prevalência de reação foi pós-alta, devido a nossa amostra ter sido por conveniência, uma abordagem diferente daquela de estudos prospectivos ou retrospectivos citados acima.

Quanto ao período máximo de ocorrência de reações hansênicas pós-alta, nossos resultados demonstraram que elas ocorreram em até 5 anos pós alta medicamentosa. Embora não exista um consenso seguro sobre a recorrência tardia de reações hansênicas e recidivas, alguns trabalhos na literatura relatam que reação tipo 1 pode ser observada até o terceiro ano em PB e até o quinto ano pós alta e/ou até negatificação da baciloscopia em MB (BECX-BLEUMINK; BERH, 1992; LIENHARDT; FINE, 1994). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), os estados reacionais podem ocorrer em até 3 anos após tratamento. A recorrência tardia de sinais e sintomas devem ser diferenciados de recidiva da hanseníase (FOSS et al., 2003).

A quantidade de nervos acometidos apresentou associação de tendência crescente no grupo reacional, isto é, os indivíduos desse grupo têm maior número de nervos acometidos. As maiores complicações da hanseníase são as reações hansênica do tipo 1 e do tipo 2, condições distintas que ocorrem por mecanismos diferenciados, porém ambas ocasionam perda transitória ou permanente da função neural caso não ocorra intervenção em tempo hábil (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008). O acometimento neural é um processo complexo e pode ocorrer por diversos fatores, seja na presença de imunidade celular mediada por células T, como ocorre na reação tipo 1 do grupo dimorfo, seja pela presença de elevada quantidade de antígenos, posto que o *M. leprae* apresenta tropismo pela célula de Schwann conduzindo tal relação patógeno-hospedeiro ao dano neural periférico (ALVES et al., 2004; VAN BRAKEL, 2010). Naqueles pacientes com reação tipo 2, além da influência da carga bacilar há uma atividade inflamatória aguda com envolvimento do TNF- α circulante ocasionando depósito de imunocomplexos, ativação de complemento, migração de

polimorfonucleares para o sítio da resposta inflamatórias e liberação de enzimas responsáveis pelas lesões teciduais (WEMAMBU et al., 1969; VAN BRAKEL, 2010).

Como foi observada nesse estudo, a maior quantidade de lesões cutâneas inspecionadas no diagnóstico, utilizada para fins de classificação operacional dos pacientes, mostrou-se como variável associada ao grupo reacional, funcionando como um caracterizador desses indivíduos MB, visto que, esse dado clínico é um indicador da presença de elevados níveis de antígenos nesses pacientes. Trabalhos anteriores do nosso grupo corroboram com esse resultado do presente estudo, haja vista que, demonstraram uma correlação positiva entre a quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico com o número de reações hansênicas desenvolvidas durante o tratamento (ANTUNES et al., 2016), bem como o IB do diagnóstico e o número de reações durante e após o tratamento (RODRIGUES et al., 2000).

Os resultados referentes ao GID nessa pesquisa tiveram uma associação de tendência crescente no grupo reacional e estão em concordância com resultados de trabalho prévio (NERY et al., 1998), cuja comparação entre um grupo reacional e um controle não reacional demonstrou maior quantidade de indivíduos reacionais com grau 1 e 2 de incapacidade. Esse levantamento reafirma um comportamento já encontrado na análise da variável quantidade de nervos afetados e grupo reacional. Um outro estudo sobre ultra-sonografia dos principais nervos acometidos na hanseníase (Ulnar, mediano e tibial posterior) comparou 3 grupos (I sem histórico de reações hansênicas, II com histórico de reação tipo 1, III histórico para reação tipo 2) constatando que o grupo III, aquele que apresentou história pregressa para reação tipo 2, apresentou anormalidades como ausência de estrutura fascicular discernível, sinais de intensidade T1 e T2 baixos compatíveis com progressiva deposição de colágeno (associada a formação de imunocomplexos) e presença de espessamento neural, porém o grupo II (com histórico de reação tipo 1) teve espessamento neural mais intenso (MARTINOLI et al., 2000). Essas evidências ultrassonográficas associam-se ao acometimento intenso dos nervos nas reações tipo 1 e extenso e progressivo nas reações do tipo 2, demonstrando o maior número de nervos acometidos no grupo reacional associado a resposta imunológica exacerbada.

Esta pesquisa encontrou associação entre o sexo masculino com o desfecho reação hansênica estando em consonância com vários outros trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., 2013; ANTUNES et al., 2013). Os resultados de Mastrangelo et al. (2011) também estão de acordo com os achados dessa pesquisa, já que esses autores encontram na amostra de pacientes reacionais o predomínio de indivíduos do sexo masculino quase 3 vezes maior que o feminino. A justificativa dessa associação pode ter ligação com o fato de que as mulheres têm

maiores preocupações com a saúde, corpo, estética e emocionais, o que as torna mais frequentes em unidades de saúde e, portanto, são diagnosticadas para doenças e eventos relacionados de maneira precoce quando comparada aos homens sendo, enfim, tratadas na fase inicial da doença constituindo em sua maioria os casos PB (Le GRAND, 1997; OLIVEIRA; ROMANELLI, 1998). Tem sido relatado também a presença de fatores que podem levar as mulheres a uma resposta imune celular mais efetiva contra a infecção (Le GRAND, 1997). Fatores hormonais tais como a queda de estradiol, um tipo de estrogênio, podem favorecer o imunocenesência como ocorre no período de transição da menopausa nas mulheres (GIEFING-KRÖLL et al., 2015).

Embora a variável idade não apresente nenhuma associação com o grupo reacional, houve maior proporção de indivíduos nas faixas etárias de 34 a 44 seguidas por aquela de 45 a 54 em conformidade com os achados de Teixeira, Silveira e França (2010) com maior frequência de indivíduos reacionais nas faixas de 30 a 44 e 45 a 59. A média de idade no grupo reacional desse presente estudo foi concordante com estudos anteriores (BRITO et al., 2008; MASTRANGELO et al., 2011; SUCHONWANIT et al., 2015) e a proporção de indivíduos nessas faixas etárias também são consoantes ao da população economicamente ativa (PEA) do Brasil, fato este que compromete a mão de obra produtiva do país, já que, as incapacidades físicas impedem os indivíduos de executarem tarefas diárias e laborais (IBGE, 2011).

7.2 Os níveis de anti-PGL-1 e anti-LAM nos grupos reacionais e controle

Verificadas as associações entre variáveis clínicas e epidemiológicas que influenciaram no desfecho reação hansênica, pesquisou-se os níveis de anticorpos contra os principais antígenos constituintes do *M. leprae*, que por sua vez, influenciam no desfecho das variáveis clínicas e imunológicas.

Os níveis de anticorpos IgG anti-LAM elevado no grupo reacional reforçam achados já relatados por Verhagen et al. (1999) que encontrou associação entre a expressão desse marcador com ocorrência de reações hansênicas e o elevado risco de desenvolvimento da reação do tipo 2, além daquele citado por Lockwood, Colston e Khanolkar-Young (2002) que mostraram a associação entre a reação hansênica do tipo 1 em DT e DV e elevação de anticorpos IgG anti-LAM, citando também a persistência na expressão desse anticorpo, mesmo após tratamento, como ocorre em nossos dados. Esses estudos tornam claro o envolvimento do LAM com o gatilho de ambas as reações como foi reportado nesse estudo.

Todavia, ao estratificar o grupo reacional, encontra-se associação de maiores níveis desse antígeno no grupo com reação tipo 2 quando comparado aos demais grupos (reação tipo 1, controles PB e MB) concordando com os resultados de Beuria et al. (1998), cuja soropositividade para IgG anti-LAM nas reações do tipo 2 foi mais elevada ao comparar com os demais indivíduos.

Dhandayuthapani et al., (1992) reforçam essa comparação verificando os níveis de IgG₁ anti-LAM nos grupos com reação tipo 2, 1 e grupos controle PB e MB, demonstrando maiores níveis desse antígeno nos indivíduos com reação tipo 2, a presença e importância do LAM na patogênese dessa reação mediada por imunocomplexos, e o envolvimento da resposta Th2.

A patogênese das reações hansênica do tipo 2 teve como principal componente etiológico os elevados níveis de IgM e IgG anti-LAM, já que a depleção desse antígeno foi mais lenta quando comparada ao PGL-1 (LEVIS et al., 1986). Na ausência de anticorpo monoclonal (MAb 5c11) ligado ao LAM, utilizado no experimento de Glatman-Freedman et al. (2000), este antígeno foi absorvido pelos macrófagos presentes nas células hepáticas sendo depurado com rapidez do organismo. No entanto, quando o LAM se ligou ao anticorpo, sua captação pelo baço foi reduzida e o complexo foi direcionado ao sistema hepatobiliar para depuração e inativação, porém com uma redução na sua eliminação. Presume-se, por meio desses resultados e citações que o LAM tem maior relação no desfecho das reações tipo 2 do que o componente PGL-1 como foi notado em nosso presente estudo.

A presente pesquisa constatou maiores níveis de IgM anti-PGL-1 no grupo reacional, tanto para a reação tipo 1 quanto para a reação tipo 2, com maior média no grupo com reação tipo 2, bem como no grupo MB entre os controles, ratificando que a IgM anti-PGL-1 é marcador de carga bacilar e seus níveis podem diferenciar as formas PB e MB auxiliando na classificação da doença (SILVA et al., 2007). Lyons et al. (1988) ao compararem a detecção de IgG e IgM entre grupos reacionais (tipo 1 e 2) e grupo controle PB, não encontraram diferença significativa entre as médias dos dois grupos reacionais reportando diferença significativa apenas com o grupo controle PB.

Existem estudos relatando a associação de risco existente entre os níveis do antígeno PGL-1 e as reações do tipo 2 (ENH) (MANANDHAR; LEMASTER; ROCHE, 1999), além de evidências sobre a participação do PGL-1 na patogênese do ENH e na formação de imunocomplexos (ROJAS et al., 1997). Além disso, vários trabalhos demonstraram que pacientes com sorologia ELISA anti-PGL-1 positiva no diagnóstico tiveram maior risco para

ocorrência de reações, durante o tratamento e após alta da PQT (BRITO et al., 2008; ANTUNES et al., 2013; ANTUNES et al., 2016).

Em conformidade com o nosso trabalho, estudos anteriores reportaram não apenas os altos níveis desse anticorpo nos estados reacionais independente do tipo de reação Stefani et al. (1998), bem como a presença do anticorpo IgG anti-PGL-1 e a ocorrência de surtos reacionais (JADHAV et al., 2011). Apesar dos níveis de IgM anti-PGL-1 terem sido maiores no grupo com reação tipo 1 do que no controle MB, essa diferença não foi significativa entre médias no nosso estudo, podendo a ausência de significância estatística ser atribuída ao fato de mais da metade dos pacientes desse grupo controle pertencer as formas DD, DV e V, uma vez que, indivíduos das formas próximas ao polo virchowiano apresentam soropositividade alta para IgM anti-PGL-1 quando comparada aos demais pacientes do espectro (ROCHE; THEUVENET; BRITTON, 1991; PARKASH et al., 2008). Resta enfatizar ainda, que mais da metade do grupo com reação tipo 1 apresentou esse tipo de reação no diagnóstico (antes de iniciar o tratamento) evidenciando uma piora imunológica (*downgrading*) em direção ao polo V do espectro (SEHGAL; BHATTACHARYA; JAIN, 1990; LOCKWOOD, 1996), provavelmente por aumento da carga bacilar que leva a síntese de anticorpos IgM anti-PGL-1.

7.3 A expressão de IL-10 nas reações hansênicas

A primeira análise da expressão gênica de IL-10 nos diferentes grupos (reacional e controle) e suas subdivisões (reação tipo 1, tipo 2, controle PB e MB), concedeu-nos apenas meios de analisar a sua relação entre esses grupos.

O grupo reacional apresentou maior expressão de IL-10 quando comparado ao grupo controle, principalmente naqueles indivíduos que desenvolveram reação do tipo 2. A reação do tipo 2 é uma resposta inflamatória local e sistêmica, com predomínio de hipersensibilidade do tipo III de Gell & Coombs, caracterizada pela formação de imunocomplexos (IC) antígeno-anticorpo e ativação do complemento que se depositam principalmente no endotélio dos pequenos vasos sanguíneos, pele, articulações e fígado com a presença de elevados níveis IL-1 e TNF- α circulante, assim como a presença de mRNA das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 em lesões de pacientes com esse tipo de reação (YAMAMURA et al. 1992; NAAFS, 1994; CRUVINEL et al., 2010). Nesse tipo de reação hansênica que envolve a participação de complexos imunes, a IL-10, além de suprimir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, é responsável pelo processo de

diferenciação, proliferação e sobrevivência das células B, que por sua vez, juntamente com outras células produzem IL-10 (MOORE, 2001). Outro fator que pode contribuir para a expressão de IL-10 é a imunomodulação da reação inflamatória com a atuação de linfócitos B reguladores (B_{Regs}), que dependem de estimulação via linfócitos T auxiliar que reconhecem o antígeno e expressam a molécula CD40L, que por sua vez, une-se ao ligante CD40, expresso na membrana de linfócitos B, que irão secretar IL-10 e TGF- β induzindo células T_{Regs} (linfócitos T $CD4^+CD25^+$) e o seu fator de transcrição FOXP3, cujo resultado será a inibição da diferenciação de $LTCD4^+$, $LTCD8^+$ e de células *NK*, isto é, bloqueio da resposta Th1 (ITOH; HIROHATA, 1995; MIZOGUCHI et al., 1997; MAURI; EHRENSTEIN, 2008).

A expressão da citocina IL-10 mostrou-se como um biomarcador do grupo reacional, mais especificamente no grupo com reação tipo 2, que se caracterizou por uma resposta Th2, relacionando, enfim, nossos resultados com o levantamento feito por Madan, Agarwal e Chander (2011), que encontraram elevados níveis de IL-10 no grupo com reação tipo 2, quando comparados aos grupos com reação tipo 1 e indivíduos MB de um grupo controle sem reação.

Além da relação direta dessa citocina com a reação hanseniana tipo 2, essa molécula executa um papel central na sobrevivência e persistência do patógeno intracelular inativando a atividade macrófagica através da inibição do IL-12 e IFN- γ , interferindo por fim, na produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio eficazes na destruição de patógenos explicando a sua considerável expressão no grupo controle MB (SIBLEY et al., 1988; DE LA BARRERA, et al., 2004).

Os pacientes com reação tipo 1 exibiram, nessa amostra, elevada expressão de IL-10 constituindo metade dos valores encontrados naqueles com reação do tipo 2, concordando com Moraes et al. (1999), em que ambos os grupos reacionais expressaram IL-10 de forma predominante quando comparados ao grupo controle. Diversas hipóteses podem ser apontadas para a expressão dessa citocina no grupo com reação hanseniana do tipo 1 no presente estudo, dentre elas o fato de que nesse grupo mais da metade dos indivíduos fizeram reação antes da PQT, o que caracteriza uma reação do tipo 1 downgrading. Essa reação, embora apresente bacilos fragmentados, é caracterizada imunologicamente por aumento de linfócitos B e nos níveis de anticorpos, redução na atividade de células *NK* e presença de bacilos viáveis, que proliferam progressivamente induzindo mecanismos imunossupressores e predominância de resposta Th2 em direção ao polo V do espectro (SEHGAL; BHATTACHARYA E JAIN, 1990).

Para Naafs (1994) pacientes não tratados apresentam multiplicação de bacilos que poderiam sensibilizar a imunidade celular desencadeando uma reação do tipo downgrading e quando em tratamento, upgrading, pela liberação de componentes antigênicos de bacilos mortos como ocorre em pacientes DT e DD. No entanto, Opromolla (1994) discordou dessa ideia e levantou a hipótese que pode explicar a expressão de IL-10 na reação tipo 1, visto que, para o autor, todas essas reações são desencadeadas pela multiplicação de bacilos que permanecem persistentes por períodos variáveis e que seus produtos, uma vez fragmentados, desencadeiam os estados reacionais, seja na vigência do tratamento, seja após seu término.

Esse mecanismo de persistência do bacilo registrado por Opromolla (1994) é consoante aos recentes estudos sobre a biogênese de organelas lipídicas na célula do hospedeiro induzidas pelos bacilos viáveis ocasionando aumento de PGE₂ e IL-10 via *TLR2* (MISRA et al., 1995; MATTOS et al., 2011; MATTOS et al., 2011; MATTOS et al., 2012; ELAMIN; STEHR; SINGH, 2012). Acreditamos que tanto pacientes antes e após tratamento da PQT sofrendo reações do tipo 1 constantes e tardias podem apresentar bacilos viáveis promovendo o “gatilho” nesse tipo de reação.

7.4 A expressão de IFN- γ no grupo controle

O grupo controle (não reacional), expressou maiores níveis de IFN- γ quando comparado ao grupo reacional, o que confere a este grupo que se caracterizou por baixos níveis de anticorpos contra o *M. leprae*, mecanismos eficazes de controle bacilar. Para mediar respostas imunológicas competentes contra patógenos intracelulares, a IL-12 composta pelas cadeias p35 e p40, ativa células *NK* e induz linfócitos T CD4⁺ naive a se diferenciarem em células Th1 produzindo IFN- γ , que consequentemente induz APCs a secretarem IL-12 em um processo de retroalimentação envolvendo as duas citocinas (TRINCHIERI, 1994; GROHMANN et al., 2001).

Quanto ao grupo reacional, a menor expressão de IFN- γ quando comparada aos controles (PB e MB) pode ter um dos seus mecanismos associados a expressão de IL-10, marcadora imunológica do grupo reacional, que pode ter bloqueado a maturação de DCs, interrompendo a indução de IL-12 e, consequentemente, inibindo a regulação positiva de IFN- γ , bem como a capacidade de DCs desencadearem resposta Th1 nesse grupo, cuja produção de IFN- γ , em consequência, não foi expressiva (DE SMEDT; MENU; CHAOUAT, 1997; CORINTI et al., 2001).

Ao estratificarmos o grupo controle por classificação operacional, encontramos que o grupo PB é aquele que mais expressa IFN- γ , em conformidade com o estudo Dockrell et al. (1996), os quais cultivaram células mononucleares de pacientes paucibacilares (T e DT/PB) e estimularam com antígenos de *M. leprae*, constatando posteriormente a predominância de IFN- γ em sobrenadantes.

Trabalhos anteriores têm corroborado com os nossos resultados demonstrando maiores níveis de IFN- γ em PB, tanto pela detecção dessa citocina por ELISA (Oliveira et al., 2014), quanto pela regulação negativa do IFN- γ sobre IL-10, por meio do estímulo de células mononucleares de sangue periférico desses pacientes PB (LIBRATY et al., 1997)

7.5 Análises de trilha nos grupos reacionais e controle

Esse estudo é o primeiro a utilizar o método da análise de trilha mostrando sua aplicabilidade no entendimento de vias imunológicas relacionadas às reações hansênicas. Por meio de correlações cruciais entre as variáveis e o peso de cada uma delas (coeficientes de trilha) nos grupos reacional e controle, os achados de grande relevância foram a relação entre os marcadores de carga bacilar, anti-PGL-1 e anti-LAM, interagindo somente com o *TLR2* e este induzindo (ou associando-se) à expressão de IL-10, independente do tipo de reação (tipo 1 e tipo 2). Enquanto que, no grupo controle, observou-se a possível expressão do heterodímero *TLR1-TLR2* induzindo a síntese de IFN- γ . Ao confrontarmos esses resultados nos diferentes grupos com os dados produzidos na literatura, hipotetizamos que no grupo reacional não ocorre a formação de heterodímeros *TLR1-TLR2*, cuja ausência de tal associação física pode ser influenciado por fatores como polimorfismos em *TLR2* e formação de homodímeros *TLR2-TLR2* relacionados a maior expressão de *TLR2* quando comparada com a síntese de *TLR1*.

Observando nossos resultados no grupo reacional, nota-se por meio de diagramas de causa e efeito, que o *TLR2* reconheceu os antígenos, LAM e PGL-1, e conseqüentemente a expressão desse receptor, associou-se com a presença de IL-10, que pode ser explicada por duas hipóteses sendo elas a hiperexpressão de *TLR2* e ou a presença de polimorfismos nesse gene levando a uma resposta imuncelular pobre associada ao polo virchowiano da doença (BOCHUD et al., 2003), sendo essa forma clínica predominante nos casos reacionais do presente estudo.

O estudo de Saraav, Singh e Sharma (2014) reportou que a prolongada sinalização do homodímero *TLR2-TLR2*, induzida pelos componentes da parede celular de micobactérias

como o *M. tuberculosis*, limita a ativação das vias de proteínas quinases ativadoras de mitógenos (*MAPK*) inibindo fusão do fagolisossomo e a apresentação antigênica pelo MHC classe II, além de promover a síntese de citocinas anti-inflamatórias conduzindo a produção de IL-10 e TGF- β que por sua vez bloqueiam a ativação de NF-kB. A maior expressão de *TLR2* nos grupos reacionais pode estar favorecendo a formação de homodímeros *TLR2-TLR2* em maior quantidade quando comparada a formação de heterodímeros *TLR1-TLR2*, induzindo, enfim, citocinas do perfil Th2 que por sua vez está contribuindo para persistência, aumento do número de bacilos e elevando o risco para ocorrência de reações hansenianas.

Nesse grupo reacional há uma baixa produção de IFN- γ e uma elevada expressão de IL-10, que está associada também a expressão de *TLR2*, o que enfatiza a hipótese de alteração fenotípica nesse receptor, posto que, estudos anteriores descrevem a dependência entre indução de IL-10 e a sinalização cruzada (*Cross-talk*) entre o *TLR2* e os demais receptores do tipo toll (*TLR7* e *TLR9*), sugerindo uma ativação inicial de citocinas pró-inflamatórias e subsequente ativação de STAT3 favorecendo a indução transcricional de IL-10 (BENKHART et al., 2000; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2003; RE; STROMINGER, 2004; SAMARASINGHE et al., 2006).

Concomitantemente, analisando o grupo controle, constata-se uma via imunológica que regula a expressão IFN- γ dependente da ativação do heterodímero *TLR1-TLR2*, consoante àquele explanado por Takeuchi et al. (2002) como importante no reconhecimento de agonistas, como as lipoproteínas micobacterianas, induzindo a ativação do fator de transcrição NF-kB que induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias (JIMENEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2016).

