

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Pedro Henrique Ferreira Marçal

Reatividade sorológica e resposta de citocinas aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares provenientes de regiões endêmicas do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

**Juiz de Fora
2017**

Pedro Henrique Ferreira Marçal

Reatividade sorológica e resposta de citocinas aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares provenientes de regiões endêmicas do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marçal, Pedro Henrique Ferreira.

Reatividade sorológica e resposta de citocinas aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares provenientes de regiões endêmicas do Rio de Janeiro e Minas Gerais. / Pedro Henrique Ferreira Marçal. -- 2017. 112 f.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Hanseníase. 2. Sorodiagnóstico. 3. Proteínas recombinantes. 4. LID-1; NDO-LID; NDO-HSA. I. Teixeira, Henrique Couto, orient. II. Título.

Pedro Henrique Ferreira Marçal

Reatividade sorológica e resposta de citocinas aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares provenientes de regiões endêmicas do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

Aprovação em 30 de Outubro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Henrique Couto Teixeira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr^a. Euzenir Nunes Sarno
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ)

Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro (FIOCRUZ-RJ)
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a. Juciane Maria de Andrade Castro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^o. Dra. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho ao Deus Supremo, que me guiou, me guia e me guiará para todo o sempre. A Ele toda glória, honra e poder.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. O que conquistei até aqui só foi possível pela vontade e permissão dEle.

Aos meus pais, que sempre permaneceram como um porto seguro nos momentos de necessidade. A segurança que me ofereceram me impulsionou a continuar.

À minha esposa, Jéssica Lauar, que em todo o tempo me apoiou e compreendeu os momentos de ausência e as vezes de angústia. Te-la do meu lado tornou esse processo mais leve.

Ao meu orientador, Dr. Henrique Couto Teixeira, por aceitar o desafio de orientar um aluno de outra cidade e por ter trabalhado com afinco para que esse trabalho acontecesse. Agradeço a paciência e ajuda a vencer os obstáculos que surgiram durante o processo. Sem dúvidas, levarei por toda a vida o seu modelo de trabalho e competência, Muito Obrigado!

À minha co-orientadora. Dra Lúcia Alves, por enxergar em mim, potencial para o desenvolvimento de pesquisa. Agradeço por ter me ajudado a trilhar esse caminho desde a iniciação científica, e pelo exemplo de pessoa íntegra que é. Deixe meus sinceros agradecimentos

Ao meu companheiro de luta, Rafael Gama. Desde a graduação temos caminhando juntos. O companheirismo e amizade oferecidos foram importante durante todo o processo.

Aos amigos que acompanhara a minha trajetória durante todo o meu processo de formação. Pelo apoio e palavras de incentivo.

Aos companheiros do laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Agradeço pelas trocas de conhecimento e ajuda na realização dos experimentos.

Aos professores do laboratório de Imunologia, pela troca de conhecimento.

Ao corpo técnico do laboratório de Imunologia, pelo suporte que ofereceram durante a realização dos experimentos.

Aos colegas de trabalho da Universidade Vale do Rio Doce – Univale, por compartilharem da minha alegria na concretização de mais essa etapa na minha vida.

À equipe de saúde do CREDEN-PES, pelo apoio na seleção dos pacientes, além do auxílio na coleta de dados dos mesmos.

Às pesquisadoras Dra. Euzenir Nunes Sarno e Dra. Roberta Olmo da Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio na doação das amostras de soros de pacientes da cidade do Rio de Janeiro.

Ao Dr. Malcon Duthie, do Infectious Disease Research Institute (IDRI), Seattle, USA, pela colaboração e doação dos antígenos utilizados nesse estudo.

Aos participantes do estudo, que cederam amostras biológicas para a realização dos testes.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG e a UFJF, pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Àqueles(as) cujos nomes involuntariamente não foram citados.