A ausência de correlação entre a expressão dos receptores *TLR1* e *TLR2* no grupo reacional enfatiza a hipótese de que eles estão expressos, porém não estão funcionalmente cooperando em mediar a resposta imune após reconhecimento de agonistas como o LAM e PGL-1, provavelmente devido a presença de polimorfismos nos domínios sinalizadores desses receptores ou pela formação excessiva de homodímeros *TLR2-TLR2*, o que pode ser evidenciado pela baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ nesse grupo. Corroborando com os nossos resultados Tapping e Tobias (2003) demonstraram que quando existe uma associação física entre os receptores de *TLR1* e *TLR2* haverá uma resposta de ativação celular induzida pelos antígenos micobacterianos promovendo a ativação de NF-kB.

Nos últimos anos, diversos autores têm trabalhado com hipóteses da presença de polimorfismos, seja em *TLR1*, seja em *TLR2*, acarretando suscetibilidade ou resistência à

doença ou às reações hansênicas (KANG; CHAE, 2001; JOHNSON et al., 2007; BOCHUD et al., 2008; SCHURING et al., 2009).

Em nosso estudo, a comparação entre os grupos reacional e controle, assim como seus subgrupos, não apresentaram diferenças na expressão relativa de mRNA dos *TLR1* e *TLR2* no sangue periférico, concordando com trabalho anterior, que embora tenham demonstrado diferenças na expressão desses receptores em lesões cutâneas ao comparar pacientes tuberculoides e virchowianos, não encontraram diferenças na expressão de *TLR2* em monócitos circulantes, que segundo os autores, pode existir uma via de sinalização diferenciada dependente do heterodímero *TLR1-TLR2* nesses pacientes determinando a resposta imune frente ao patógeno Krutzik et al. (2003). Contudo a comparação entre as expressões de *TLR1* e *TLR2* no mesmo grupo mostrou maior expressão de *TLR2* nos grupos reacionais, o que nos dá indícios da provável formação de homodímeros *TLR2-TLR2* que conforme relatado por outros autores ativam o fator de transcrição CREB indutor da síntese de IL-10 (SARAAV; SINGH; SHARMA, 2014). Acreditamos que existe um mecanismo diferenciado promovendo a formação de heterodímeros no grupo controle e formação de homodímeros (*TLR2-TLR2*) ou ausência de associação entre os receptores *TLR1* e *TLR2* promovida por polimorfismos no grupo reacional.

Assim, avaliando nossos resultados, existe grande possibilidade da presença de um polimorfismo no *TLR2* afetando a capacidade de formação do heterodímero com o *TLR1*, causando uma falha nos mecanismos de sinalização imunológica e tornando esses pacientes susceptíveis as reações hansênicas em conformidade com os achados de Bochud et al. (2008) que atribuiu associação de risco para ocorrência de reações do tipo 1, em razão da presença de polimorfismo no gene de *TLR2* (alelo microssatélite marcador-280bp).

Corroborando com essa hipótese, alguns estudos revelaram que macrófagos *knock-out* (*TLR2^{-/-}*), estimulados pelo *M. leprae*, tiveram bloqueio na ativação do fator de transcrição NF-kB elucidando a importância desse receptor de reconhecimento padrão (BOCHUD; HAWN; ADEREN, 2003).

Um provável polimorfismo no *TLR2* no grupo reacional, poderia justificar a não formação de um heterodímero com *TLR1* nessa amostra (ausência de correlação entre os dois receptores e baixa expressão de IFN- γ), a despeito de ter reconhecido os ligantes LAM e PGL-1. Possivelmente essa baixa expressão de IFN- γ pode ser devido a menor ativação do fator NF-kB quando a sinalização é associada apenas ao *TLR2* induzida por antígenos micobacterianos como demonstrado por Tapping e Tobias (2003). Consequentemente, o

mecanismo regulador e inibidor da IL-10 sobre a expressão de IFN- γ está predominando nesse sistema (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; GAJEWSKI; FITCH, 1988).

Um polimorfismo no *TLR1* é pouco provável no grupo reacional, posto que, estudos anteriores mostraram que polimorfismo nesse gene acarreta baixo risco para desenvolvimento de reações, ora significativo, ora não significativo, indicando baixa penetrância do mesmo, além de conferir proteção contra a doença e contra a reação (JOHNSON et al., 2007; MISCH et al., 2008; SCHURING et al., 2009; WONG et al. 2010; MARQUES et al. 2013).

Takeuchi et al. (2002) reportam que o excesso de agonistas do heterodímero *TLR1-TLR2* podem induzir maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, o que pode justificar a presença do IFN- γ no grupo controle MB, porém, há um equilíbrio na produção dessa citocina e a síntese de IL-10 que nesses indivíduos desempenha um mecanismo de modulação diferente do que ocorre nos grupos reacionais os quais apresentam elevados níveis da IL-10 excedendo a produção de IFN- γ , ou seja, há um mecanismo de imunossupressão. Essas premissas podem ser fatores essenciais para entender, o porquê de pacientes que compartilham da mesma forma clínica e mesmos índices baciloscópicos, venham a apresentar desfechos diferentes, isto é, reações hansênicas, fato não explicado somente pela carga bacilar, visto que, mais da metade dos pacientes podem ser acometidos por reações hansênicas e os demais podem não desenvolver reação em nenhum momento da vida (ANTUNES et al., 2013).

Quanto a relação dos antígenos (LAM e PGL-1) na análise de trilha, quando o grupo reacional foi dividido por tipo de reação, não houve mudanças na relação antígeno, *TLR2* e IL-10. No entanto, o tipo de ligante do *M. leprae*, PGL-1 ou LAM, foi diferente nos dois tipos de reação hansênica. Na reação tipo 1, o PGL-1 foi o principal agonista que se associou ao *TLR2* e expressão de IL-10. Estudos comparando diferentes antígenos em DT e DV, mostraram maior positividade do anti-PGL-1 em relação ao anti-LAM nesses grupos que apresentam risco para reação tipo 1 (JAYAPAL et al., 2001). Outras pesquisas apontam a sorologia positiva para PGL-1 e Mitsuda positivo como fatores de risco para reações do tipo 1 (ROCHE et al., 1991). A ligação do PGL-1 ao *TLR2* no grupo com reação tipo 1 pode ser facilitada pela presença do marcador de superfície de macrófagos, o CD14, que concentra e distribui triacil-lipopeptídeos ao *TLR2* e *TLR1* (RANOVA; KELLEY; TAPPING, 2013). Estudo anterior reportou que pacientes com reação tipo 1 tem quase 3 vezes maiores níveis de CD14 quando comparado aos pacientes com reação do tipo 2 (SANTOS et al., 2007), o que nos direciona à hipótese de que esse marcador molecular, o CD14, facilite a interação entre o PGL-1 e *TLR2*.

Quanto a reação do tipo 2, o ligante crucial foi o LAM na interação com o *TLR2* e IL-10. Esse antígeno tem sido apontado como o principal no “gatilho” da reação tipo 2, devido seu maior potencial em induzir proliferação de células T restritas pelo CD1b (SIELING et al., 1995), que são uma família conservada de glicoproteínas semelhantes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em mamíferos, especializada na captura de lipídeos para apresentação aos vários clones de linfócitos T. Além disso trabalhos anteriores têm demonstrado que o antígeno LAM pode bloquear a sinalização para produção de IFN- γ corroborando com os nossos resultados que demonstraram baixa expressão dessa citocina no grupo reacional (SIBLEY et al. 1990; TING et al., 1999).

Ainda de acordo com Verhagen et al. (1999), o LAM está ausente nas lesões de pacientes MB não reacionais e está envolvido com a patogênese do ENH, visto que os níveis desse antígeno persistiram por mais tempo nos tecidos após tratamento da PQT, quando comparado ao PGL-1. Outro estudo mostrou que o LAM conjugado ao anticorpo monoclonal (MAb 5c11) não foi depurado com a mesma rapidez quando comparado ao LAM não conjugado ao mesmo anticorpo, mostrando o papel desse antígeno na formação de imunocomplexos (GLATMAN-FREEDMAN et al., 2000). Uma pesquisa sobre a presença do *M. leprae* na célula de Schwann induzindo lesão neural reportou o LAM como a principal molécula associada ao patógeno que ativa o complemento e causa dano ao nervo (BAHIA EL IDRISSI et al., 2015). Corroborando com esses trabalhos prévios, a maior concentração de LAM observada na reação tipo 2 neste presente estudo, provavelmente está associada a dificuldade de clearance desse antígeno, devido a participação dele na formação desses complexos imunes.

Acreditamos que a predominância de resposta imunossupressora, evidenciada pela elevada expressão de IL-10, nas reações do tipo 1 (downgrading) e tipo 2, podem ser causadas por uma soma de fatores que envolvem, desde a indução desse mecanismo por parte dos bacilos viáveis, pela fisiopatologia dessas reações, pela elevada expressão de *TLR2* promovendo a formação de homodímeros *TLR2-TLR2* e pela disfunção presente no gene de *TLR2* como reportou Kang et al, (2004) ao encontrar elevados níveis de IL-10 em PBMC de portadores de hanseníase com a mutação Arg677Trp no gene do *TLR2*.

Existe grande possibilidade de haver bacilos viáveis nessas reações induzindo a expressão de IL-10 e a persistência do *M. leprae*, haja vista que o perfil de reação desses pacientes foram predominantemente do tipo 1, em sua maioria downgrading (antes do tratamento) e reação pós alta; e reação do tipo 2, também após a alta. Estudos mostraram que o *M. leprae* viável pode influenciar a formação de organelas lipídicas que produzem PGE₂,

que por sua vez estão envolvidas na síntese de IL-10, em uma via dependente da sinalização do *TLR2* (MATTOS et al., 2010; MATTOS et al., 2011; MACKENZIE et al., 2013). O bacilo vivo pode ainda, induzir a expressão de IL-10 na interação com outros receptores como os receptores de leucócitos com domínio tipo imunoglobulina (*LILR - Leukocyte-Ig-like receptors*), que bloqueiam a atividade microbicida dos *TLRs* e conduzem à produção de IL-10, além de uma provável ação de um receptor de lectina do tipo C, o *DC-SIGN*, que reconhece o *M. leprae* mediando à produção de IL-10 favorecendo a atividade imunossupressora (BLEHARSKI et al., 2003; BARREIRO et al., 2006).

Sobre os fatores que podem interferir no modo de ação do *TLR2*, daqueles mencionados previamente, não podemos descartar outras hipóteses que potencializam a ligação dos agonistas ao *TLR2*, tais como a presença da proteína radioprotetora de 105 kDa (RP105), que atua como uma molécula acessória para *TLR2*, formando parte do complexo receptor para reconhecimento imunológico de lipoproteínas micobacterianas (BLUMENTHAL et al., 2009).

Para o reconhecimento de antígenos lipopeptídeos pelo *TLR2*, uma glicoproteína extracelular denominada vitronectina e seu receptor integrina $\beta 3$ tem função de sensibilizar o reconhecimento desses antígenos por esses receptores (GEROLD et al., 2008). Enquanto a vitronectina opsoniza as bactérias e contribui para a adesão dessas às células hospedeiras, o seu receptor integrina $\beta 3$ promove a internalização das bactérias via complexo com o *TLR2*. Portanto, a integrina $\beta 3$ contribui na coordenação de respostas de *TLR2* aos antígenos lipopolissacarídeos bacterianos assim como outros agonistas e a associação física formando um complexo com esse receptor que é fundamental para ativação celular induzida após estimulação de agonistas de *TLR2* (GEROLD et al., 2008).

Portanto, após verificadas associações entre as variáveis, suas relações causais e confrontando os grupos reacional e controle, há grande possibilidade de existir diferentes mecanismos quanto a interação entre os receptores *TLR1* e *TLR2* nos diferentes grupos, tornando-se cruciais no controle do crescimento bacilar. Esse mesmo mecanismo que acarreta disfunção na associação física entre *TLR1* e *TLR2*, que por sua vez provavelmente induz produção de IL-10, pode favorecer a sobrevivência e multiplicação bacilar, tal como a ocorrência de reações hansênicas. Essas reações podem ser desencadeadas pela multiplicação de bacilos persistentes e que durante o tratamento, uma vez fragmentados, seus produtos podem desencadear os estados reacionais, seja antes do tratamento, durante ou após seu término (OPROMOLLA, 1994).

Em conclusão, a análise de trilha permitiu demonstrar a relação causal entre *TLR2* e *IL-10* nas reações hansênicas que podem sofrer influências de fatores como a elevada produção de *TLR2* e/ ou de polimorfismos no gene *TLR2*, objeto de futuras investigações.

8 APLICAÇÕES PRÁTICAS

Tendo em vista a importância da sorologia ELISA anti-PGL-1 na rotina diagnóstica dos centros de referência nacional em hanseníase como ferramenta no auxílio diagnóstico da doença, prognóstico, monitoramento de contatos intradomiciliares e diferenciação de reação e recidiva, faz-se necessária a implantação de um segundo marcador antigênico na rotina desses serviços, o LAM, isto é, mensurar os níveis de IgG anti-LAM, pois como foi mostrado nessa pesquisa e em outros estudos, esse antígeno associa-se principalmente com as reações do tipo 2.

Assim, os níveis de LAM no diagnóstico podem ser utilizados para verificar o risco para ocorrência de reações do tipo 2 durante e após o tratamento, além de auxiliar na resposta terapêutica dos indivíduos, posto que, como foi reportado nessa pesquisa e em outras, que há diferenças entre indivíduos quanto a eliminação do LAM e aqueles com baixa capacidade de eliminar esse antígeno terão maior risco para desenvolver surtos reacionais.

Dessa forma uma estratégia de definição de grupos sob risco e monitoramento desses com acompanhamento frequente e intenso, auxiliaria na implementação de ações antecipadas evitando enfim, agravos como ocorrência de lesões cutâneas e neurais, além de internações relacionadas a complicações secundárias como tromboembolias pulmonares que consequentemente causam a morte desses pacientes.

9 CONCLUSÕES

O estudo em questão contribuiu para identificar e quantificar as relações de causa e efeito envolvendo variáveis associadas aos episódios reacionais da hanseníase. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

a) As relações causais envolvendo antígenos do *M. leprae* (PGL-1 e LAM) e os receptores do tipo toll (*TLR1* e *TLR2*), tendo como efeito a produção de citocinas envolvidas na disseminação ou controle bacilar, foram diferentes nos grupos reacional e controle, o que infere a presença de mecanismos imunológicos distintos;

b) O efeito direto de PGL-1 e LAM sobre *TLR2* e a associação desse com a expressão de IL-10 no grupo reacional, demonstrou a relação causa-efeito entre essas variáveis e uma possível falha no mecanismo funcional do *TLR2*, impedindo sua interação física com o *TLR1* e a indução de IFN- γ , promovendo a disseminação bacilar e a ocorrência de reações hansênicas;

c) No grupo controle, a elevada correlação entre *TLR1* e *TLR2* demonstrou co-expressão entre esses receptores e que o efeito total dessas variáveis foi capaz de interferir na expressão de IFN- γ promovendo controle bacilar e uma potencial imunomodulação nos indivíduos PB e MB não reacionais;

d) Na reação do tipo 1, a relação causal mostrou que o PGL-1 foi o principal ligante associado ao *TLR2*, cujo efeito foi a produção de IL-10 em menor quantidade do que na reação do tipo 2;

e) Na reação do tipo 2, ao LAM foi atribuído o papel principal de agonista na relação com o *TLR2* tendo como efeito a síntese de IL-10, predominante nesse tipo de reação hansênica;

f) A análise de trilha é uma ferramenta fundamental para investigar as relações causais e os efeitos diretos e indiretos existentes entre antígenos de *M. leprae*, *TLR1*, *TLR2* e citocinas envolvidas no controle e disseminação bacilar na hanseníase, podendo auxiliar no entendimento das vias de sinalização da resposta imune envolvida na relação parasito-hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; JANEWAY, C. A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129-38, Jan. 2000.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H: **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Saunders 2003.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul. 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb. 24 2006.
- ALMEIDA, P. E. et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1337-45, Jul. 2009.
- ALVES, L. et al. Mycobacterium leprae infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 2, p. 429-37, Sep. 15 2004.
- ALWIN, D. F.; HAUSER, R. M. The decomposition of effects in path analysis. **American Sociological Review**, v. 40, n.1, p. 37-47, 1975.
- ANDERSSON, A. K. et al. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3725-33, Jun. 2005.
- ANTUNES, D. E. et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 901-8, Nov. 2013.
- ANTUNES, D. E. et al. Number of leprosy reactions during treatment: clinical correlations and laboratory diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 741-745, Nov/Dec. 2016.
- ARAUJO, S. et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of Mycobacterium leprae and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Cinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, Dec. 01 2016.
- ATKINSON, S. E. et al. Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 1, p. 27-34, Mar. 2004.

BAHIA EL IDRISSEI, N. et al. M. leprae components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 5, p. 653-67, May 2015.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 30, n. 6, p. 593-601, Aug. 2004.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARBOSA JUNIOR ADE, A. et al. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. **Pathology Research and Practice**, v. 190, n. 8, p. 782-5, Sep. 1994.

BARNES, P. F. et al. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1441-6, Apr. 1992.

BARREIRO, L. B. et al. DC-SIGN interacts with Mycobacterium leprae but sequence variation in this lectin is not associated with leprosy in the Pakistani population. **Human Immunology**, v. 67, n. 1-2, p. 102-7, Jan/Feb. 2006.

BARSHES, N. R.; GOODPASTOR, S. E.; GOSS, J. A. Pharmacologic immunosuppression. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 411-20, Jan. 2004.

BECK-BLEUMINK, M. Relapses among leprosy patients treated with multidrug therapy: experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia; practical difficulties with diagnosing relapses; operational procedures and criteria for diagnosing relapses. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 60, n. 3, p. 421-35, Sep. 1992.

BECK-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. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 60, n. 2, p. 173-84, Jun. 1992.

BENKHART, E. M. et al. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1612-7, Aug. 2000.

BEURIA, M. K. et al. Levels of IgG subclasses in active and inactive cases in the disease spectrum of leprosy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 115, n. 1, p. 61-6, Jan. 1998.

BLEHARSKI, J. R. et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1527-30, Sep. 2003.

BLUMENTHAL, A. et al. RP105 facilitates macrophage activation by Mycobacterium tuberculosis lipoproteins. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 1, p. 35-46, Jan. 2009.

- BOCHUD, P. Y. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 253-61, Jan. 2008.
- BOCHUD, P. Y.; HAWN, T. R.; ADEREM, A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3451-4, Apr. 2003.
- BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749-95, 1997.
- BOTOS, I.; SEGAL, D. M.; DAVIES, D. R. The structural biology of Toll-like receptors. **Structure**, v. 19, n. 4, p. 447-59, Apr. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria GM/MS nº 149**, de 3 de fevereiro de 2016. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Eliminação da Hanseníase como Problema de Saúde Pública, com a finalidade de orientar os gestores e os profissionais dos serviços de saúde. [Brasília], 2016. Disponível em: <<https://central3.to.gov.br/arquivo/297694/>> Acesso em: 15 jun. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde : 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para o Controle da Hanseníase – Cadernos de Atenção Básica nº 10**. Brasília, DF, 2002 (Série A. Normas e Manuais Técnicos; nº111).
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_hanseníase_10_0039_m_final.pdf>. Acessado em: 03 abr. 2015.
- BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, Jul. 1999.
- BRITO, M. F. M. et al. Associação entre reação hansênica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e baciloscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, supl. 2, p. 67-72, 2008.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**. princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- GIEFING-KROLL, C. et al. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. **Aging Cell**, v. 14, n. 3, p. 309-21, Jun. 2015.

- CASSATELLA, M. A. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 6, p. 2207-11, Dec. 1993.
- CASTORINA-SILVA, R. **Efeitos adversos dos medicamentos utilizados no tratamento da hanseníase**. In: Lyon S, Grossi MAF. Hanseníase. Rio de Janeiro: Medbook; 2013.
- CHAN, J. et al. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1755-61, May 1991.
- CHANG, Q. et al. Maturation of mobilized peripheral blood progenitor cells: preclinical and phase I clinical studies. **Journal of Hematotherapy**, v. 4, n. 4, p. 289-97, Aug. 1995.
- CHATTERJEE, D.; KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 113-20, Feb. 1998.
- CORINTI, S. et al. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4312-8, Apr. 2001.
- CROFT, R. P. et al. Nerve function impairment in leprosy: design, methodology, and intake status of a prospective cohort study of 2664 new leprosy cases in Bangladesh (The Bangladesh Acute Nerve Damage Study). **Leprosy Review**, v. 70, n. 2, p. 140-59, Jun. 1999.
- CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v. 1, 4. ed. Viçosa : UFV, 2012. 514 p.
- CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.
- CURY, L. M. **Excluir, isolar e conviver: um estudo sobre a lepra e a hanseníase no Brasil**. 394f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- DE LA BARRERA, S. et al. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 128-38, Oct. 2004.
- DE SMEDT, D.; MENU, E.; CHAOUAT, G. Immunoactive products of placenta. VI. Induction of transient murine T cell anergy by a low-molecular-weight compound obtained from supernatants of human placental cultures. **Cellular Immunology**, v. 175, n. 2, p. 128-40, Feb. 1997.

- DE SOUSA, J. R. et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. **Journal of Clinical Pathology**, v. 70, n. 6, p. 521-527, Jun. 2017.
- DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209-20, Nov. 1991.
- DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 318-24, Aug. 2000.
- DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Specificity of IgG subclass antibodies in different clinical manifestations of leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 88, n. 2, p. 253-7, May 1992.
- DINARELLO, C. A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 1 Pt 1, p. 11-24, Jan. 1999.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-8, Aug. 2000.
- DOCKRELL, H. M. et al. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p. 4385-9, Oct 1996.
- DONNELLY, R. P.; DICKENSHEETS, H.; FINBLOOM, D. S. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, n. 6, p. 563-73, Jun. 1999.
- DOUGLAS, J. T. et al. The effects of chemotherapy on antibody levels in lepromatous patients. **Leprosy Review**, v. 59, n. 2, p. 127-35, Jun. 1988.
- DRAPER, P. Cell walls of *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy**, v.44, p.95-98, 1976.
- EICHELMANN K, et al. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 104, n. 7, p. 554-63, Mar. 2012.
- ELAMIN, A. A.; STEHR, M.; SINGH, M. Lipid Droplets and *Mycobacterium leprae* Infection. **Journal of Pathogens**, v. 2012, p. 361-374, 2012.
- FIELD, A. **Descobrimos a estatística usando o SPSS**. Trad. Lorí Viali. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 688p.
- FLEURY, R. N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley & Jopling – uma análise morfológica. **Hansenologia Internationalis**. 14(2):101-8, 1989.
- FLEURY, R.N. Patologia e manifestações viscerais. In: Opromolla DVA, editor. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; p. 63-71, 2000.
- FLOSS, H. G.; YU, T. W. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 621-32, Feb. 2005.