RESUMO

A hanseníase é um problema de saúde pública no Brasil e em diversas regiões do mundo. Dificuldades no diagnóstico resultam em atraso no tratamento, aumento de casos severos da doença e incapacidades. Ainda não existe um teste sorológico utilizado no diagnóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial diagnóstico de três antígenos específicos do *M. leprae*: (i) LID-1 ou “Leprosy IDRI diagnostic 1”; (ii) NDO-HSA e (iii) NDO-LID. Testes imunoenzimáticos (ELISA) baseados na detecção de anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA foram padronizados e avaliados utilizando soros de pacientes multibacilares (MB, n = 18) e paucibacilares (PB, n = 20), além de contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares (CMB, n = 28) e paucibacilares (CPB, n = 20). Foram também analisados os níveis de IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 após estímulo de PBMC com os antígenos LID-1, NDO-LID and NDO-HSA em pacientes com hanseníase MB (10) e PB (10) e indivíduos dos grupos CPB (08) e CMB (09). Os resultados mostraram que apenas pacientes multibacilares apresentam títulos elevados de anticorpos contra os três antígenos avaliados. Os anticorpos IgM apresentaram maior reatividade com o antígeno NDO-HSA, enquanto que anticorpos IgG apresentaram maior reatividade com o antígeno LID-1. O teste utilizando a combinação NDO-LID-1 favoreceu a detecção de anticorpos IgM e IgG. A análise da curva ROC mostrou que valores da área sob a curva (AUC) do antígeno NDO-HSA foi significativamente menor do que as AUC dos antígenos LID-1 e NDO-LID. Em relação à reatividade de subclasses de IgG, pacientes MB apresentaram reatividade de IgG1 > IgG3 > IgG2 > IgG4, contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com os grupos PB, CMB e CPB. O teste IgM anti-NDO-HSA frente a soros de pacientes MB apresentou sensibilidade de 70% e especificidade de 98%. Testes IgG anti-LID-1, anti-NDO-LID e anti-NDO-HSA, mostraram valores de sensibilidade e especificidade de 90 e 100, 95 e 98, 85 e 78, respectivamente. Testes IgG1 contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA mostraram sensibilidade de 90, 90 e 75, e especificidade de 100, 90 e 88, respectivamente. Com relação à contribuição das citocinas na infecção pelo *M. leprae*, os resultados demonstraram que a produção de IL-17 foi significativamente maior no

grupo PB após estímulo com os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA. Além disso, a estimulo com o antígeno LID-1 também levou ao aumento da produção de IFN, TNF e IL-2 neste mesmo grupo de indivíduos. Por outro lado, foi possível observar que o grupo MB apresentou maior produção de IL-6 após estímulo com LID-1, e IL-4 após estímulo com LID e NDO-LID. Esses resultados sugerem que testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos IgG, IgG1 e IgM podem representar ferramentas úteis no diagnóstico da hanseníase. Neste sentido, os resultados indicam um melhor desempenho dos antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação ao antígeno NDO-HSA. E que a pesquisa de citocinas contra os antígenos em questão constitui bons biomarcadores para a caracterização das formas clínicas de hanseníase.

Palavras-Chave: Hanseníase. Sorodiagnóstico. Proteínas recombinantes. LID-1. NDO-LID. NDO-HAS.

ABSTRACT

Leprosy is still a serious health problem in Brazil and in several regions of the world. Difficulties in leprosy diagnosis result in delayed treatment and more severe disabilities. The objective of this study was to evaluate the diagnostic potential of three *M. leprae* specific antigens: (i) LID-1, a fusion of the recombinant proteins ML0405 and ML2331; (ii) NDO-HSA, a conjugate formed by natural octyl disaccharide bound to human serum albumin; and, (iii) NDO-LID, a combination of LID-1 and NDO. Sera from multibacillary (MB, n=18) and paucibacillary (PB, n=20) leprosy patients and household contacts (HHC) from MB (n=28) and PB (n=20) were used to measure IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 responses by ELISA. We also analyzed the levels of IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 After PBMC stimulation with the LID-1, NDO-LID and NDO-HSA antigens in MB (10) and PB (10) leprosy patients and HHC-PB (08) and HHC-MB (09). Our results show that MB patients have high titers of antibodies against the evaluated antigens in comparison to PB patients and HHC groups. IgM antibodies showed higher reactivity to NDO-HSA, while IgG reactivity was higher against LID-1. No difference in antibody reactivity was observed between the HHC-MB and HHC-PB groups, or between HHC groups and endemic controls (n = 21). Receiver operating characteristic (ROC) analysis showed that the values of the area under the curve (AUC) for IgG responses to LID-1 and NDO-LID were higher in comparison to AUC values to NDO-HSA. ROC analysis indicated sensitivity of 70% and specificity of 98% for IgM against NDO-HSA in MB patients. IgG tests against LID-1, NDO-LID and NDO-HSA showed sensitivity and specificity values of 90 and 100%, 95 and 98%, 85 and 78%, respectively, while IgG1 tests indicated sensitivity of 90, 90 and 75%, and specificity of 100, 90 and 88%, respectively. About the contribution of the cytokines in *M. leprae* infection, our results demonstrated that IL-17 production was significantly higher in the PB group after stimulation with the LID-1, NDO-LID and NDO-HSA antigens. In addition, stimulation with the LID-1 antigen also led to increased production of IFN, TNF and IL-2 in this same group of individuals. On the other hand, it was possible to observe that the MB group presented higher IL-6 production after stimulation with LID-1 and IL-4 after stimulation with LID and NDO-LID. These results suggest that serological tests based on