FONTELLES, M. J. **Bioestatística aplicada à pesquisa experimental**: volume 1/ Mauro José Fontelles. – São Paulo: Editora Livraria da Física, 2012.

FOSS, N. T. Episódios reacionais na hanseníase. **Medicina Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 2, p. 453-459, 2003.

FOSS, N. T, et al. **Hanseníase**: episódios reacionais. In FB Jatene, Projeto diretrizes, Associação Médica Brasileira/Conselho Federal de Medicina, Brasília, p. 161-179, 2005.

FREHEL, C.; RASTOGI, N. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 2916-21, Dec. 1987.

GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **Journal of Immunology**, v. 140, n. 12, p. 4245-52, Jun 15 1988.

GALLO, et al. Estudo comparativo com dois esquemas poliquimioterápicos (duração fixa) em hanseníase multibacilar – seguimento de $50,32 \pm 19,62$ e $39,70 \pm 19,47$ meses. **Hansenologia Internationalis**, v. 22, p. 5-14, 1997.

GARBINO, J.A. O paciente com suspeita de hanseníase primariamente neural. **Hansenologia Internationalis**. v. 32, p. 203-6, 2007.

GEORGE, M. et al. Sub-polar lepromatous leprosy localized to the face. **Dermatology Online Journal**, v. 16, n. 9, p. 8, Sep. 15 2010.

GEROLD, G. et al. A Toll-like receptor 2-integrin beta3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 761-8, Jul. 2008.

GIRNDT, M. Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10. **Blood Purif**, v. 20, n. 5, p. 485-8, 2002.

GLATMAN-FREEDMAN, A. et al. Clearance and organ distribution of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding immunoglobulin M. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 335-41, Jan. 2000.

GOHAR, A. Borderline lepromatous leprosy with type 1 (downgrading) reaction. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 39, n. 2, p. 228, Mar. 2014.

GOMES, G. I. et al. The functional state of the complement system in leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 605-10, Apr. 2008.

GOULART, I. M. B. et al. Caracterização da epidemia hanseníase no município de Uberlândia - Minas Gerais, Brasil 1996-2000. **Hansenologia Internationalis**, v. 31, p. 33-40, 2006.

GOULART, I. M. et al. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **The American Journal of Pathology**, v. 148, n. 3, p. 911-7, Mar. 1996.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-75, Jul/Aug. 2002.

GROHMANN, U. et al. Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 221-7, Jul. 2001.

GUERARDEL, Y. et al. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30635-48, Aug. 2002.

HART, B. E.; TAPPING, R. I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 4150-57, 2012.

HEMMI, H.; AKIRA, S. TLR signalling and the function of dendritic cells. **Chem Immunol Allergy**, v. 86, p. 120-35, 2005.

HIGGINS, D. M. et al. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 2, p. 149-57, Mar. 2009.

HOERL, A. E.; KENNARD, R. W. Ridge Regression. Applications to nonorthogonal problems. **Technometrics**, v.12, n. 1, p. 69-82, Feb. 1970.

HU, X. et al. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. **Immunity**, v. 24, n. 5, p. 563-74, May 2006.

HUANG, Y. et al. IRAK1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51697-703, Dec. 2004.

HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 15072-8, Dec. 1982.

HUSSAIN, R. et al. Quantitation of IgM antibodies to the *M. leprae* synthetic disaccharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 58, n. 3, p. 491-502, Sep. 1990.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **SÉRIES HISTÓRICAS E ESTATÍSTICAS, 2011**. [online] Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=7&op=0&vcodigo=PD292&t=grupos-idade>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

ITOH, K. et al. The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. **Cellular Immunology**, v. 157, n. 2, p. 478-88, Sep. 1994.

ITOH, K.; HIROHATA, S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 9, p. 4341-50, May 1995.

JADHAV, R. et al. Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e977, Mar. 2011.

JANEWAY, C.A, et al. **Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença**, 5^a ed, Editora Artmed, 2002.

JANG, S. et al. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3392-7, Sep 01 2004.

JAYAPAL, V. et al. Comparative study of anti-PGL-1, anti-35 kDa and anti-lipoarabinomannan assays for serodiagnosis of leprosy. **Indian Journal of Leprosy**, v. 73, n. 3, p. 229-37, Jul/Sep. 2001.

Jl, B. et al. Bactericidal activity of single dose of clarithromycin plus minocycline, with or without ofloxacin, against Mycobacterium leprae in patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2137-41, Sep. 1996.

JIMENEZ-DALMARONI, M. J.; GERSWHIN, M. E.; ADAMOPOULOS, I. E. The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 1, p. 1-8, Jan. 2016.

JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518-21, Mar. 2008.

JOHNSON, C. M. et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7520-4, Jun. 2007.

JOPLING, W. H. Reactions in leprosy. **Leprosy Review**, v. 41, n. 1, p. 62-3, Jan. 1970.

JOPLING, W. H.; McDOUGALL, A. C. **Manual de hanseníase**. 4a. ed. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 1991.

KAHAWITA, I. P.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 1, p. 75-82, Feb. 2008.

KANG, T. J. et al. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology**, v. 112, n. 4, p. 674-80, Aug. 2004.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 53-8, Jul. 2001.

KAPLAN, G. et al. Mycobacterium leprae antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. **Journal of Immunology**, v. 138, n. 9, p. 3028-34, May 1987.

KAR, B. R.; BABU, R. Methotrexate in resistant ENL. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 4, p. 480-2, Dec. 2004.

KATOCH, V. M.; SHARMA, V. D. Recent advances in the microbiology of leprosy. **Indian Journal of Leprosy**, v. 72, n. 3, p. 363-79, Jul/Sep. 2000.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317-37, Apr. 2009.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KIANI, A.; RAO, A.; ARAMBURU, J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. **Immunity**, v. 12, n. 4, p. 359-72, Apr. 2000.

KMENTA, J. **Elements of Econometrics**, New York, MacMillan Publishing Company, 1971. 655p.

KORDULAKOVA, J. et al. Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 31335-44, Aug. 2002.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara 2005/2006**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2005.

KOTENKO, S. V. et al. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. **THE EMBO JOURNAL**, v. 16, n. 19, p. 5894-903, Oct. 1997.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-32, May 2003.

KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 11, n. 6, p. 653-60, Jun. 2005.

KUMAR, B.; DOGRA, S.; KAUR, I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 2, p. 125-33, Jun. 2004.

KUMAR, R. H.; KUMAR, M. V.; THAPPA, D. M. Dapsone syndrome--a five year retrospective analysis. **Indian Journal of Leprosy**, v. 70, n. 3, p. 271-6, Jul/Sep. 1998.

LANGUILLON, J.; CARAYON, A. **Examens de laboratoire dans la lèpre**. In: Précis de Léprologie. 2^a. ed. Paris: Masson; 1986. p. 225-44.

- LASTORIA, J. C. et al. Índices baciloscópicos e morfológico na hanseníase após doze doses do esquema poliquimioterápico (PQT/OMS). **Hansenologia Internationalis.**, Bauru, v. 31, n. 1, 2006.
- LE GRAND, A. Women and leprosy: a review. **Leprosy Review**, v. 68, p. 203-211, 1997.
- LEVIS, W. R. et al. IgM and IgG antibodies to phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in leprosy: insight into patient monitoring, erythema nodosum leprosum, and bacillary persistence. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 86, n. 5, p. 529-34, May 1986.
- LEVY, Y.; BROUET, J. C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 424-8, Jan. 1994.
- LIBRATY, D. H. et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 336-41, Jan. 1997.
- LIENHARDT, C.; FINE, P. E. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? **Leprosy Review**, v. 65, n. 1, p. 9-33, Mar. 1994.
- LOCKWOOD, D. N. et al. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 61, n. 1, p. 8-15, Mar. 1993.
- LOCKWOOD, D. N. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. **Leprosy Review**, v. 67, n. 4, p. 253-9, Dec. 1996.
- LOCKWOOD, D. N.; COLSTON, M. J.; KHANOLKAR-YOUNG, S. R. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 409-15, Apr. 2002.
- LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **The Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S163-77, Nov. 2007.
- LYON, S. et al. Association of the ML Flow serological test with slit skin smear. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, supl 2, p. 23-6, 2008.
- LYONS, N. F. et al. Association of IgG and IgM antibodies to phenolic glycolipid-1 antigen of *Mycobacterium leprae* with disease parameters in multibacillary leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 59, n. 1, p. 45-52, Mar. 1988.
- MACHADO, P. et al. Production of host-protective (IFN-gamma), host-impairing (IL-10, IL-13) and inflammatory (TNF-alpha) cytokines by PBMC from leprosy patients stimulated with mycobacterial antigens. **European Journal of Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 98-103, Mar. 1998.
- MACKENZIE, K. F. et al. PGE₂ induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 565-77, Jan. 2013.

MACKENZIE, K. F.; PATTISON, M. J.; ARTHUR, J. S. Transcriptional regulation of IL-10 and its cell-specific role in vivo. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 4, p. 315-45, 2014.

MADAN, N. K.; AGARWAL, K.; CHANDER, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 371-82, Dec. 2011.

MALGORZEWICZ, S. et al. Complex interaction between the immune system and adipose tissue (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 1, p. 3-7, Jan. 2014.

MALHOTRA, D. et al. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. **Human Genetics**, v. 116, n. 5, p. 413-5, Apr. 2005.

MANANDHAR, R.; LEMASTER, J. W.; ROCHE, P. W. Risk factors for erythema nodosum leprosum. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 67, n. 3, p. 270-8, Sep. 1999.

MARLOWE, S. N. et al. Clinical outcomes in a randomized controlled study comparing azathioprine and prednisolone versus prednisolone alone in the treatment of severe leprosy type 1 reactions in Nepal. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 10, p. 602-9, Oct. 2004.

MARQUES, S. et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 120-9, Jul. 2013.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2655, Apr. 2014.

MARTINIUK, F. et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 626-30, May 2012.

MARTINOLI, C. et al. US and MR imaging of peripheral nerves in leprosy. **Skeletal Radiology**, v. 29, n. 3, p. 142-50, Mar. 2000.

MASTRANGELO, G. et al. Leprosy reactions: the effect of gender and household contacts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 92-6, Feb. 2011.

MATTOS, K. A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 3, p. 371-84, Mar 2010.

MATTOS, K. A. et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259-73, Feb. 2011.

- MATTOS, K. A. et al. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2548-58, Sep. 2011.
- MATTOS, K. A. et al. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in Mycobacterium leprae pathogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 156-66, Dec. 2012.
- MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. The 'short' history of regulatory B cells. **Trends Immunology**, v. 29, n. 1, p. 34-40, Jan. 2008
- MCDONALD, R. P. Path analysis with composite variables. **Multivariate Behavioral Research**, v. 31, n.2, p. 239-270, 1996.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C., JR. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-44, Aug. 2000.
- MEHRA, V. et al. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique M. leprae glycolipid. **Nature**, v. 308, n. 5955, p. 194-6, Mar. 1984.
- MEHRA, V.; MODLIN, R. L. T-lymphocytes in leprosy lesions. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 155, p. 97-109, 1990.
- MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 7-8, p. 1489-99, 2007.
- MELLETT, M. et al. Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 8, p. 4925-35, Apr. 2011.
- MENDES, T. et al. Strongyloidiasis Current Status with Emphasis in Diagnosis and Drug Research. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, p. 5056314, 2017.
- MERAZ, M. A. et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 431-42, Feb. 1996.
- MISCH, E. A. et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 5, p. e231, May 2008.
- MISRA, N. et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. **Immunology Letters**, v. 48, n. 2, p. 123-28, Dec. 1995.
- MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. **JAP, Journal Dermatology Urology** 1919; 19: 698-708 (Republicado em Inst Lepr 1953; 21: 347-58)
- MIZOGUCHI, A. et al. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 10, p. 1749-56, Nov. 1997.

- MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 48-54, Feb. 2010.
- MONTESTRUC, E. Reactions in arrested cases after BCG vaccination (letter). **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 28, p. 183-4, 1960.
- MONTGOMERY, D. C.; E. PECK, A. **Introduction to Linear Regression Analysis**. 2nd Ed. John Wiley & Sons, 1992.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORAES, M. O. et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 50, n. 5, p. 541-9, Nov. 1999.
- MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 417-26, Sep. 2004.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008.
- MOUBASHER, A. D. et al. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 10, p. 733-40, Oct 1998.
- MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41 Suppl 2, p. 11-8, 2008.
- NAAFS, B. Leprosy reactions. New knowledge. **Tropical Geography Medicine**, v. 46, n. 2, p. 80-4, 1994.
- NERY, J. A. C. et al. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Revista Instituto Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 40, n. 6, p. 363-70, Nov/Dec. 1998.
- NERY, J. A. C. Reação na Hanseníase: uma descrição epidemiológica [Tese]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 1995. p. 129.
- NETER, J.; KUTER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J; WASSERMAN, W. **Applied Linear Regression Models**. 3^a. ed. IRWIN, 1996.
- OCHOA, M. T. et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. **Nature Medicine**, v. 7, n. 2, p. 174-9, Feb. 2001.
- OLIVEIRA, A. L. et al. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprous neuropathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 69, n. 1, p. 27-39, Jan. 2010.

- OLIVEIRA, D. T. et al. Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 600-4, Sep/Oct. 2013.
- OLIVEIRA, M. H. P.; ROMANELLI, G. [The effects of Leprosy on men and women: a gender study]. **Cadernos de Saude Publica**, v. 14, n. 1, p. 51-60, Apr. 1998.
- OLIVEIRA, R. M. et al. Synergistic antigen combinations for the development of interferon gamma release assays for paucibacillary leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1415-24, Aug. 2014.
- OLSSON, M. L. et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1585-93, Sep. 01 2001.
- OPROMOLLA, D. V. A. **Recidiva ou reação reversa**: Hansenologia Internationalis, v. 19, n.1, p. 10-16, 1994.
- OPROMOLLA, D.V.A. **Manifestações clínicas e reações**. In: OPROMOLLA, D. V. A, editor. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato : 2000, p. 51-8.
- OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13766-71, Dec. 05 2000
- PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a016246, Oct. 2014.
- PANNIKAR, V. et al. Relapse or late reversal reaction? **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 57, n. 2, p. 526-8, Jun. 1989.
- PARKASH, O. et al. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 57, n. Pt 1, p. 130-2, Jan. 2008.
- PFALTZGRAFF, R. E.; RAMU, G. **Clinical leprosy**. In: Hasting RC (ed). Leprosy, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; p. 237-87, 1994.
- PFALTZGRAFF, R. E; BRYCESON, A. **Clinical leprosy**. In: HASTING RC, ed. Leprosy, Churchill Livingstone, New York, p.134-176, 1985.
- PINHO, J. R. R; ANDRADE JUNIOR, H. F; SCHENBERG, A. C. Os diferentes testes cutâneos existentes para acompanhamento de pacientes com hanseníase [Different cutaneous tests for follow-up of leprosy patients]. **Hansenologia Internationalis**, v. 23, 1998, p. 49-52.
- PINQUIER, L.; GROUPE D'HISTOPATHOLOGIE CUTANEE DE SOCIETE FRANCAISE DE, D. [Histopathology of leprosy]. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, v. 138, n. 11, p. 777-81, Nov. 2011.

PIRIS, A.; LOBO, A. Z.; MOSCHELLA, S. L. Global dermatopathology: Hansen's disease--current concepts and challenges. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 37 Suppl 1, p. 125-36, Apr. 2010.

POCATERRA, L. et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 5, p. 868-79, May 2006.

RADOMSKY, C. L.; LEVINE, N. Thalidomide. **Dermatologic Clinics**, v. 19, n. 1, p. 87-103, Jan. 2001.

RANDHAWA, A. K. et al. Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 8, p. e1002174, Aug. 2011.

RANOVA, D. R.; KELLEY, S. L.; TAPPING, R. I. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 14, p. 9729-41, Apr. 2013.

RE, F.; STROMINGER, J. L. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 12, p. 7548-55, Dec. 2004.

REA, T. H. Decreases in mean hemoglobin and serum albumin values in erythema nodosum leprosum and lepromatous leprosy. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 69, n. 4, p. 318-27, Dec. 2001.

REA, T. H. Elevated platelet counts and thrombocytosis in erythema nodosum leprosum. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 70, n. 3, p. 167-73, Sep. 2002.

REA, T. H.; MODLIN, R. L. Leprosy. **Immunology Series**, v. 46, p. 723-45, 1989.

REES, R. F. W, YONG D.B. **The microbiology of leprosy**. In: Hastings RC. Leprosy. 2th Edinbough: Churchil Livingstone; 1994. p. 49-83.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. A classification of leprosy for research purposes. **Leprosy Review**, v. 33, p. 119-28, Apr. 1962.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul/Sep. 1966.

RIDLEY, D. S.; RADIA, K. B. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 49, n. 4, p. 383-92, Dec. 1981.

ROCHE, P. W.; THEUVENET, W. J.; BRITTON, W. J. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. **Lancet**, v. 338, n. 8768, p. 654-7, Sep. 1991.

RODRIGUES, A.L.P, et al. Ocorrência de reações em pacientes pós-alta por cura de hanseníase: subsídios para implementação de um programa de atenção específica. **Hansenologia Internationalis**, v. 25, p. 7-16, 2000.

ROEDER, A. et al. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 485-98, Dec. 2004.

ROJAS, R. E. et al. IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10-kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 65-74, Sep. 1997.

SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004338, Jan 2016.

SADHU, S. K.; PANJA, R. K. Subpolar tuberculoid leprosy. **Indian Journal of Leprosy**, v. 59, n. 3, p. 263-71, Jul/Sep. 1987.

SAINI, C. et al. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF-beta and Increase in IL-6. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004592, Apr. 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SALAZAR-MATHER, T. P.; HAMILTON, T. A.; BIRON, C. A. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 7, p. 985-93, Apr. 2000.

SAMARASINGHE, R. et al. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 26, n. 12, p. 893-900, Dec. 2006.

SANABRIA NEGRIN, J. G. et al. [Subpolar lepromatous leprosy. A histological and ultrastructural study of a case]. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 89-96, May/Aug. 1979.

SANIN, D. E.; PRENDERGAST, C. T.; MOUNTFORD, A. P. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. **Journal of Immunology**, v. 195, n. 3, p. 1218-32, Aug. 2015.

SANTOS, D. O. et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 75-80, Jan. 2007.

SARAAV, I.; SINGH, S.; SHARMA, S. Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 9, p. 741-6, Oct. 2014.

SATOH, T.; AKIRA, S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins.

Microbiology Spectrum, v. 4, n. 6, Dec. 2016.

SAUNDERSON, P. et al. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risk factors and outcome. **Leprosy Review**, v. 71, n. 3, p. 285-308, Sep. 2000.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-89, Feb. 2004.

SCHROEDER, H. W., JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-52, Feb. 2010.

SCHURING, R. P. et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 12, p. 1816-9, Jun. 2009.

SCOLLARD, D. M. et al. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 62, n. 4, p. 559-67, Dec. 1994.

SCOLLARD, D. M. et al. Risk factors for leprosy reactions in three endemic countries. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 108-14, Jan. 2015.

SCOLLARD, D. M.; JOYCE, M. P.; GILLIS, T. P. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 2, p. e19-22, Jul. 2006.

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 46-54, Jan/Feb. 2015.

SEHGAL, V. N.; BHATTACHARYA, S. N.; JAIN, S. Relapse or late reversal reaction? **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 58, n. 1, p. 118-21, Mar. 1990.

SEKI, S. et al. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5286-94, Nov. 1998.

SHEPARD, C. C. The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 112, n. 3, p. 445-54, Sep. 1960.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 3, p. 151-61, Mar. 2002.

- SHULMAN, D. G.; WILKINSON, R. D.; NGUYEN, N. Leprosy downgrading reaction associated with griseofulvin. **Archives of Dermatology**, v. 118, n. 11, p. 909-12, Nov. 1982.
- SIBLEY, L. D. et al. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1232-6, May 1988.
- SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; KRAHENBUHL, J. L. Inhibition of interferon-gamma-mediated activation in mouse macrophages treated with lipoarabinomannan. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 80, n. 1, p. 141-8, Apr. 1990.
- SIELING, P. A. et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. **Science**, v. 269, n. 5221, p. 227-30, Jul. 1995.
- SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Regulation of cytokine patterns in leprosy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, p. 42-52, Aug. 1994.
- SILVA, E. A. et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 12, p. 1450-8, Dec. 2007.
- SILVA, I. M. et al. Agranulocytosis induced by multidrug therapy in leprosy treatment: a case report. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 158-60, Apr. 2009.
- SILVA, L. M. et al. Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NF kappa B (p65), AP-1 (c-Fos and c-Jun), and JAK/STAT in leprosy. **Human Pathology**, v. 46, n. 5, p. 746-52, May 2015.
- SINGH, R. K.; CHAUDHARY, B. D. **Biometrical methods in quantitative genetic analysis**. New Delhi: Kalyani Publishers, 1979, p.210-214.
- SIWAKOTI, S. et al. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) with Slit Skin Smear Examination (SSS) to Confirm Clinical Diagnosis of Leprosy in Eastern Nepal. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005220, Dec. 2016.
- SMITH, W. C. et al. Predicting neuropathy and reactions in leprosy at diagnosis and before incident events-results from the INFIR cohort study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e500, Aug. 2009.
- SOUSA, A. L. et al. Mycobacterium leprae DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 829-33, Nov. 2007.
- SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**, 30: 325-334, jul./set. 1997.
- SPENCER, J. S. et al. Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 260-7, Feb. 2011.

SPITTLER, A. et al. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. **Immunology**, v. 85, n. 2, p. 311-7, Jun. 1995.

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.

STAGE, F. K.; CARTER, H. C.; NORA, A. Path analysis: An introduction and analysis of a decade of research. **The Journal of Educational Research**, v. 98, n. 1, p. 5-12, 2004..

STEFANI, M. M. et al. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 66, n. 3, p. 356-64, Sep. 1998.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 75, May 27 2009.

STIRLING, D.; SHERMAN, M.; STRAUSS, S. Thalidomide. A surprising recovery. **J American Pharmacology Association (Wash)**, v. NS37, n. 3, p. 306-13. May/June 1997.

SUCHONWANIT, P. et al. Leprosy Reaction in Thai Population: A 20-Year Retrospective Study. **Dermatology Research and Practice**, v. 2015, p. 2531-54, 2015.

SURYADEVARA, N. C. et al. Influence of Intron II microsatellite polymorphism in human toll-like receptor 2 gene in leprosy. **Human Immunology**, v. 74, n. 8, p. 1034-40, Aug. 2013.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. [Role of toll-like receptor in innate immunity]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 47, n. 16 Suppl, p. 2097-102, Dec. 2002.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAKEUCHI, O. et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 10-4, Jul 01 2002.

TAPPING, R. I.; TOBIAS, P. S. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 264-8, 2003.

TAWATA, M.; AIDA, K.; ONAYA, T. Screening for genetic mutations. A review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 3, n. 1, p. 1-9, Feb. 2000.

TEIXEIRA, M. A. et al. [NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 281-6, May/June 2010.

- TEIXEIRA, M. A.; SILVEIRA, V. M.; FRANCA, E. R. [Characteristics of leprosy reactions in paucibacillary and multibacillary individuals attended at two reference centers in Recife, Pernambuco]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 287-92, May/Jun. 2010.
- TEIXEIRA-COELHO, M. et al. Differential post-transcriptional regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 3, p. 856-66, Mar. 2014.
- THANGARAJ, H. S. et al. Identification, sequencing, and expression of *Mycobacterium leprae* superoxide dismutase, a major antigen. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1937-42, Jun. 1990.
- THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 291, n. 5508, p. 1544-7, Feb. 2001.
- TOMIMORI-YAMASHITA, J. et al. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anti-PGL-I specific circulating immune complex in leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 70, n. 3, p. 261-71, Sep. 1999.
- TING, L. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3898-906, Oct. 01 1999.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4008-27, Dec. 1994.
- TRINDADE, M. A. B, NEMES, M.I.B. Incapacidades físicas em hanseníase no momento do diagnóstico: características epidemiológicas dos casos registrados de 1983 a 1988 no Estado de São Paulo. **Hansenologia Internationalis**, v.17, p. 8-14, 1992.
- TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 69, n. 1, p. 1-12, Mar. 2001.
- TSENG, S. et al. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 6, p. 969-79, Dec. 1996.
- UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811-5, Oct. 1999.
- VAN BEERS, S. M.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, n. 3, p. 221-30, Mar. 1996.
- VAN BRAKEL, W. et al. Review of leprosy research evidence (2002-2009) and implications for current policy and practice. **Leprosy Review**, v. 81, n. 3, p. 228-75, Sep. 2010.

VAN BRAKEL, W. H. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. **Leprosy Review**, v. 71 Suppl, p. S146-53, Dec. 2000.

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B.; LUCAS, S. B. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. **Leprosy Review**, v. 65, n. 3, p. 190-203, Sep. 1994.

VAN DER VELDEN, V. H. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 4, p. 229-37, 1998.

VAN DER VLIET, G.M. et al. Use of NASBA RNA amplification for detection of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies from untreated and treated leprosy patients. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**. v. 64, n.4, p. 396-403, Dec. 1996.

VASCONCELOS, L. R. et al. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. **Int The Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e551-7, Aug. 2011.

VERAS, L. S. et al. Electromyography function, disability degree, and pain in leprosy patients undergoing neural mobilization treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 83-8, Feb. 2012.

VERHAGEN, C. et al. Immunohistological analysis of in situ expression of mycobacterial antigens in skin lesions of leprosy patients across the histopathological spectrum. Association of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-I (PGL-I) with leprosy reactions. **The American Journal of Pathology**, v. 154, n. 6, p. 1793-804, Jun. 1999.

VERMA, R. et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 1, p. 61-7, Mar. 2016.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 15, p. 1140-4, Apr. 2001.

WAN, Y. Y. Multi-tasking of helper T cells. **Immunology**, v. 130, n. 2, p. 166-71, Jun. 2010.

WATERHOUSE, N. J. et al. Cytotoxic lymphocytes; instigators of dramatic target cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 1033-40, Sep. 2004.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD Relevé épidémiologique hebdomadaire 2 SEPTEMBER 2016, 91th YEAR / 2 SEPTEMBRE 2016, 91e ANNÉE No 35, 2016, 91, 405-420.

WEMAMBU, S. N. et al. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. **Lancet**, v. 2, n. 7627, p. 933-5, Nov. 1969.

WILKINSON, R. J.; LOCKWOOD, D. N. Antigenic trigger for type 1 reaction in leprosy. **The Journal of Infection**, v. 50, n. 3, p. 242-3, Apr. 2005.

WONG, S. H. et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **Plos Pathogens**, v. 6, p. e1000979, Jul. 2010.

WRIGHT, S. Correlation and Causation. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, n.7, p. 557-585, Jan. 1921.

WU, J. J. et al. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects. **The British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 2, p. 254-73, Aug. 2005.

YAMAMURA, M. et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, p. 1470-5, Aug. 1992.

YAWALKAR, S. J.; VISCHER, W. Lamprene (clofazimine) in leprosy. Basic information. **Leprosy Review**, v. 50, n. 2, p. 135-44, Jun. 1979.

YOUNG, D. B. et al. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of Mycobacterium leprae. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 149, n. 6, p. 870-3, Jun. 1984.

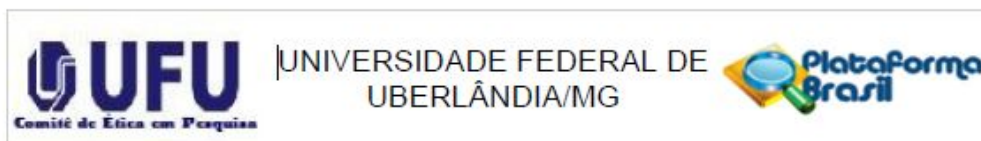
YOUNG, H. A. Regulation of interferon-gamma gene expression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 16, n. 8, p. 563-8, Aug. 1996.

ZENHA, E.M.R.; FERREIRA, M.A.N.; FOSS, N.T. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 10, p. 968-972, Oct. 2009.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 285-90, Jul. 2003.

ZUIDEMA, J.; HILBERS-MODDERMAN, E. S.; MERKUS, F. W. Clinical pharmacokinetics of dapsone. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 11, n. 4, p. 299-315, Jul/Aug. 1986.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOMARCADORES DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E DE LESÕES TECIDUAIS: Identificação bioquímica, molecular e expressão de citocinas nas reações hansênicas durante e após o tratamento

Pesquisador: ISABELA MARIA BERNARDES GOULART

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 13387613.5.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 633.052

Data da Relatoria: 07/03/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional, transversal, que procura correlacionar reações hansênicas a biomarcadores de atividade inflamatória (PCR*, Citocinas e VHS) e enzimas marcadoras de lesão tecidual (TGO, TGP, CK, CK -MB, GGT, FA, amilase, lipase).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a correlação entre as enzimas bioquímicas marcadoras de lesão tecidual e expressão de citocinas inflamatórias específicas para determinado dano E as reações hansênicas do tipo 1 e/ou tipo 2 durante e/ou após tratamento indicando potencial risco de dano celular após evento clínico reacional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos menores relacionados às punções venosas para coleta de amostras sanguíneas.

Benefícios: Subsídios para elaboração de protocolos assistenciais nos manejos dos estados reacionais do tipo 1 e tipo 2, visto que, se trata de um estudo que levantará fatores preditivos para ocorrência de reações hansênicas e efeito das reações hansênicas sobre os tecidos humanos, identificando grupos de risco para ocorrência destes eventos agindo, portanto em tempo hábil

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 633.052

evitando incapacidades físicas decorrentes dos surtos reacionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo o projeto, será realizado um estudo observacional do tipo transversal, no CREDESH (Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase) no período de 2013 até 2015, cuja a amostra será composta pelos pacientes em tratamento para hanseníase neste período estipulado, o qual será coletado soro dos pacientes juntamente com os exames de rotina que avaliem o dano tecidual no diagnóstico, alta e nas reações hansênicas (enzimas marcadoras de necrose/lesão tecidual e marcadores de atividade inflamatória como PCR e VHS) permitindo avaliar quais enzimas estarão alteradas indicando possível dano tecidual permitindo analisar a predição do risco para ocorrência de reações hansênicas, favorecendo a ação da equipe em tempo hábil evitando o surgimento de incapacidades físicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos estão adequados. Foi efetuada a correção no TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam a todas as pendências solicitadas no parecer consubstanciado no. 529.147 de 13 de fevereiro de 2014.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: junho de 2015.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 633.052

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: junho de 2016.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 633.052

UBERLANDIA, 01 de Maio de 2014

Assinador por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

ANEXO B - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL TLRI ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO REACIONAL)

Programa GENES	DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
Dimensão da matriz	17
Data	07-27-2016

VARIÁVEIS SELECIONADAS: IB - N° de Nervos Acometidos -

MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1.	.4014
.4014	1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Nú

mero de correlações pesquisadas : 1

Maior correlação : 0.4014491 variáveis : IB e N° de Nervos Acometidos

Menor correlação : 0.4014491 variáveis : IB e N° de Nervos Acometidos

Número de correlações igual (ou maior) que abs (0.80) : 0

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Diagonal	Elemento da Inversa (r)
----------	-------------------------

1	1.192124
2	1.192124

Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 0

AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
-------	-------------

1	1.401449
2	.598551

Número de Condição (Max/Min): 2.341403

Colinearidade fraca

Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)

Número de condição (NC) Multicolinaridade

NC < 100 Fraca (Não constitui problema sério)

100 < NC < 1000 Moderada a forte

> 1000 Severa

Determinante da Matriz: .838839

AUTOVETORES DA MATRIZ

.7071	.7071
-.7071	.7071

ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES

IB - IB -

DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIFk
-------	----------------	--------------------	------

1	1.183828	1.000000	1.192124
2	.773661	1.530164	1.192124

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade

Índice de condição elevado indica colinearidade

PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

V(β_1)	V(β_2)
----------------	----------------

u 1 =>	.299275	.299275
--------	---------	---------

u 2 =>	.700725	.700725
--------	---------	---------

u_i : i-ésimo valor singular

V(β_i) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

ANEXO C - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL TLR2 ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO REACIONAL)

Programa GENES DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
Dimensão da matriz 17
Data 07-26-2016

VARIÁVEIS SELECIONADAS : N° de Lesões Cutâneas - anti-LAM - anti-PGL-1 – anti-Peptídeo 14 -
MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1.	.4938	.4441	.3085
.4938	1.	.0347	.8533
.4441	.0347	1.	.1139
.3085	.8533	.1139	1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Número de correlações pesquisadas : 6
Maior correlação : 0.8532985 variáveis : anti-LAM e x13
Menor correlação : 0.03473654 variáveis : anti-LAM e anti-PGL-1
Número de correlações igual (ou maior) que abs(0.80) : 1

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Diagonal	Elemento da Inversa (r)
1	2.041488
2	5.603276
3	1.488578
4	4.422770

Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 0
AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
1	2.213357
2	1.177550
3	.512025
4	.097068

Número de Condição (Max/Min): 22.802133
Colinearidade fraca
Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)
Número de condição (NC) Multicolinaridade
NC < 100 Fraca (Não constitui problema sério)
100 < NC < 1000 Moderada a forte
> 1000 Severa

Determinante da Matriz: .129538

 AUTOVETORES DA MATRIZ

.4855	.6093	.2491	.5753
.4225	-.3274	.772	-.3441
.7136	.0584	-.5547	-.4238
.2767	-.7198	-.1853	.6091

 ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES

 anti-LAM - N° de Lesões Cutâneas - anti-PGL-1 - anti-LAM -

 DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIF _k
1	1.487736	1.000000	2.041488
2	1.085150	1.370996	5.603276
3	.715559	2.079123	1.488578
4	.311557	4.775158	4.422770

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade

Índice de condição elevado indica colinearidade

 PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

 V(β₁) V(β₂) V(β₃) V(β₄)

u 1 =>	.052156	.029936	.018840	.033812
u 2 =>	.074252	.016245	.339975	.022730
u 3 =>	.487196	.001190	.403671	.079330
u 4 =>	.386396	.952629	.237513	.864127

 u_i : i-ésimo valor singular V(β_i) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

ANEXO D - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL IL-10 ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO REACIONAL)

Programa GENES	DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
Arquivo de dados	
Dimensão da matriz	17
Data	07-26-2016

VARIÁVEIS SELECIONADAS: N° de Nervos Acometidos - N° de Lesões Cutâneas - anti-LAM - anti-PGL-1 -
MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1.	.3487	.1063	.4983
.3487	1.	.4938	.4441
.1063	.4938	1.	.0347
.4983	.4441	.0347	1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Número de correlações pesquisadas : 6
 Maior correlação : 0.4983431 variáveis : N° de Nervos Acometidos e anti-PGL-1
 Menor correlação : 0.03473654 variáveis : anti-LAM e anti-PGL-1
 Número de correlações igual (ou maior) que abs(0.80) : 0

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Diagonal	Elemento da Inversa (r)
----------	-------------------------

1	1.367605
2	1.773197
3	1.401653
4	1.575106

Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 0
 AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
-------	-------------

1	2.000380
2	1.109213
3	.542184
4	.348223

Número de Condição (Max/Min): 5.744543

Colinearidade fraca

Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)

Número de condição (NC)	Multicolaridade
-------------------------	-----------------

NC < 100	Fraca (Não constitui problema sério)
100 < NC < 1000	Moderada a forte
> 1000	Severa

Determinante da Matriz: .418920

AUTOVETORES DA MATRIZ

.5031 .5857 .3608 .5232
 -.4023 .2833 .7477 -.4459
 -.7545 .3512 -.2415 .4989
 .1253 .6733 -.5024 -.5278

ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES

Nº de Lesões Cutâneas - Nº de Nervos Acometidos - anti-LAM - Nº de Lesões Cutâneas -

DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIFk
1	1.414348	1.000000	1.367605
2	1.053192	1.342916	1.773197
3	.736332	1.920803	1.401653
4	.590104	2.396778	1.575106

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade
 Índice de condição elevado indica colinearidade

PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

	V(B1)	V(B2)	V(B3)	V(B4)
u 1 =>	.092519	.096712	.046417	.086866
u 2 =>	.106699	.040810	.359584	.113797
u 3 =>	.767827	.128326	.076775	.291502
u 4 =>	.032955	.734152	.517223	.507835

ui : i-ésimo valor singular

V(Bi) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

ANEXO E - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL IL-10 ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO REAÇÃO TIPO 1)

Programa GENES DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
Dimensão da matriz 17
Data 09-30-2016

VARIÁVEIS SELECIONADAS : TLR2 - NLAfet - ANTI PGL -
MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1.	.8245	.9694
.8245	1.	.8388
.9694	.8388	1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Número de correlações pesquisadas : 3
Maior correlação : 0.969435 variáveis : TLR2 e ANTI PGL
Menor correlação : 0.8244988 variáveis : TLR2 e NLAfet
Número de correlações igual (ou maior) que abs(0.80) : 3

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Diagonal	Elemento da Inversa (r)
1	16.733193
2	3.397974
3	18.074973

Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 2

AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
1	2.756820
2	.213013
3	.030167

Número de Condição (Max/Min): 91.385426
Colinearidade fraca
Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)
Número de condição (NC) Multicolaridade
NC < 100 Fraca (Não constitui problema sério)
100 < NC < 1000 Moderada a forte
> 1000 Severa
Determinante da Matriz: .017715

AUTOVETORES DA MATRIZ

.5861 .5563 .589
 -.4255 .83 -.3605
 -.6895 -.0393 .7232

ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES
 ANTI PGL - NLAFET - ANTI PGL -

DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIF _k
1	1.660367	1.000000	16.733193
2	.461533	3.597503	3.397974
3	.173686	9.559572	18.074973

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade Índice de condição elevado indica colinearidade
 PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

V(B1) V(B2) V(B3)

u 1 => .007447 .033038 .006963
 u 2 => .050799 .951858 .033755
 u 3 => .941753 .015104 .959282

u_i : i-ésimo valor singular

V(B_i) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

ANEXO F - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL IL-10 ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO REAÇÃO TIPO 2)

Programa GENES	DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
Dimensão da matriz	17
Data	09-30-2016

VARIÁVEIS SELECIONADAS : TLR2 - ANTI LAM - MATRIZ DE
CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1. .9265
.9265 1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Número de correlações pesquisadas : 1
 Maior correlação : 0.9265212 variáveis : TLR2 e ANTI LAM
 Menor correlação : 0.9265212 variáveis : TLR2 e ANTI LAM
 Número de correlações igual (ou maior) que abs(0.80) : 1

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Diagonal	Elemento da Inversa (r)
1	7.064219
2	7.064219

Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 0

AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
1	1.926521
2	.073479

Número de Condição (Max/Min): 26.218735
 Colinearidade fraca
 Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)
 Número de condição (NC) Multicolinaridade
 NC < 100 Fraca (Não constitui problema sério)
 100 < NC < 1000 Moderada a forte
 > 1000 Severa

Determinante da Matriz: .141558

AUTOVETORES DA MATRIZ

.7071 .7071
 -.7071 .7071

ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES
 TLR2 - TLR2 -

DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIF _k
1	1.387992	1.000000	7.064219
2	.271070	5.120423	7.064219

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade
 Índice de condição elevado indica colinearidade

PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

	V(β_1)	V(β_2)
u 1 =>	.036739	.036739
u 2 =>	.963261	.963261

u_i : i-ésimo valor singular

V(β_i) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

ANEXO G - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL IFN- γ ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO NÃO REACIONAL)

Programa GENES DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
 Dimensão da matriz 17
 Data 08-02-2016

VARIÁVEIS SELECIONADAS: TLR1 - TLR2 -
 MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1. .8735
 .8735 1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Número de correlações pesquisadas : 1
 Maior correlação : 0.8735323 variáveis : TLR1 e TLR2
 Menor correlação : 0.8735323 variáveis : TLR1 e TLR2
 Número de correlações igual (ou maior) que abs (0.80) : 1

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Diagonal	Elemento da Inversa (r)
1	4.220454
2	4.220454

Número de VIF's maior ou igual a abs (10) : 0

AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
1	1.873532
2	.126468

Número de Condição (Max/Min): 14.814315

Colinearidade fraca

Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)

Número de condição (NC)	Multicolinaridade
NC < 100	Fraca (Não constitui problema sério)
100 < NC < 1000	Moderada a forte
> 1000	Severa

Determinante da Matriz: .236941

 AUTOVETORES DA MATRIZ

.7071 .7071
 -.7071 .7071

 ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES
 TLR1 - TLR1 -

 DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIFk
1	1.368770	1.000000	4.220454
2	.355623	3.848937	4.220454

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade
 Índice de condição elevado indica colinearidade

 PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

V(β_1) V(β_2)

u 1 => .063234 .063234
 u 2 => .936766 .936766

u_i : i-ésimo valor singular

V(β_i) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

ANEXO H - DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE VARIÁVEL QUANTIDADE DE LESÕES CUTÂNEAS ANÁLISE DE TRILHA (GRUPO NÃO REACIONAL - MULTIBACILAR)

Programa GENES DIAGNÓSTICO DE MULTICOLINEARIDADE
 Arquivo de dados c:\dados\MB trilharfe.dat
 Dimensão da matriz 16
 Data 03-07-2017

VARIÁVEIS SELECIONADAS : IL-4 - IB - PGL-1 -

MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS SELECIONADAS

1.	.5694	.6363
.5694	1.	.7254
.6363	.7254	1.

ANÁLISE DESCRITIVA DAS CORRELAÇÕES

Número de correlações pesquisadas : 3
 Maior correlação : 0.725432081 variáveis : IB e PGL-1
 Menor correlação : 0.56936646 variáveis : IL-4 e IB
 Número de correlações igual (ou maior) que abs(0.80) : 0

FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)

Elemento da Inversa (r)

Diagonal

1	1.752660
2	2.201474
3	2.500243

Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 0

AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO

Ordem	Autovalores
-------	-------------

1	2.289572
2	.445319
3	.265109

Número de Condição

(Max/Min): 8.636342

Colinearidade fraca

Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)

Número de condição (NC) Multicolinaridade

NC < 100 Fraca (Não constitui problema sério)

100 < NC < 1000 Moderada a forte

> 1000 Severa

Determinante da Matriz: .270302

AUTOVETORES DA MATRIZ

.5518	.5805	.5988
.811	-.541	-.2229
-.1946	-.6086	.7693

ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES
PGL-1 - IL-4 - PGL-1 -

DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES

Ordem	Valor Singular	Índice de Condição	VIF _k
1	1.513133	1.000000	1.752660
2	.667322	2.267470	2.201474
3	.514887	2.938765	2.500243

(*) Valores singulares pequenos indicam colinearidade
Índice de condição elevado indica colinearidade

PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA

	V(β ₁)	V(β ₂)	V(β ₃)
u 1 =>	.075872	.066850	.062640
u 2 =>	.842643	.298520	.044608
u 3 =>	.081485	.634630	.892751

singular

V(β_i) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão

u_i : i-ésimo valor

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa chamada “*BIOMARCADORES DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E DE LESÕES TECIDUAIS: Identificação bioquímica, molecular e expressão de citocinas nas reações hansênicas durante e após o tratamento*”, com os objetivos ver o que acontece no seu corpo no início do tratamento e depois que aparecem as dores nos nervos e o aumento das manchas; e se além das dores e manchas ocorre alguma outra mudança no seu corpo.

E para descobrir o que acontece no seu corpo eu preciso coletar três tubos de sangue de sua veia, assim você ficará sentado com o braço apoiado para que seja retirado o material que será enviado para o laboratório verificando posteriormente se existe algo diferente no seu sangue que possa mostrar alteração em algum órgão do seu corpo, sendo que se for necessário, depois em consulta com médico será passado ao senhor (a) o resultado deste exame.

Essa pesquisa também buscará ajudá-lo para que possamos melhorar o atendimento no serviço e tratá-lo no momento certo evitando o aparecimento de problemas no nervo e feridas na pele.

O risco que você poderá ter ao ser submetido à coleta de sangue será o surgimento de uma mancha azul arroxeadada no local da retirada de sangue com agulha, que desaparecerá com o tempo.

Os seus dados pessoais como nome, idade e outros será mantido em sigilo. Você poderá desistir da pesquisa a qualquer momento, mas lembre-se, você não terá nenhum gasto para participar da pesquisa e também não terá ganhos financeiros ou qualquer tipo de remuneração como condição para colaborar com esta pesquisa.

Uma via original deste documento ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com Isabela Maria Bernardes Goulart e/ ou Douglas Eulálio Antunes através do telefone: 3216-7872 ou no endereço: CREDESH/UFU: Av. Aspirante Mega, 77 – Bairro Jaraguá, Uberlândia.

Uberlândia, ____ de _____ de 20____

Eu aceito participar da pesquisa explicada acima, por minha vontade, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

Douglas Eulálio Antunes

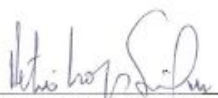
Isabela Maria Bernardes Goulart

APÊNDICE B – DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE**Declaração da Instituição Co-Participante**

Declaro estar ciente de que o projeto de pesquisa intitulado “MARCADORES DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E DE LESÕES TECIDUAIS: Identificação bioquímica e molecular de enzimas tecido-específicas como potenciais fatores preditivos para reações hansênicas durante e após o tratamento”, será avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa e declaro concordar com o parecer ético emitido por este CEP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileira, em especial a resolução CNS 196/96. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades neste projeto de pesquisa, e de seu compromisso no bem estar do paciente.