the detection of IgG, IgG1 and IgM antibodies may represent useful tools in the diagnosis of leprosy, and indicates a better performance of the LID-1 and NDO-LID antigens. And that cytokine research against the antigens in question constitute good biomarkers for the characterization of the clinical forms of leprosy.

Key-words: Leprosy. Serodiagnosis. *M. leprae* antigens. LID-1. Natural octyl disaccharide. Antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Níveis séricos de anticorpos IgM, IgG e IgG1 contra os antígenos LID-1, NDO-LID, NDO-HSA em indivíduos controle endêmicos (CE) e contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar (CPB e CMB). As barras representam a mediana. IE = Índice ELISA.59
- Figura 2 - Níveis séricos de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA, em indivíduos com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) e em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase paucibacilar (CPB) e multibacilar (CMB). As barras representam a mediana. IE = índice ELISA.61
- Figura 3 - Níveis séricos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em indivíduos com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) e em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar (CPB e CMB). As barras representam a mediana. IE = índice ELISA.62
- Figura 4 - Curva ROC para as respostas de IgG contra LID-1 versus NDO-LID (A), LID-1 versus NDO-HSA (B) e NDO-LID versus NDO-HSA (C); e IgM contra LID-1 versus NDO-LID (D), LID-1 versus NDO-HSA (E) e NDO-LID versus NDO-HSA (F).64
- Figura 5 - Produção de IL-17, IL-2, IFN- γ e TNF- α por PBMCs estimulados com LID-1, NDO-LID e NDO-HSA (2 μ g/ml) em indivíduos controle edêmico (CE), pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de PB (CPB) e MB (CMB).67
- Figura 6 - Produção de IL-4, IL-6 and IL-10 por PBMCs estimulados com LID-1, NDO-LID e NDO-HSA (2 μ g/ml) em indivíduos controle edêmico (CE), pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de PB (CPB) e MB (CMB).68

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Proteínas recombinantes específicas do <i>M. leprae</i> estudadas nos últimos anos. | 44 |
| Tabela 2 - Características dos participantes do estudo. | 51 |
| Tabela 3 - Sensibilidade e Especificidade dos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA no sorodiagnóstico da hanseníase multibacilar. | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| BCG | Bacilo de Calmette e Guérin |
| BSA | Albumina do soro bovino (do inglês: “Bovine Serum Albumin”) |
| LT CD4 | Linfócitos T auxiliares (do inglês: “LT helper”) |
| LT CD8 | Linfócitos T citotóxicos |
| CMB | Contato de paciente multibacilar |
| CPB | Contato de paciente paucibacilar |
| CR1 | Receptor do complemento 1 (do inglês: “complement receptor 1”) |
| CR3 | Receptor do complemento 3 (do inglês: “complement receptor 3”) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| GM-CSF | Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos |
| HHC – PB | household contact of paucibacillary |
| HHC – MB | household contact of multibacillary |
| HDD | Hanseníase dimorfa-dimorfa |
| HDT | Hanseníase dimorfa-tuberculóide |
| HDV | Hanseníase dimorfa-virchowiana |
| HI | Hanseníase indeterminada |
| HSP-20 | Proteína do choque térmico (do inglês: “heat shock protein”) |
| HT | Hanseníase tuberculóide |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgG1 | Imunoglobulina G subtipo 1 |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-4 | Interleucina 4 |

| | |
|-------|---|
| IL-5 | Interleucina 5 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| LAM | Liporabinomanana |
| MB | Multibacilar |
| NOD | receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPD | Tampão citrato de sódio/ácido cítrico |
| PAMP | Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: “patogen associate molecular pattern”) |
| PB | Paucibacilar |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato (do inglês: “phosphate buffer saline”) |
| PBST | Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (do inglês: “phosphate buffer saline with Tween”) |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (do inglês: “polimerase chain reaction”) |
| PGL-1 | Glicolípídeo fenólico - 1 |
| PNCH | Programa Nacional de Controle da Hanseníase |
| PQT | Poliquimioterapia |
| PRR | Receptores de reconhecimento de padrões |
| RNI | Intermediários reativos de nitrogênio (do inglês: “reactive nitrogen intermediaries”) |
| ROI | Intermediários reativos de oxigênio (do inglês: “reactive oxigen intermediaries”) |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| Th1 | Resposta imune celular do tipo 1 ou linfócitos T auxiliares do tipo 1 |
| Th2 | Resposta imune celular do tipo 2 ou linfócitos T auxiliares do tipo 2 |
| TLR1 | Receptor do tipo toll 1 |
| TLR4 | Receptor do tipo toll 4 |