Autorizo os pesquisadores Prof^ª. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart e Douglas Eulálio Antunes a realizarem as etapas de pesquisa bibliográfica e coleta de dados pela análise de prontuários e avaliação da bioquímica sanguínea dos pacientes (já coletados de rotina no serviço de hansenologia), utilizando assim da infra-estrutura da instituição.

Uberlândia, 26 de 02 de 20 13.



Dr. Hélio Lopes da Silveira
Diretor do HC-UFU

Hospital de Clínicas de Uberlândia
Prof. Hélio Lopes da Silveira
Diretor Clínico
CRM-MG 7681 – CPF: 203.661.166-49

APÊNDICE C – RESULTADOS COMPLEMENTARES COM TABELAS DE CORRELAÇÕES SIMPLES E PARCIAIS, ANÁLISES DE TRILHA E GRÁFICOS DOS DIAGRAMAS DE TRILHA NO GRUPO REACIONAL NÃO EXTRATIFICADO

Tabela A - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica (interleucina 10) e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), Uberlândia, 2017

Variáveis	<i>Reacionais</i>					
	<i>Correlação Simples e Parcial (Variável Básica IL-10)</i>					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.234}$	0,62	34,4%	0,018	0,52	27,4%	0,094
$r_{02.134}$	0,69	47,6%	0,005	0,38	14,4%	0,242
$r_{03.124}$	0,55	30,2%	0,043	0,68	46,2%	0,019
$r_{04.123}$	0,70	49,1%	0,004	0,73	53,2%	0,009

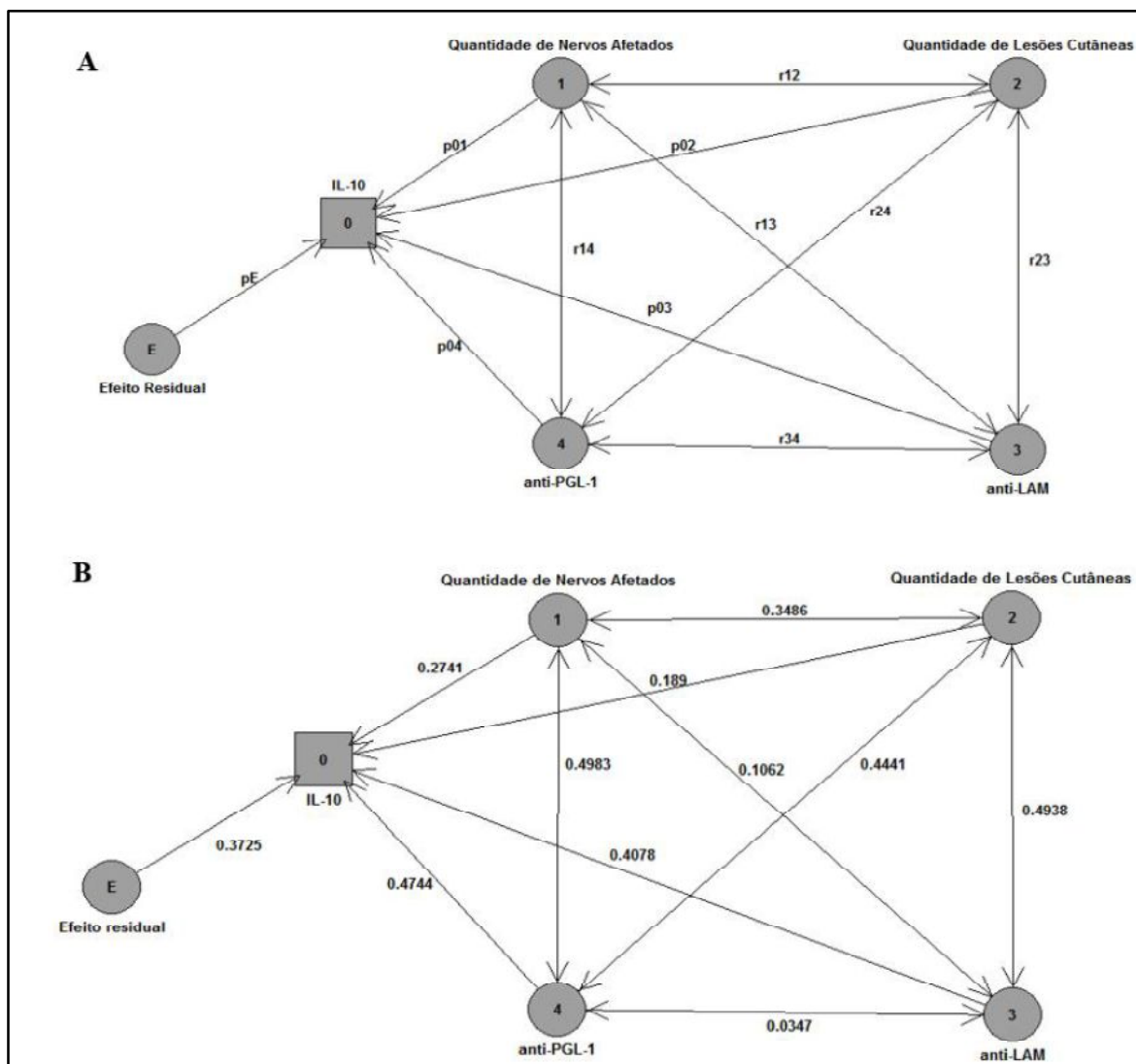
Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial; IL-10: Interleucina 10; 0 (variável básica): Interleucina 10; 1: quantidade de Nervos afetados no diagnóstico ; 2: quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico; 3: anti-LAM; 4: anti-PGL-1; interpreta-se: $r_{01.234}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1 isolando o efeito das variáveis 2, 3 e 4 (mesma regra para demais combinações da correlação parcial).

Tabela B - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica (Interleucina 10) no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), Uberlândia, 2017

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Vias de associação</i>	<i>Estimador</i>	<i>Estimativa</i>
Quantidade de Nervos Afetados	Efeito direto sobre IL-10	p_{01}	0,274
	Efeito indireto via Quantidade de Lesões Cutâneas	$p_{02} r_{12}$	0,066
	Efeito indireto via anti-LAM	$p_{03} r_{13}$	0,043
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{04} r_{14}$	0,236
	Efeito total	r_{01}	0,619
Quantidade de lesões cutâneas	Efeito direto sobre IL-10	p_{02}	0,189
	Efeito indireto via Número de Nervos Afetados	$p_{01} r_{12}$	0,096
	Efeito indireto via anti-LAM	$p_{03} r_{23}$	0,201
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{04} r_{24}$	0,211
	Efeito total	r_{02}	0,697
anti-LAM	Efeito direto sobre IL-10	p_{03}	0,408
	Efeito indireto via Número de Nervos Afetados	$p_{01} r_{13}$	0,029
	Efeito indireto via Quantidade de Lesões Cutâneas	$p_{02} r_{23}$	0,093
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{04} r_{34}$	0,016
	Efeito total	r_{03}	0,547
anti-PGL-1	Efeito direto sobre IL-10	p_{04}	0,474
	Efeito indireto via Número de Nervos Afetados	$p_{01} r_{14}$	0,137
	Efeito indireto via Quantidade de Lesões Cutâneas	$p_{02} r_{24}$	0,084
	Efeito indireto via anti-LAM	$p_{03} r_{34}$	0,014
	Efeito total	r_{04}	0,709
$R^2_{0.1234}$			0,861
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,373

Nota: IL-10: Interleucina 10 $R^2_{0.1234}$: coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; 0 (variável básica): Interleucina 10; 1: quantidade de Nervos afetados no diagnóstico; 2: Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico; 3: anti-LAM; 4: anti-PGL-1(diagnóstico); interpreta-se: p_{01} (efeito direto da Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico sobre Interleucina 10); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto da Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico via Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico sobre Interleucina 10, obtido multiplicando-se o efeito direto do Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico sobre Interleucina 10 (p_{02}) pela correlação entre Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico e o Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico (r_{12}); r_{01} : correlação entre Interleucina 10 e Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico (mesma regra para as outras combinações do modelo).

Gráfico A - Diagrama causal da análise de trilha, em cadeia, no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), variável básica IL-10, **A** - estimadores diretos, indiretos e **B** - estimativas, Uberlândia, 2017



Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, haverá relação causal, como pode ser visto nas setas indicadas entre anti-LAM e IL-10 e anti-PGL-1 e IL-10; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\leftrightarrow . \leftarrow), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso a citocina IL-10.

Tabela C - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica (*Toll-like receptor 2*) e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), Uberlândia, 2017

Variáveis	<i>Reacionais</i>					
	<i>Correlação Simples e Parcial (Variável Básica Toll-like receptor 2)</i>					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.23}$	0,70	49	0,004	0,90	81	<0,001
$r_{02.13}$	0,68	46	0,007	0,90	81	<0,001
$r_{03.12}$	0,69	47	0,005	0,33	10	0,283

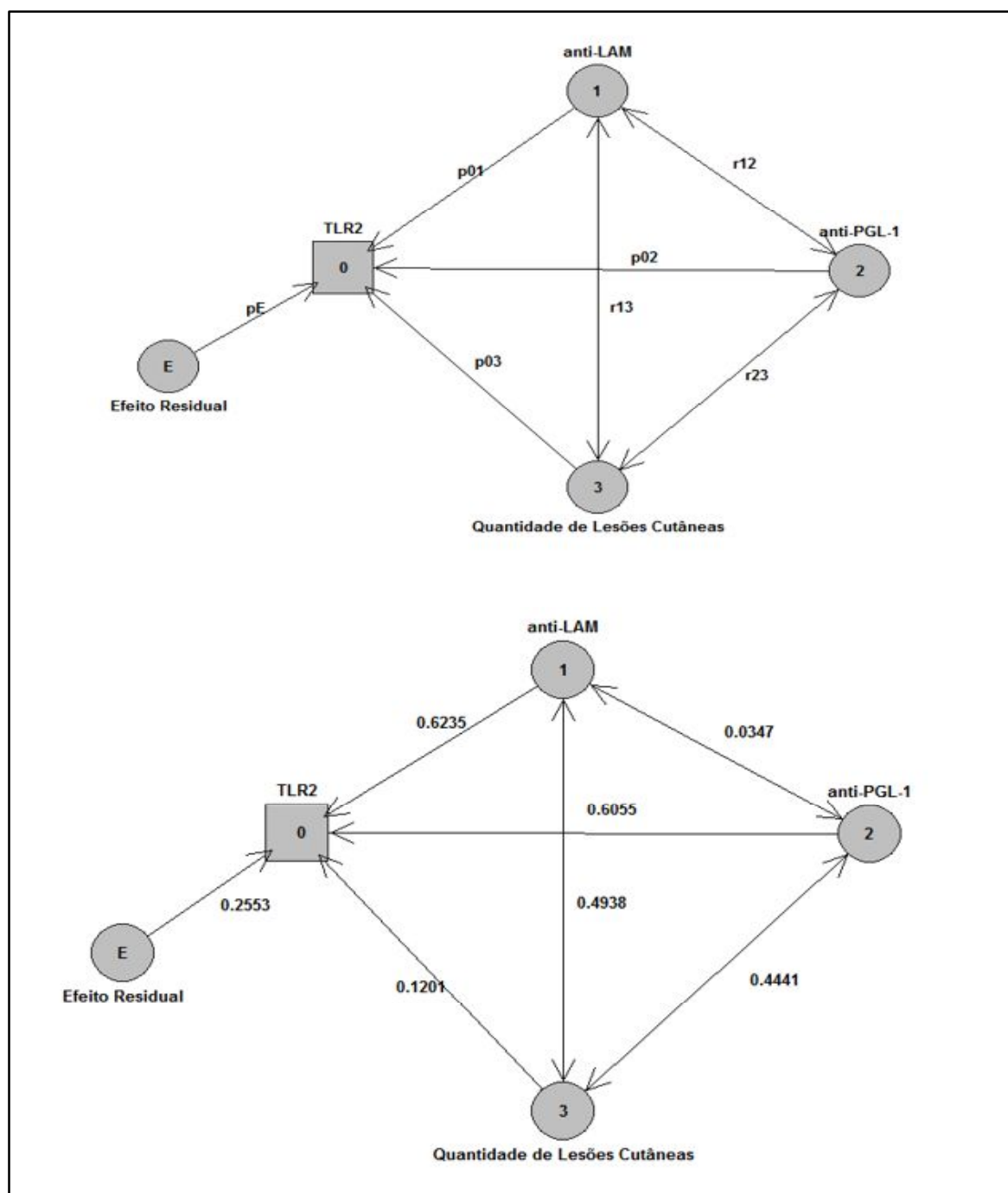
Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial (variável básica): Toll-like receptor 2; 1: anti-LAM; 2: anti-PGL-1; 3: Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico; interpreta-se: $r_{01.23}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1, isolando o efeito das variáveis 2 e 3 (mesma regra para demais combinações da correlação parcial).

Tabela D - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica *TLR2* no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), Uberlândia, 2017

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Vias de associação</i>	<i>Estimador</i>	<i>Estimativa</i>
<i>anti-LAM</i>	Efeito direto sobre Toll like receptor 2	p_{01}	0,623
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{02} r_{12}$	0,021
	Efeito indireto Quantidade de Lesões Cutâneas	$p_{03} r_{13}$	0,059
	Efeito total	r_{01}	0,703
<i>anti-PGL-1</i>	Efeito direto sobre Toll like receptor 2	p_{02}	0,605
	Efeito indireto via anti-LAM	$p_{01} r_{12}$	0,021
	Efeito indireto via Quantidade de Lesões Cutâneas	$p_{03} r_{23}$	0,053
	Efeito total	r_{02}	0,680
<i>Quantidade de Lesões Cutâneas</i>	Efeito direto sobre Toll like receptor 2	p_{03}	0,120
	Efeito indireto via anti-LAM	$p_{01} r_{13}$	0,307
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{02} r_{23}$	0,268
	Efeito total	r_{03}	0,697
$R^2_{0.123}$			0,934
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,255

Nota: $R^2_{0.123}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; 0 (variável básica): Toll-like receptor 2; 1: anti-LAM; 2: anti-PGL-1; 3: Quantidade de lesões cutâneas no diagnóstico, interpreta-se: p_{01} (efeito direto do anti-LAM sobre Toll-like receptor 2); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto do anti-LAM via anti-PGL-1 sobre Toll-like receptor 2, obtido multiplicando-se o efeito direto de anti-PGL-1 sobre Toll-like receptor 2 (p_{02}) pela correlação entre anti-LAM e anti-PGL-1 (r_{12}); r_{01} : correlação entre Toll-like receptor 2 e anti-LAM (mesma regra para as outras combinações do modelo).

Gráfico B - Diagrama causal da análise de trilha, em cadeia, no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), variável intermediária *TLR2*, **A** - estimadores diretos, indiretos e **B** - estimativas em relação as variáveis explicativas, *Uberlândia, 2017*



Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, haverá relação causal, como pode ser visto na setas indicadas entre anti-LAM e TLR2 e anti-PGL-1 e TLR2; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\leftrightarrow . \leftarrow), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso o TLR2).

Tabela E - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica *TLRI*, e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), Uberlândia, 2017

Variáveis	Reacionais					
	Correlação Simples e Parcial (Variável Básica Toll-like Receptor 1)					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.2}$	0,72	51,8%	0,003	0,66	43,5%	0,013
$r_{02.1}$	0,57	32,4%	0,032	0,44	19,3%	0,125

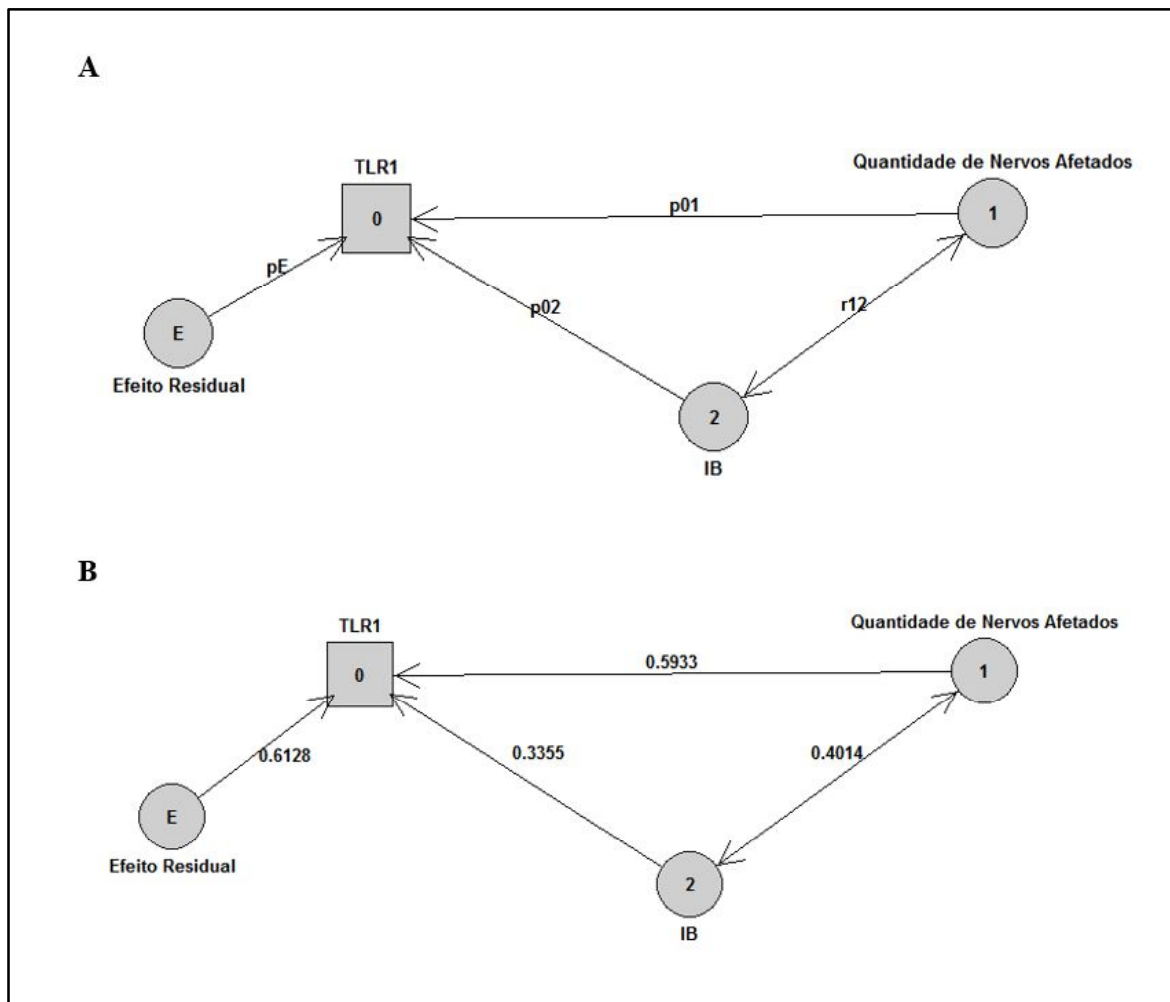
Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial; 0 (variável básica): Toll-like receptor 1; 1: quantidade de Nervos afetados no diagnóstico; 2: Índice Baciloscópio no diagnóstico; interpreta-se: $r_{01.234}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1 isolando o efeito da variável 2 (mesma regra para a outra combinação da correlação parcial).

Tabela F - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica *TLRI* no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), Uberlândia, 2017

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimado r	Estimativ a
Quantidade de Nervos Afetados	Efeito direto sobre Toll-like receptor 1	p_{01}	0,593
	Efeito indireto via Índice Baciloscópio (IB)	$p_{02} r_{12}$	0,134
	Efeito total	r_{01}	0,728
Índice Baciloscópio (IB)	Efeito direto sobre Toll-like receptor 1	p_{02}	0,335
	Efeito indireto via Quantidade de Nervos Afetados	$p_{01} r_{12}$	0,238
	Efeito total	r_{02}	0,573
$R^2_{0.12}$			0,624
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,612

Nota: Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico; 2: Índice baciloscópio no diagnóstico; interpreta-se: p_{01} (efeito direto da Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico sobre Toll-like receptor1); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto da Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico via Índice baciloscópio no diagnóstico sobre Toll-like receptor1, obtido multiplicando-se o efeito direto do Índice baciloscópio no diagnóstico sobre Toll-like receptor1 (p_{02}) pela correlação entre Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico e o Índice baciloscópio no diagnóstico (r_{12}); r_{01} : correlação entre Toll-like receptor1 e Quantidade de Nervos afetados no diagnóstico (mesma regra para as outras combinações do modelo)

Gráfico C - Diagrama causal da análise de trilha no grupo reacional (reação tipo 1 e reação tipo 2), variável básica *TLR1*, **A** - estimadores diretos, indiretos e **B** - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017



Nota: *Interpreta-se*: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto entre as variáveis independente e dependente for maior que a estimativa do efeito residual sobre a variável dependente, há relação causal. No entanto nesse modelo não houve relação causal direta; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\leftrightarrow . \leftarrow), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso observa-se que o efeito residual é maior que os efeitos diretos e indiretos nesse modelo, visto que, o efeito indireto é o produto entre o valor presente na seta bidirecional e unidirecional da via de associação que se deseja calcular.

APÊNDICE D – RESULTADOS COMPLEMENTARES COM TABELAS DE CORRELAÇÕES SIMPLES E PARCIAIS, ANÁLISES DE TRILHA E GRÁFICOS DOS DIAGRAMAS DE TRILHA NOS GRUPOS CONTROLE PAUCIBACILAR E MULTIBACILAR

Tabela G - Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo controle paucibacilar (não reacional), fundamentada na correlação linear simples de *Pearson*, Uberlândia, 2017

Variáveis	Grupo Controle Paucibacilar					
	Quantidade de Lesões Cutâneas			IFN- γ		
	r_{xy}	IC (95%)	p-valor	r_{xy}	IC (95%)	p-valor
Quantidade de Nervos afetados	-0,09	-0,97 - 0,95	0,909	-0,48	-0,93 - 0,98	0,684
Quantidade de Lesões Cutâneas				-0,58	-0,56 - 1,00	0,503
GID	-0,52	-0,99 - 0,88	0,478	1,00	-0,99 - 0,89	0,130
Idade	-0,20	-0,97 - 0,94	0,800	-0,18	-0,93 - 0,98	0,712
Etnia	0,30	-0,93 - 0,98	0,698	0,53	-0,91 - 0,98	0,580
Toll like Receptor 1	0,97	-0,78 - 0,99	0,156	0,90	-0,49 - 1,00	0,283
Toll like Receptor 2	0,97	0,07 - 1,00	0,034	0,72	-0,78 - 0,99	0,282
IL-10	0,76	-0,74 - 0,99	0,236	0,88	-0,51 - 1,00	0,116
IFN-γ	0,87	-0,56 - 1,00	0,130			
IL-4	-0,55	-0,99 - 0,87	0,446	-0,56	-0,99 - 0,87	0,439
TNF-α	-0,58	-0,99 - 0,86	0,420	-0,54	-0,99 - 0,88	0,462
anti-LAM	0,16	-0,95 - 0,97	0,839	-0,35	-0,98 - 0,92	0,654
anti-PGL-1	0,23	-0,94 - 0,98	0,771	-0,28	-0,98 - 0,93	0,720
** Índice Baciloscópico						

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; IC (95%): Intervalo de Confiança de 95%, GID: Grau de incapacidade no diagnóstico; IL-10: Interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; IL-4: Interleucina 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral; anti-LAM: anticorpo contra antígeno lipoarabinomanana ; anti-PGL-1: anticorpo contra antígeno glicolipideo fenólico-I; Quantidade de nervos acometidos (dados referentes ao diagnóstico); Quantidade de lesões cutâneas (dados referentes ao diagnóstico); ** Índice baciloscópico nos paucibacilares é igual a 0 (valor que não admite correlação);

Tabela H - Matriz de correlação entre variáveis básicas e variáveis explicativas do grupo controle multibacilar (não reacional), fundamentada na correlação linear simples de *Pearson*, Uberlândia, 2017

Variáveis	Grupo Controle Multibacilar								
	Quantidade de Lesões Cutâneas			anti-PGL-1			Índice Baciloscópico		
	r_{xy}	IC (95%)	p-valor	r_{xy}	IC (95%)	p-valor	r_{xy}	IC (95%)	p-valor
Quantidade de Nervos Afetados	-0,10	-0,75 - 0,65	0,816	-0,05	-0,73 - 0,68	0,913	-0,22	-0,80 - 0,57	
Quantidade de Lesões Cutâneas				0,78	0,17 - 0,96	0,023	0,88	0,44 - 0,98	0,004
GID	-0,14	-0,77 - 0,63	0,748	0,16	-0,61 - 0,78	0,704	0,03	-0,69 - 0,72	0,943
Gênero	0,10	-0,65 - 0,75	0,821	-0,43	-0,87 - 0,40	0,294	0,16	-0,61 - 0,78	0,708
Idade	0,10	-0,53 - 0,82	0,501	-0,08	-0,74 - 0,66	0,852	0,21	-0,58 - 0,80	0,618
Etnia	-0,18	-0,79 - 0,60	0,668	-0,28	-0,82 - 0,53	0,497	-0,16	-0,61 - 0,78	0,702
Toll like Receptor 1	-0,46	-0,92 - 0,82	0,303	-0,54	-0,94 - 0,78	0,207	-0,56	-0,94 - 0,78	0,193
Toll like Receptor 2	-0,67	-0,98 - 0,41	0,098	-0,43	-0,97 - 0,59	0,341	-0,59	-0,97 - 0,60	0,166
IL-10	-0,53	-0,94 - 0,77	0,358	-0,74	-0,92 - 0,82	0,155	-0,44	-0,97 - 0,64	0,454
IFN-γ	-0,18	-0,98 - 0,38	0,698	0,16	-0,96 - 0,66	0,730	-0,34	-0,97 - 0,58	0,455
IL-4	0,72	-0,48 - 0,98	0,044	0,64	-0,47 - 0,98	0,090	0,57	-0,59 - 0,97	0,141
TNF-α	-0,15	0,91 - 0,85	0,716	-0,29	-0,93 - 0,81	0,484	0,04	-0,85 - 0,91	0,999
anti-LAM	0,39	-0,83 - 0,92	0,336	0,78	-0,51 - 0,98	0,023	0,35	-0,69 - 0,96	0,394
anti-PGL-1	0,78	-0,18 - 0,99	0,023				0,73	-0,15 - 0,99	0,042
Índice Baciloscópico	0,88	0,44 - 0,98	0,004	0,73	0,04 - 0,95	0,042			

Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; IC (95%): Intervalo de Confiança de 95%, GID: Grau de incapacidade no diagnóstico; IL-10: Interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; IL-4: Interleucina 4; TNF- α : Fator de necrose tumoral; anti-LAM: anticorpo contra antígeno lipoarabinomanana ; anti-PGL-1: anticorpo contra antígeno glicolípido fenólico-I; Quantidade de nervos acometidos (dados referentes ao diagnóstico); Quantidade de lesões cutâneas (dados referentes ao diagnóstico)

Tabela I - Correlações simples e parciais entre as variáveis básica quantidade de lesões cutâneas e explicativas de maior relação no primeiro modelo causal em pacientes multibacilares do grupo controle, Uberlândia, 2017

Variáveis	Grupo Controle Multibacilar					
	<i>Correlação Simples e Parcial (Variável Básica Quantidade de Lesões Cutâneas)</i>					
	r_{xy}	$R^2_{.100\%}$	p -valor (r_{xy})	$r_{xy.z}$	$R^2_{.100\%}$	p -valor ($r_{xy.z}$)
$r_{01.23}$	0,72	51	0,044	0,46	21	0,351
$r_{02.13}$	0,78	60	0,023	0,28	7	0,585
$r_{03.12}$	0,88	77	0,004	0,72	51	0,106

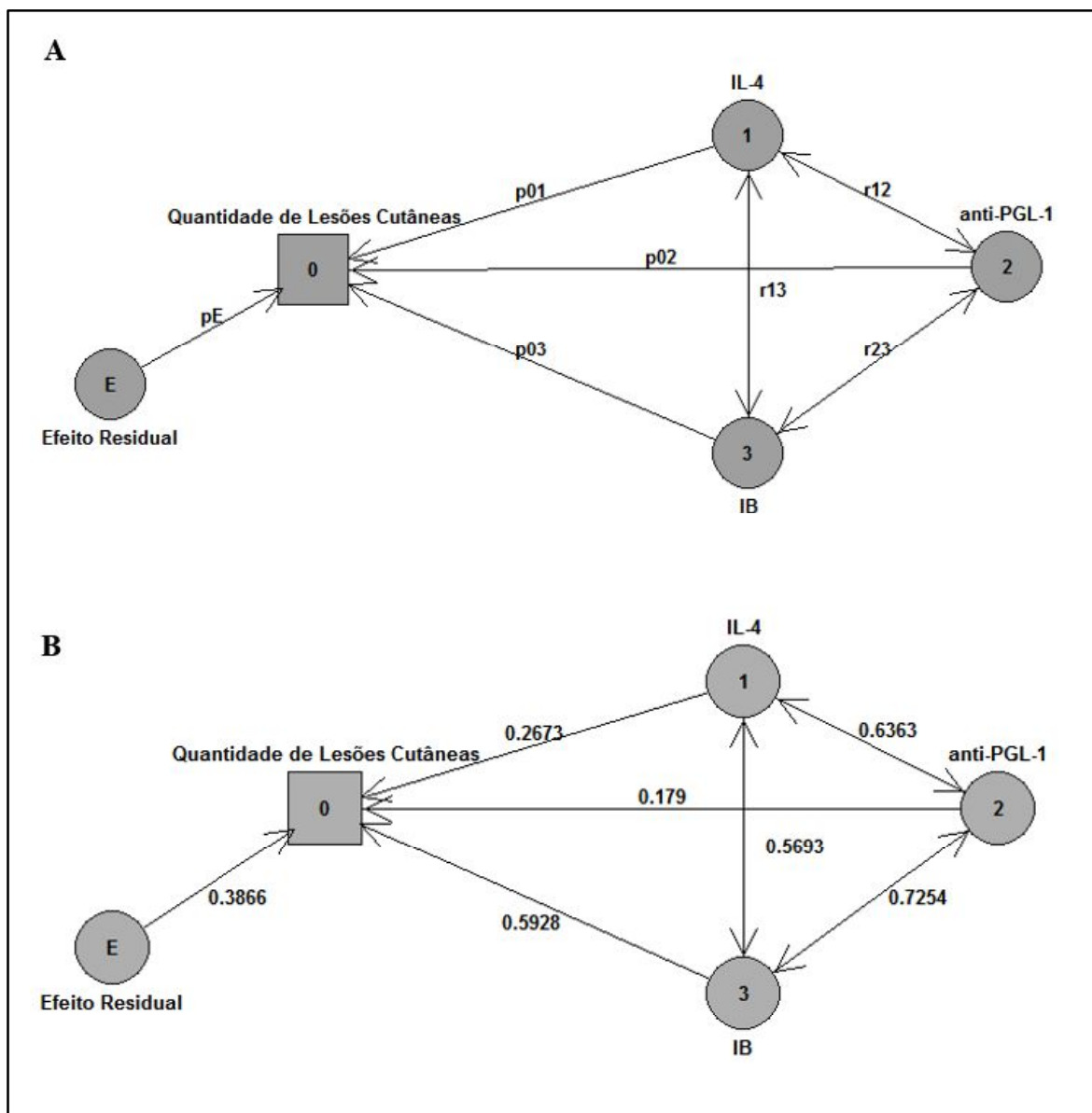
Nota: r_{xy} : Coeficiente de correlação linear simples de Pearson; $R^2_{.100\%}$: coeficiente de determinação ajustado multiplicado por 100%; $r_{xy.z}$: Coeficiente de correlação parcial; 0 (variável básica): Quantidade de Lesões Cutâneas; 1: IL-4; 2: anti-PGL-1; 3: Índice bacilosópico; interpreta-se: $r_{01.23}$: Correlação parcial entre variável 0 e 1 isolando o efeito das variável 2 e 3; $r_{02.31}$: Correlação parcial entre variável 0 e 2 isolando o efeito das variável 1 e 3, ; $r_{03.12}$: Correlação parcial entre variável 0 e 3 isolando o efeito das variável 1 e 2.

Tabela J - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) das variáveis explicativas sobre a variável básica quantidade de lesões cutâneas, Uberlândia, 2017

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Vias de associação</i>	<i>Estimador</i>	<i>Estimativa</i>
IL-4	Efeito direto sobre Quantidade de lesões cutâneas	p_{01}	0,267
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{02} r_{12}$	0,113
	Efeito indireto via IB	$p_{03} r_{13}$	0,337
	Efeito total	r_{01}	0,718
anti-PGL-1	Efeito direto sobre Quantidade de lesões cutâneas	p_{02}	0,179
	Efeito indireto via IL-4	$p_{01} r_{12}$	0,170
	Efeito indireto via IB	$p_{03} r_{23}$	0,430
	Efeito total	r_{02}	0,779
Índice Bacilosópico	Efeito direto sobre Quantidade de lesões cutâneas	p_{03}	0,592
	Efeito indireto via IL-4	$p_{01} r_{13}$	0,152
	Efeito indireto via anti-PGL-1	$p_{02} r_{23}$	0,129
	Efeito total	r_{03}	0,875
$R^2_{0.123}$			0,850
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,386

Nota: $R^2_{0.12}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; 0 (variável básica): Quantidade de Lesões Cutâneas; 1: IL-4 (interleucina 4); 2: anti-PGL-1; 3: Índice Bacilosópico interpreta-se: p_{01} (efeito direto de IL-4 sobre Quantidade de Lesões Cutâneas); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto de IL-4 via anti-PGL-1 sobre Quantidade de Lesões Cutâneas, obtido multiplicando-se o efeito direto de anti-PGL-1 sobre Quantidade de Lesões Cutâneas (p_{02}) pela correlação entre IL-4 e anti-PGL-1 (r_{12}); r_{01} : correlação entre Quantidade de Lesões Cutâneas e IL-4 (mesma regra para as outras combinações do modelo)

Gráfico D - Diagrama causal da análise de trilha no grupo não reacional, variável básica quantidade de lesões cutâneas, A - estimadores diretos, indiretos e B - estimativas em relação as variáveis explicativas, Uberlândia, 2017



Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\leftarrow) direcionadas à variável básica (0) e seus respectivos valores = o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser visto nas setas indicadas entre Quantidade de Lesões Cutâneas e Índice Baciloscópico; setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam = correlação entre duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\leftrightarrow . \leftarrow), isto é, o produto de seus valores = efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso o Quantidade de Lesões Cutâneas e Índice Baciloscópico.

APÊNDICE E - DESCRIÇÃO DETALHADA DA ANÁLISE DE TRILHA

1 - O que é importante antes de executar a análise de trilha?

- a) Testar a normalidade de todas as variáveis (Utilizando *softwares* estatísticos [Bioestat 5.4; Graphpad Prism 7, SPSS 22 ou análogos]);
- b) As variáveis dependentes devem todas apresentar distribuição normal (passar no teste de normalidade);
- c) Caso uma das variáveis definida como dependente apresente distribuição não-paramétrica, deverá ser normalizada;
- d) As variáveis independentes podem ser paramétricas ou não paramétricas;
- e) Todas essas propriedades são importantes para implementar a análise de trilha, método baseado na regressão linear múltipla.

2 – Como hipotetizar e levantar variáveis para realizar a análise de trilha?

- a) Associar modelos teóricos expressos na literatura mundial com hipóteses estatísticas;
- b) Realizar o levantamento das variáveis mais importantes para o seu estudo e identificar modelos causais (exemplo: idade tem relação causal com a variável peso);
- c) Comparação entre médias das variáveis contínuas em estudos de caso-controle auxiliará a identificar variáveis de maior fator de ponderação (maior peso estatístico) (opcional)

3 – Quais seriam os passos para alcançar os resultados da análise de trilha?

(Observação: todos os dados mostrados aqui são exemplos não relacionados com os resultados dessa tese)

1º Passo: Alocar as variáveis em planilhas eletrônicas (Microsoft® Excel®);

2º Passo: Copiar e colar os dados da planilha em um programa estatístico; (Recomendação: Graphpad Prism 7 ®);

GraphPad Prism 7.00 - [Project2:One-way ANOVA data]

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	Creatinina	Idade	Peso	Estatura	Title	Title
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	0.870	30.000	62	163		
2	1.000	34.000	73	167		
3	1.150	38.000	72	166		
4	1.310	41.000	80	181		
5	1.610	44.000	70	166		
6	1.630	45.000	69	168		
7	1.220	46.000	84	174		
8	1.730	48.000	85	170		
9	1.430	50.000	65	161		
10	0.950	51.000	58	165		
11	1.590	53.000	81	174		
12	1.810	55.000	87	177		
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						

3º Passo: Testar a normalidade das amostras;

✓ Clicar em Analyze > Column statistics > OK e abrirá esta página:

Parameters: Column Statistics

Descriptive Statistics

- Minimum and maximum
- Mean, SD, SEM
- Skewness and kurtosis
- Quartiles (Median, 25th and 75th percentile)
- Coefficient of variation
- Column sum
- Percentile: 90
- Geometric mean

Confidence intervals

- CI of the mean
- CI of geometric mean
- CI of median
- Confidence level: 95%

Test if the values come from a Gaussian distribution

- D'Agostino-Pearson omnibus normality test (recommended)
- Shapiro-Wilk normality test
- Kolmogorov-Smirnov test with Dallal-Wilkinson-Lilliefors P value (not recommended)

Inferences

- One-sample t test. Are column means significantly different than a hypothetical value? Hypothetical value: 0
- Wilcoxon signed-rank test. Compare column medians to a hypothetical value.
- When a value equals the hypothetical value: Ignore that value entirely, as Prism 5 and earlier versions did

Subcolumns

- Compute the mean of the subcolumns for each row, and then calculate the column statistic for each column
- Compute column statistics for each subcolumn separately

Output

P value style: GP: 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (****), <0.0001 (*****)

Show: 4 significant digits.

Make these choices be the default for future analyses.

Learn Cancel OK

✓ Selecionar todas as opções: D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e clicar em OK para executar os testes de normalidade selecionados;

Parameters: Column Statistics

Descriptive Statistics

- Minimum and maximum
- Mean, SD, SEM
- Skewness and kurtosis
- Quartiles (Median, 25th and 75th percentile)
- Coefficient of variation
- Column sum
- Percentile: 90
- Geometric mean

Confidence intervals

- CI of the mean
- CI of geometric mean
- CI of median
- Confidence level: 95%

Test if the values come from a Gaussian distribution

- D'Agostino-Pearson omnibus normality test (recommended)
- Shapiro-Wilk normality test
- Kolmogorov-Smirnov test with Dallal-Wilkinson-Lilliefors P value (not recommended)

Inferences

- Aqui temos os resultados dos testes de normalidade mostrando que as 3 variáveis apresentaram distribuição normal;

Col. stats		A	B	C	D
		Creatinina	Idade	Peso	Estatura
		Y	Y	Y	Y
17					
18	D'Agostino & Pearson normality test				
19	K2	2.349	0.9401	1.33	1.048
20	P value	0.3089	0.6250	0.5142	0.5923
21	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
22	P value summary	ns	ns	ns	ns
23					
24	Shapiro-Wilk normality test				
25	W	0.9383	0.9601	0.9496	0.9475
26	P value	0.4760	0.7855	0.6318	0.6006
27	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
28	P value summary	ns	ns	ns	ns
29					
30	KS normality test				
31	KS distance	0.1811	0.1363	0.1576	0.1712
32	P value	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000
33	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
34	P value summary	ns	ns	ns	ns
35					
36					

4º Passo: Definir quais serão as variáveis dependentes e independentes;

Observação: Como as 4 variáveis são paramétricas, não precisamos transformá-las. Lembrar que somente a variável dependente precisaria ser transformada caso fosse não-paramétrica.

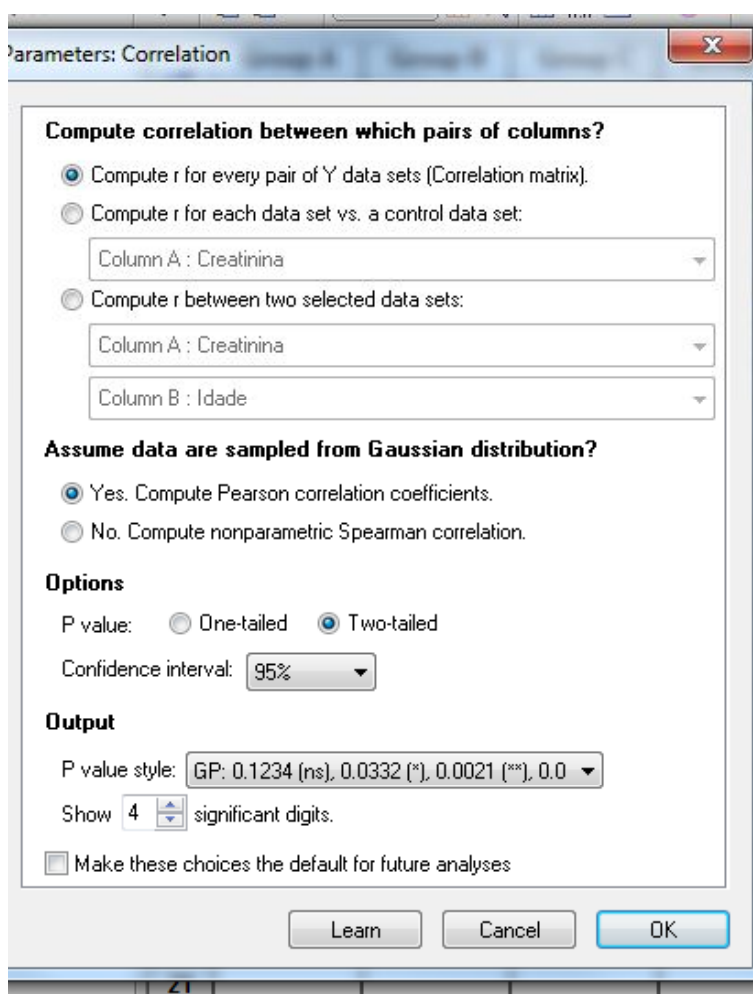
- No exemplo teremos: Creatinina = variável dependente e as demais (peso, idade e estatura) como independentes;

5º Passo: Calcular os coeficientes de correlação (Matriz de correlação);

- Podemos utilizar a matriz de correlação de *Pearson*, pois todas as variáveis são paramétricas;
- Poderíamos utilizar a matriz de correlação de *Spearman* caso uma das variáveis independentes fossem não-paramétricas;

Neste caso usaremos Matriz de correlação de Pearson:

- ✓ Clicar em *analyze > Correlation > OK* e abrir a janela abaixo:



- ✓ Selecionar “Yes. Compute Pearson correlation coefficients”; P-value (two-tailed) conforme figura acima e clicar em OK;

- Abrirá a janela mostrada abaixo com essa guia mostrando os coeficientes de correlação (e haverá outra guia mostrando os p-valores);

		A	B	C	D	E
		Creatinina	Idade	Peso	Estatura	Title
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Creatinina		0.662	0.595	0.385	
2	Idade	0.662		0.339	0.304	
3	Peso	0.595	0.339		0.802	
4	Estatura	0.385	0.304	0.802		
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

6º Passo: Copiar os dados dos coeficientes de correlação conforme mostrado na figura abaixo;

		A	B	C	D	E	F
		Creatinina	Idade	Peso	Estatura	Title	Title
		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Creatinina		0.019	0.041	0.216		
2	Idade	0.019		0.282	0.337		
3	Peso	0.041	0.282		0.002		
4	Estatura	0.216	0.337	0.002			
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							

7º Passo: Colar os dados dos coeficientes de correlação em uma planilha do Excel e completar os espaços em branco com o valor 1;

				1	0.0190296260908336	0.0413842020351829	0.216400790422465
				0.0190296260908336	1	0.281623414100475	0.337026086895778
				0.0413842020351829	0.281623414100475	1	0.00169213836585658
				0.216400790422465	0.337026086895778	0.00169213836585658	1

7º Passo: Copiar os dados da planilha do Excel e colar em um documento de extensão do tipo txt (bloco de notas);

```

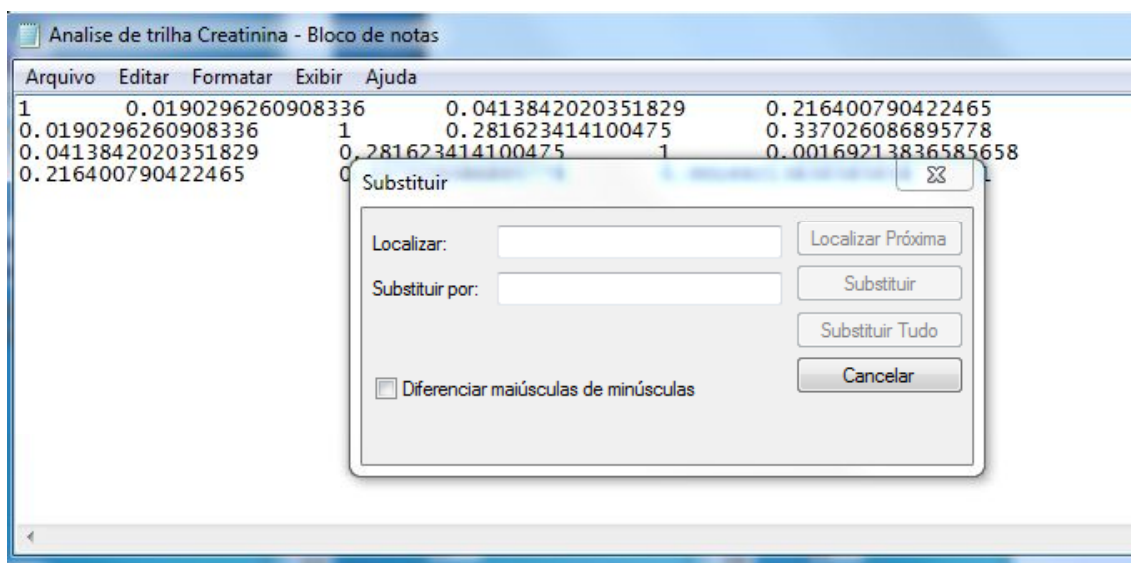
Arquivo  Editar  Formatar  Exibir  Ajuda
1      0.0190296260908336      0.0413842020351829      0.216400790422465
0.0190296260908336      1      0.281623414100475      0.337026086895778
0.0413842020351829      0.281623414100475      1      0.00169213836585658
0.216400790422465      0.337026086895778      0.00169213836585658      1
  
```

- Um truque importante é remover os espaços em branco. Como? Copiando um dos espaços em branco e clicando em Editar > Substituir;

```

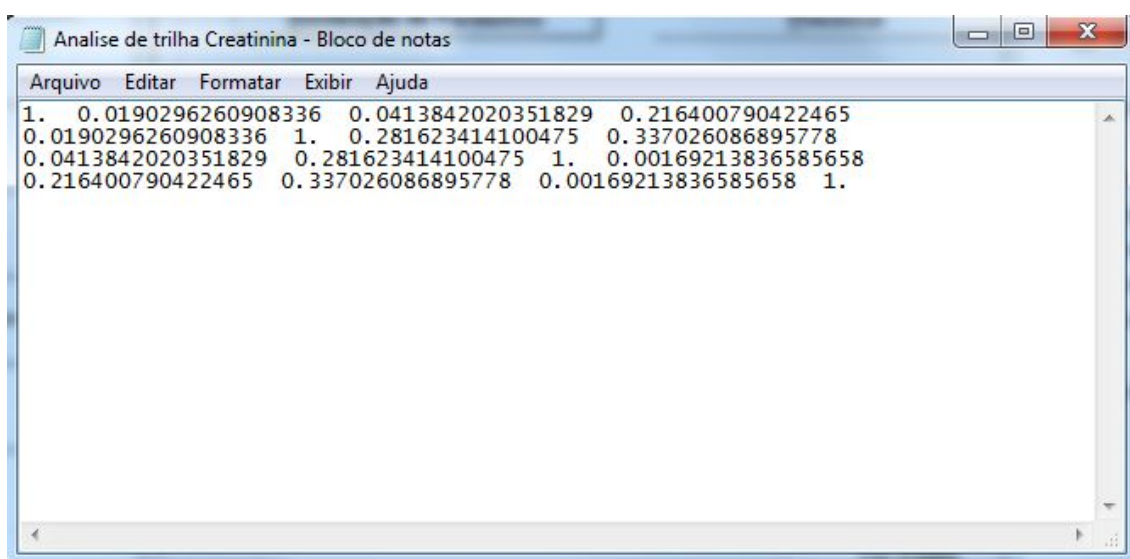
Arquivo  Editar  Formatar  Exibir  Ajuda
1      0.0190296260908336      0.0413842020351829      0.216400790422465
0.0190296260908336      1      0.281623414100475      0.337026086895778
0.0413842020351829      0.281623414100475      1      0.00169213836585658
0.216400790422465      0.337026086895778      0.00169213836585658      1
  
```

- ✓ A clicar em Editar > Substituir e abrirá a janela abaixo:



- Colar o espaço em branco copiado no bloco de notas, mostrado anteriormente, e no campo substituir apertar a tecla "Space" 2 vezes e clicar em substituir tudo. Assim o caractere que poderia gerar erro na análise de trilha será eliminado;

- Deve-se lembrar de colocar ponto à direita do número 1 de acordo com a figura abaixo:

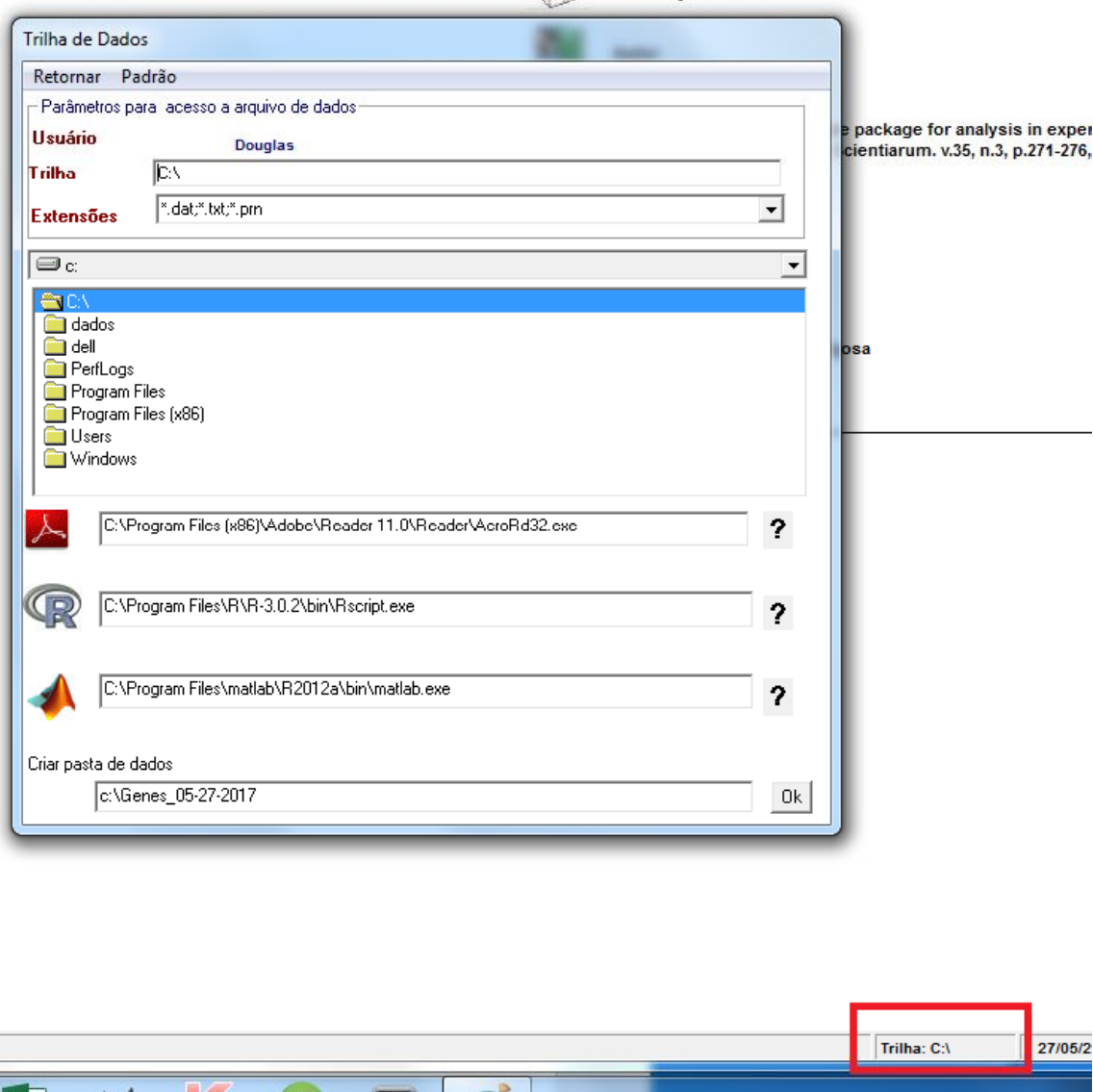


- Salvar as alterações apertando a tecla Ctrl + S (Salvar) em uma pasta conhecida;

8º Passo: Com o programa Genes já instalado o usuário deverá abri-lo e testar a presença de multicolinearidade;

- Observação: o programa pode ser baixado em:
<http://arquivo.ufv.br/dbg/genes/gdown1.htm>

- Antes clicar no ponto destacado em vermelho (trilha de dados) para selecionar o caminho (diretório) da pasta onde foi salvo o arquivo txt (bloco de notas) contendo os coeficientes de correlação. No exemplo abaixo foi definido C:\ pois o arquivo está salvo nesse diretório conforme figura abaixo:

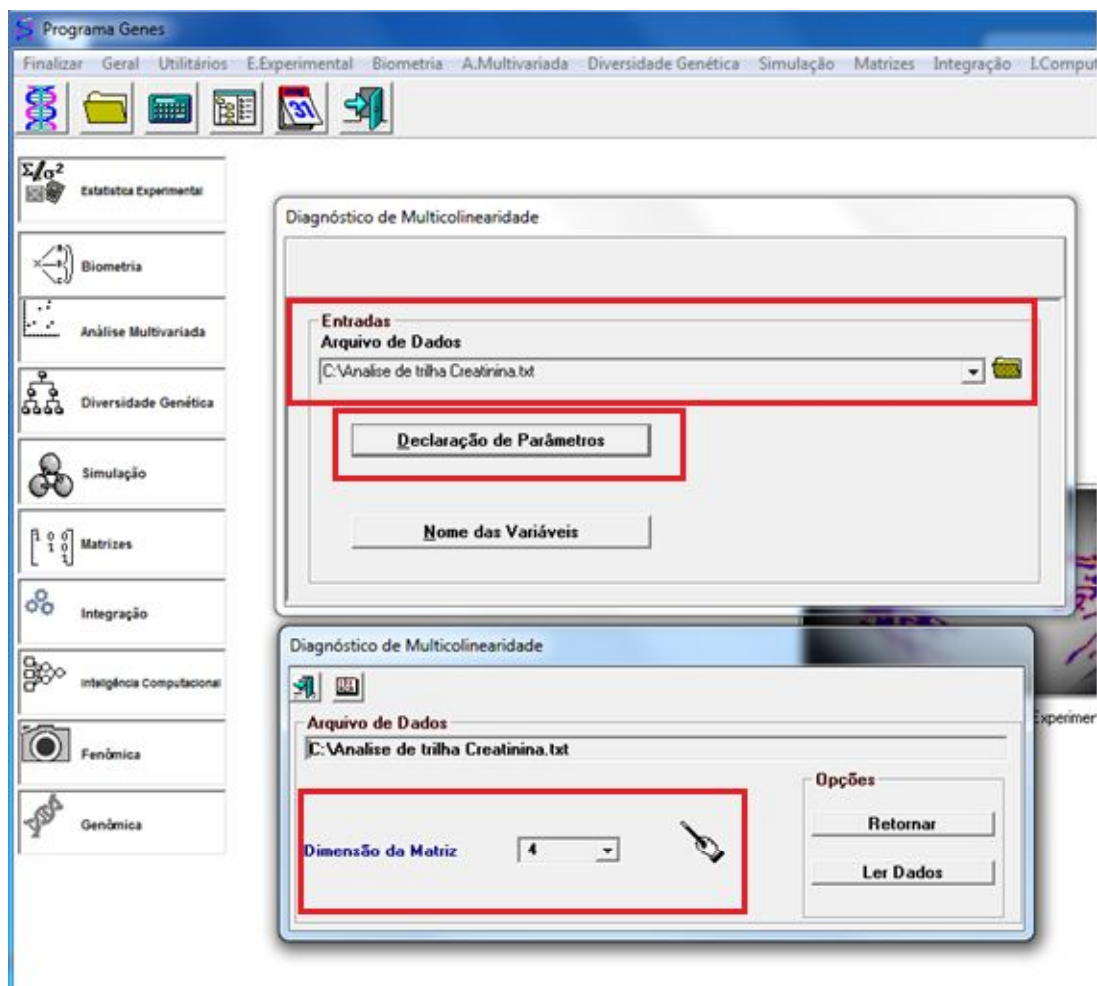


✓ Clicar em retornar para voltar a janela anterior;

O próximo passo será:

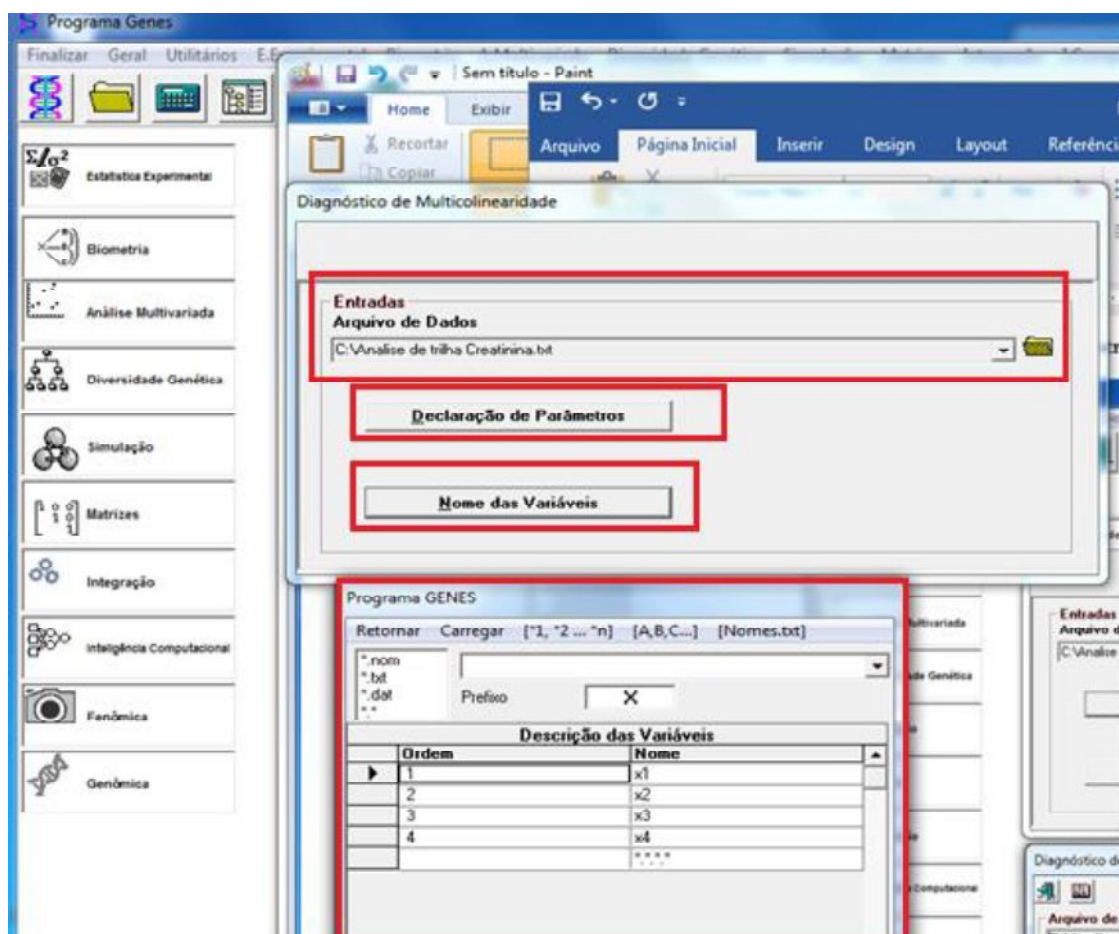
- ✓ Clicar em Matrizes > Diagnóstico de multicolinearidade;

- Abra a seguinte janela mostrada abaixo:



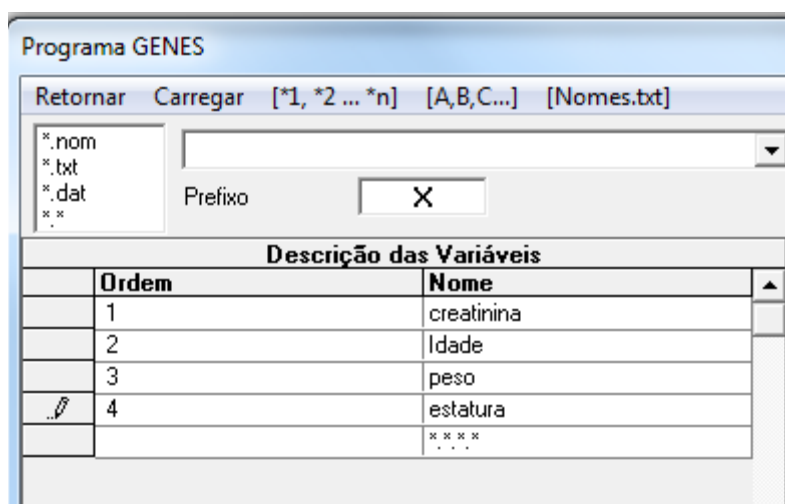
- Clicar em **arquivos de dados** e selecionar o **arquivo txt** contendo os coeficientes da matriz de correlação, logo em seguida clicar em declaração de parâmetros (número de variáveis da matriz de correlação) e clicar na **mãozinha com a varinha**, assim o processo será completado automaticamente;

- Posteriormente nomear as variáveis clicando em **Nome das variáveis**;

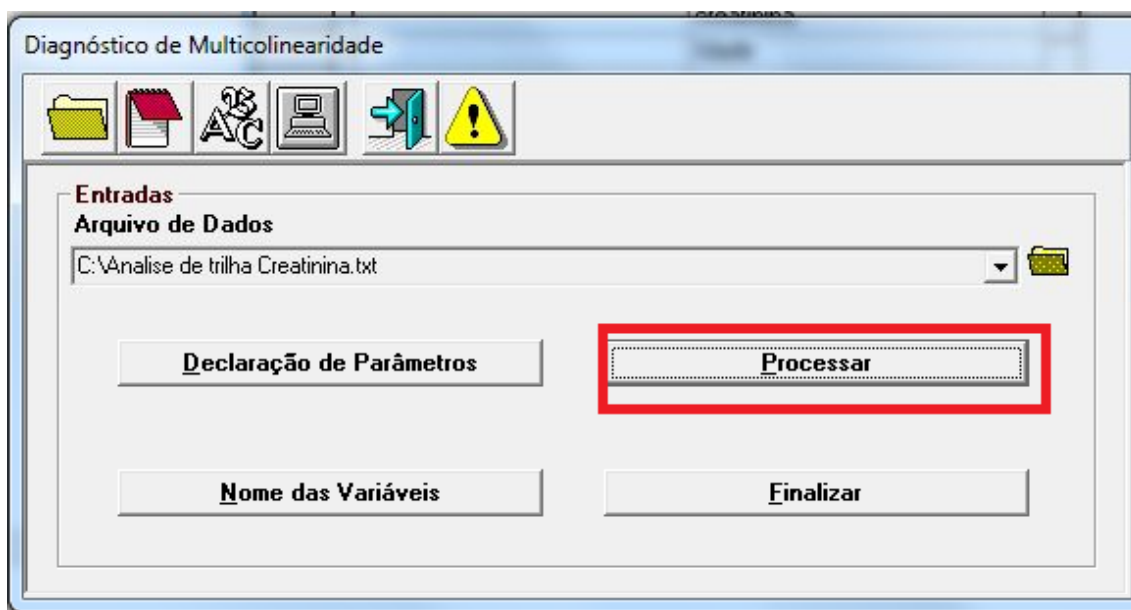


- Adicionar o nome de cada variável na ordem descrita na matriz de correlação (Cuidado para não errar a ordem):

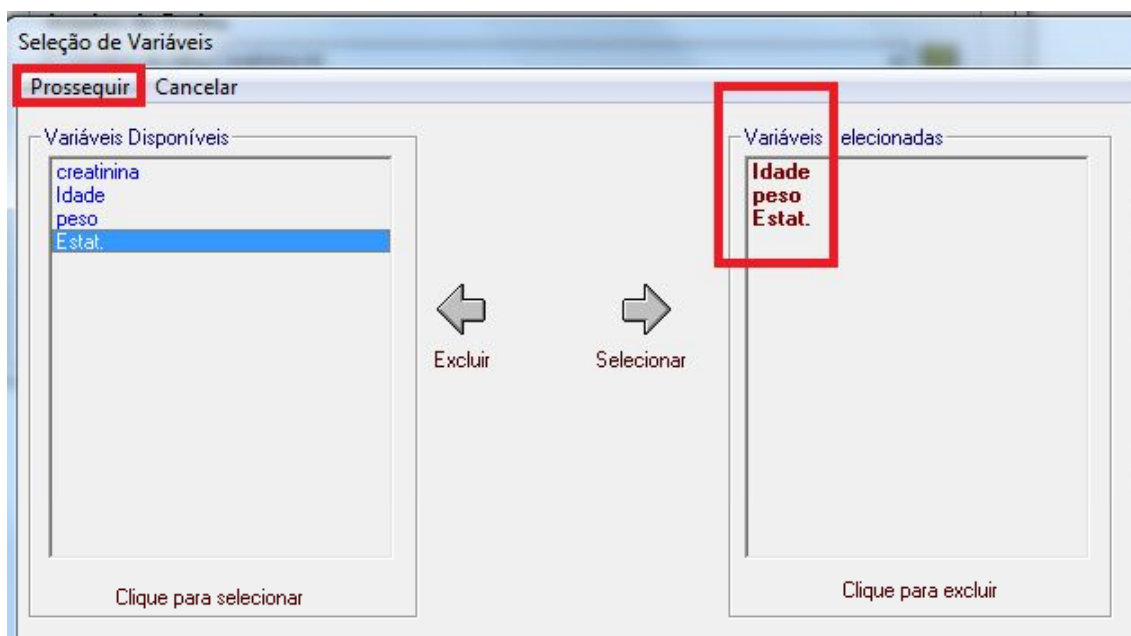
✓ 1 Creatinina, 2 Idade, 3 Peso e 4 estatura, conforme abaixo e clicar em retornar:



✓ Em seguida clique em processar:



- Abra a janela com todas as variáveis. Testar a colinearidade somente das variáveis independentes selecionando-as e clicando em prosseguir para gerar o teste de colinearidade:



- Irá gerar um documento com os seguintes parâmetros onde a combinação de:

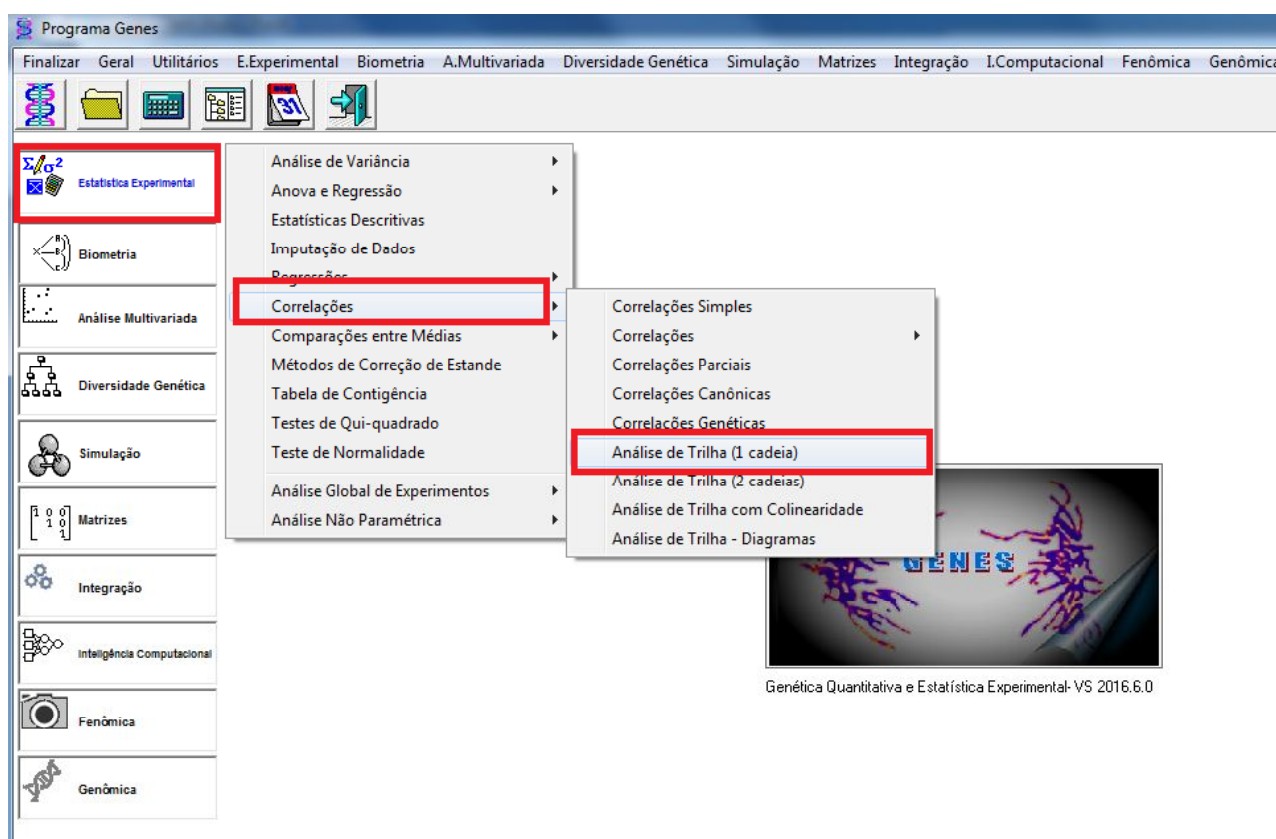
VIF < 10 e Número de condições Menores que 100 indicam ausência de multicolinearidade como observado abaixo:

Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda			
FATORES DE INFLAÇÃO DA VARIÂNCIA (VIF)			
Diagonal	Elemento da Inversa (r)		
1	1,238509		
2	1,097834		
3	1,140284		
Número de VIF's maior ou igual a abs(10) : 0			
AUTOVALORES DA MATRIZ - NÚMERO DE CONDIÇÃO			
Ordem	Autovalores		
1	1,440035		
2	,998335		
3	,561630		
Número de Condição (Max/Min): 2,564030			
Colinearidade Fraca			
Tabela de Classificação de Montgomery e Peck (1981)			
Número de condição (NC)			
NC < 100	Fraca (Não constitui problema sério)		
100 < NC < 1000	Moderada a forte		
> 1000	Severa		
Determinante da Matriz: ,807420			
AUTOVETORES DA MATRIZ			
,7064	,4542	,5428	
-,0007	,7674	-,6412	
-,7078	,4526	,5424	
ORDEM DAS VARIÁVEIS DE MAIOR PESO NOS ÚLTIMOS AUTOVETORES			
Idade - peso - Idade -			
DECOMPOSIÇÃO EM VALORES SINGULARES			
Ordem	valor singular	Índice de condição	VIFk
1	1,200015	1,000000	1,238509
2	,999167	1,201015	1,097834
3	,749420	1,601259	1,140284
(*) valores singulares pequenos indicam colinearidade			
Índice de condição elevado indica colinearidade			
PROPORÇÕES DA DECOMPOSIÇÃO DA VARIÂNCIA			
v(β1) v(β2) v(β3)			
u 1 =>	,279816	,130497	,179436
u 2 =>	,000000	,537263	,361174
u 3 =>	,720183	,332240	,459389
ui : i-ésimo valor singular			
v(βi) = variância do i-ésimo coeficiente de regressão			

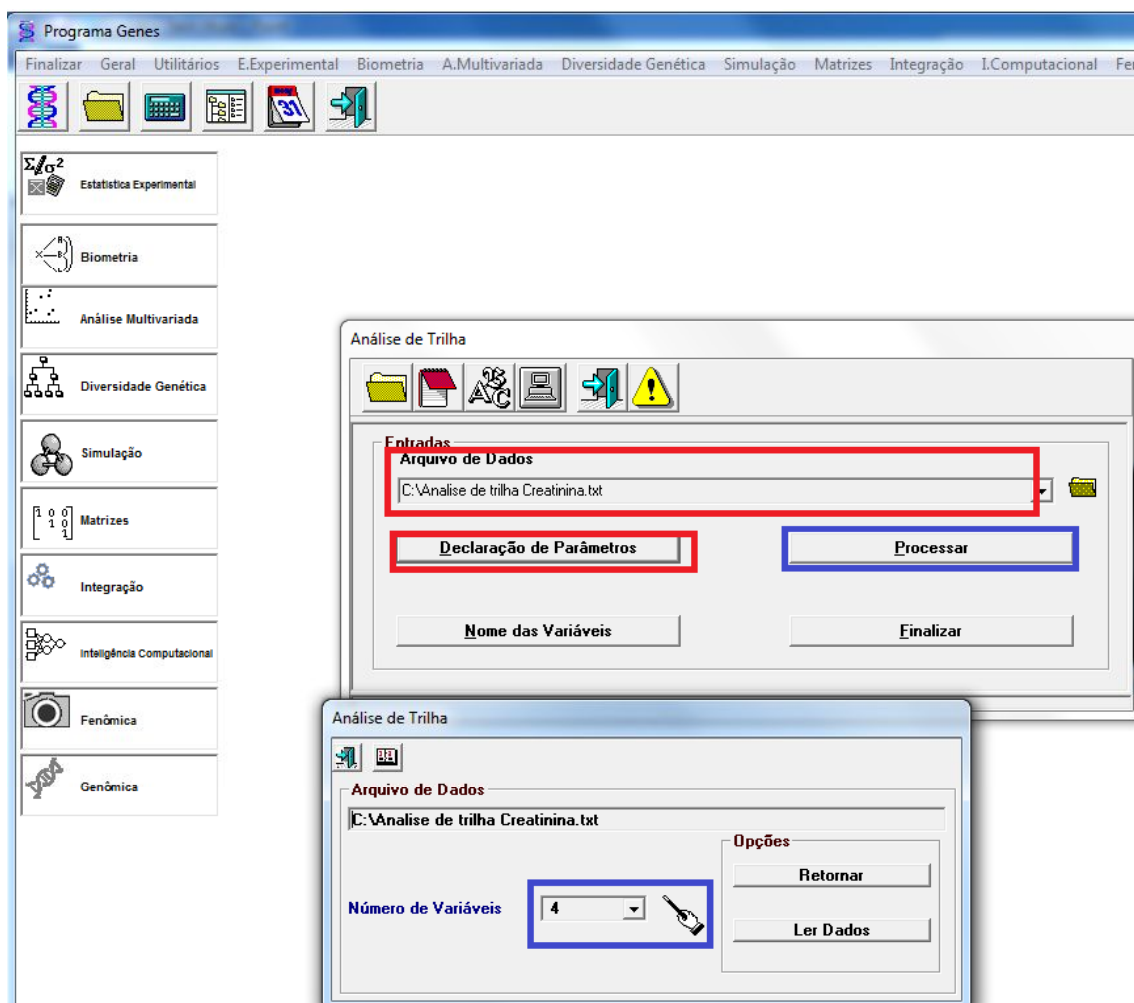
- Portanto **não há multicolinearidade** e poderá ser utilizada a análise de trilha sem multicolinearidade;

9º Passo: Executar a análise de trilha;

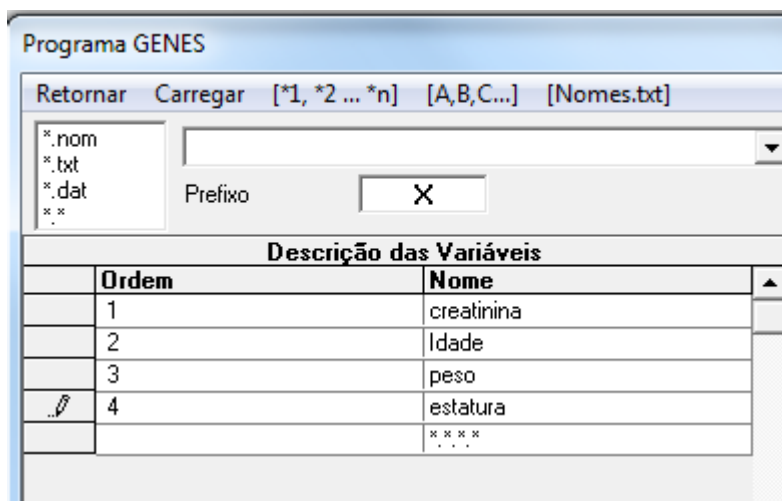
- ✓ **Clicar em estatística experimental > Correlações > Análise de Trilha (1 cadeia) (para esta situação) como mostrado abaixo;**



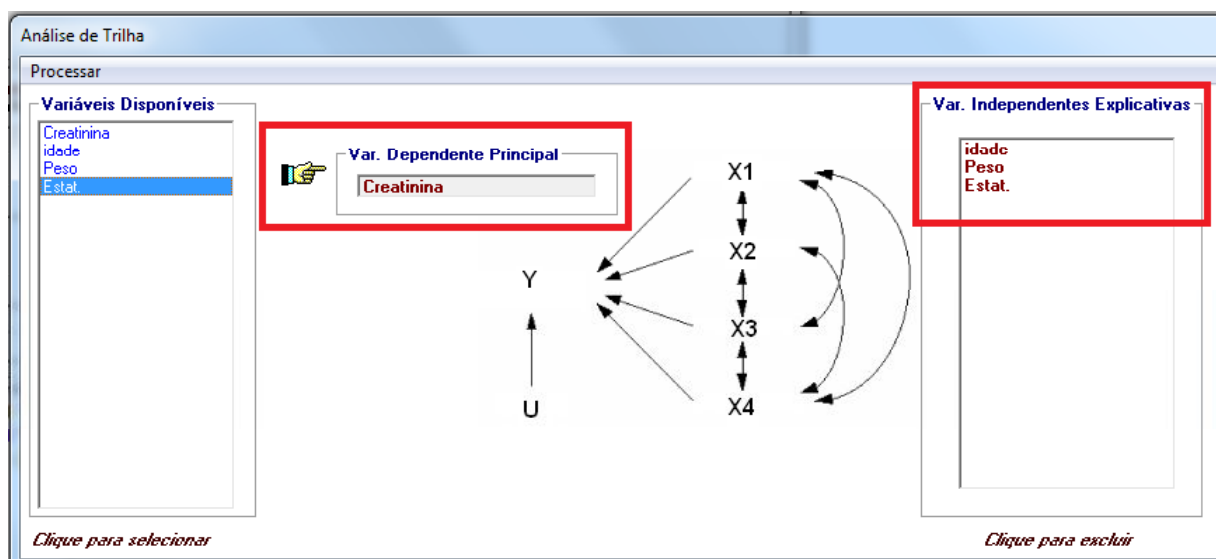
- Posteriormente abrirá a seguinte janela:



- ✓ Clicar em arquivos de dados e seleccionar o arquivo principal > declarar parâmetros e clicar sobre a mãozinha com a varinha > retornar > dar nome as variáveis conforme procedimento realizado anteriormente e figura abaixo > e clicar em Processar;



- Mostrará a seguinte janela abaixo:



- ✓ Deve-se inicialmente selecionar a variável dependente escolhida (**creatinina**), clicando sobre a caixa **Var. dependente Principal** e em seguida clicar sobre o nome **creatinina** na caixa **Variáveis Disponíveis**; e posteriormente clicar sobre a caixa **Var. Independentes Explicativas** e selecionar os nomes **idade, peso e Estat.**

- ✓ Realizada o passo anterior clicar em **processar**. Assim teremos a tabela da **análise de trilha** como mostrado logo abaixo:

SAIDA\$\$\$
Arquivo Exportar Dados Editar Fonte Cor Frente Cor Fundo Utilitários Calculadoras Finalizar

Programa GENES ANÁLISE DE TRILHA
Arquivo de dados C:\Análise de trilha Creatinina.txt
Número de variáveis 4
Data 05-28-2017

Correlações entre as variáveis explicativas e a variável básica - Creatinina

idade x Creatinina	,01902963
Peso x Creatinina	,0413842
Estat. x Creatinina	,21640079

Correlações entre as variáveis explicativas

1,	,28162341	,33702609
,28162341	1,	,00169214
,33702609	,00169214	1,

Determinante da matriz de correlação entre variáveis explicativas : ,80742002

RESULTADO DA ANÁLISE DE TRILHA

VARIÁVEL	EFEITO DIRETO SOBRE Creatinina	EFEITO INDIRETO VIA	TOTAL
idade	-,08103734	,01796588	0,0190296260908336
Peso	,063794	-,02282201	0,0413842020351829
Estat.	,24360454	-,0273117	0,216400790422465

COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ==> ,05381417
EFEITO DA VARIÁVEL RESIDUAL : ,97272084

Arquivo Gerado :

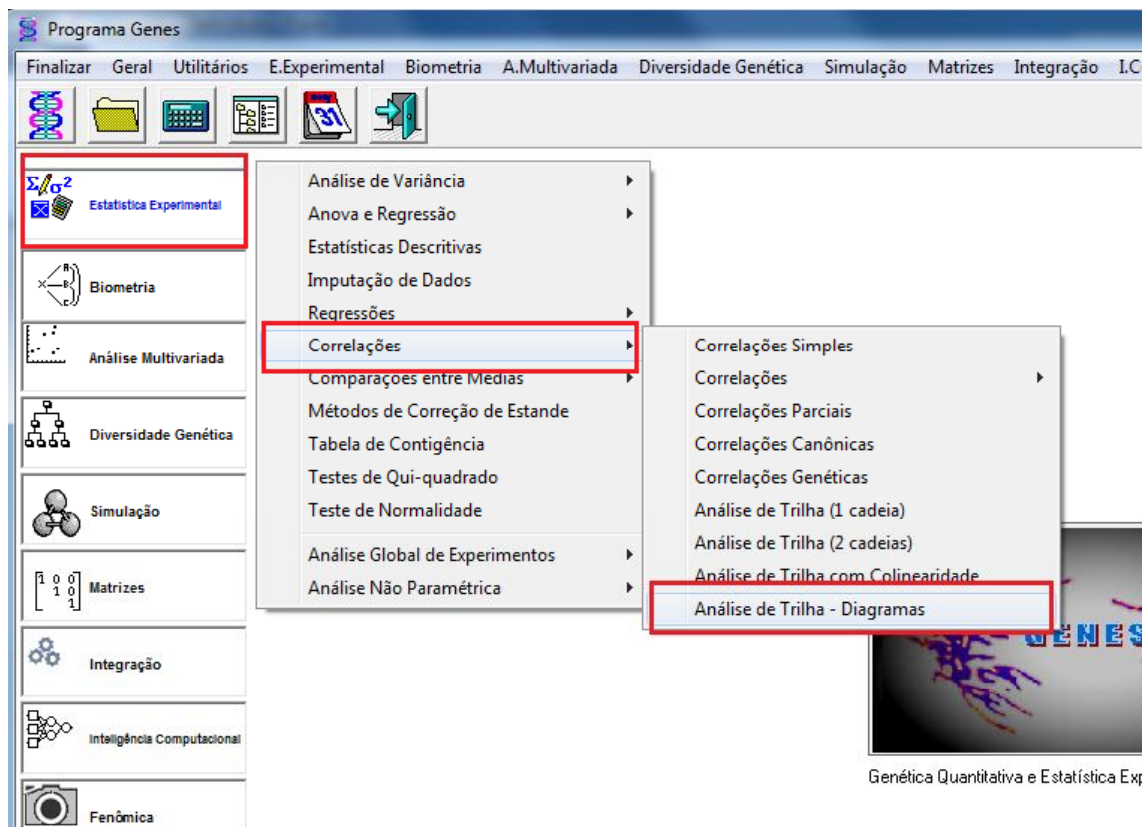
- Os critérios de interpretação estão descritos na metodologia dessa tese:

- Nota-se que se o efeito residual for $<$ que o efeito direto haverá relação causal direta, assim o efeito residual foi de $0,972 >$ que todos os efeitos mostrados acima, portanto nenhum das variáveis influenciaram na variação da creatinina no exemplo dado, isso porque nesse exemplo todas as variáveis tiveram coeficiente de correlação baixo. Se a sua matriz de correlação apresentar coeficientes de correlação elevados, isto é, moderado a forte, (geralmente $r > 0.55$) haverá modelo causal, sendo importante aplicação da análise de trilha.

Observação: **Coefficiente de determinação** significa o quanto o modelo estatístico explica ou prevê a variação na variável dependente; **Efeito residual** corresponde ao erro, e quanto maior o erro menor o poder das variáveis independentes prever os valores da variável dependente.

10º Passo: Criar e configurar os diagramas de trilha;

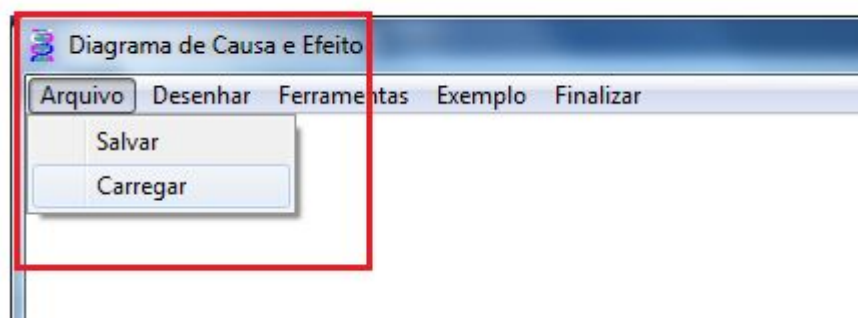
- ✓ Clicar em Estatística experimental > Correlações > Análise de Trilha – Diagramas;



- Foram gerados dois arquivos automaticamente com nomes de extensão TRI, sendo:

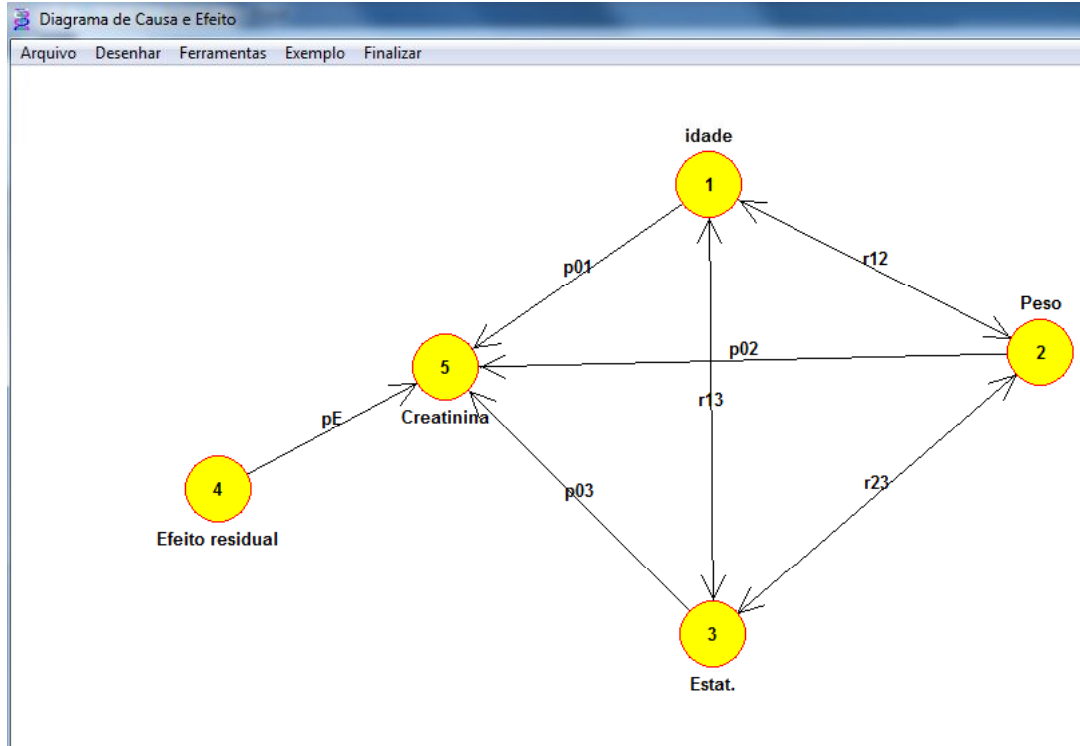
- um arquivo XXX1.tri e outro de nome XXX2.tri. Ambos serão selecionados e irão conter informações para criar os diagramas;

- ✓ Para isso basta clicar em **Arquivo > Carregar** > e **selecionar os arquivos XXX1.tri** formatá-lo conforme interesse e logo em seguida selecionar o arquivo XXX2.tri.



- Para ambos arquivos basta configurá-los como de preferência e apertar a tecla *print screen* ao final e Salvar as imagens como mostrado abaixo:

- Estimadores (arquivo XXX1.tri)



Estimativas (arquivo XXX2.tri)