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| TLR9 | Receptor do tipo toll 9 |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 DESENVOLVIMENTO | 19 |
| 2.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS..... | 19 |
| 2.2 EPIDEMIOLOGIA | 20 |
| 2.3 MYCOBACTERIUM LEPRAE..... | 22 |
| 2.4 FORMAS CLÍNICAS..... | 24 |
| 2.5 TRANSMISSÃO..... | 27 |
| 2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA..... | 28 |
| 2.7 DIAGNÓSTICO..... | 36 |
| 2.8 TRATAMENTO | 42 |
| 3 OBJETIVOS | 43 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 43 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 43 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 44 |
| 4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA | 44 |
| 4.2 COLETA DE DADOS E EXAME CLÍNICO | 45 |
| 4.3 COLETA DE SANGUE..... | 45 |
| 4.4 MÉTODO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS..... | 46 |
| 4.5 ANTÍGENOS..... | 47 |
| 4.6 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS PELO MÉTODO CBA | 47 |
| 4.7 RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVE - CURVA ROC | 48 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 5 RESULTADOS | 50 |

| | |
|---|----|
| 5.1 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGG E IGG1 CONTRA OS ANTÍGENOS LID-1, NDO-LID E NDO-HSA EM AMOSTRAS DE SORO DE INDIVÍDUOS CONTROLE ENDÊMICOS E CONTATOS INTRADOMICILIARES DE PACIENTES COM HANSENÍASE RESIDENTES NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO..... | 50 |
| 5.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGG E SUBCLASSES DE IGG CONTRA OS ANTÍGENOS LID-1, NDO-LID AND NDO-HSA EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM HANSENÍASE E CONTATOS INTRADOMICILIARES RESIDENTES NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. | 52 |
| 5.3 ANÁLISE DAS CURVAS ROC DOS TESTES DE ELISA PARA OS ANTÍGENOS LID-1, NDO-LID E NDO-HSA | 55 |
| 5.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM RESPOSTA ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LID-1, NDO-LID E NDO-HSA | 58 |
| 6 DISCUSSÃO | 62 |
| 7 CONCLUSÕES | 72 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |
| 9 ANEXOS | 87 |
| 9.1 ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 87 |

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença bacteriana antiga que, embora curável, ainda carrega grande preconceito e estigma. É uma doença infectocontagiosa que continua a ser um significativo problema de saúde pública em muitas partes do mundo (WHO, 2016; BRASIL, 2016). O coeficiente de detecção da hanseníase no Brasil ainda é considerado alto. Em 2015 foram diagnosticados 28.761 novos casos, com uma taxa de detecção de 14,07/100.000 habitantes e 78,2% dos contatos examinados (BRASIL, 2016). Diante desta situação, o Brasil se mantém como o segundo país em número de casos absolutos da hanseníase, perdendo apenas para a Índia, que registrou 127.326 casos novos em 2015 (BRASIL, 2016; WHO, 2016).

O diagnóstico precoce e o tratamento regular são fundamentais para reduzir fontes de transmissão e para prevenir formas graves da hanseníase. Apesar do impacto positivo da poliquimioterapia na redução da prevalência global da doença, esforços adicionais são necessários para reduzir sua incidência (SOARES et al, 2000). Estes esforços devem incluir o desenvolvimento de uma vacina eficaz com potencial profilático e de novos métodos de diagnóstico (DUTHIE et al. 2011).

Embora o *M. leprae* tenha a capacidade de infectar grande número de indivíduos, poucos adoecem devido à baixa patogenicidade do bacilo, propriedade esta que não é função apenas de suas características intrínsecas, mas que depende, sobretudo, de sua relação com o hospedeiro e do grau de endemicidade do meio (OPROMOLLA, 2000; SAMPAIO et al, 2011).

O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da doença, por isso existe uma preocupação com os indivíduos chamados de contatos domiciliares (pessoa que mora ou morou com o doente nos últimos cinco anos) (OPROMOLLA, 2000). Estes indivíduos são obrigatoriamente registrados e posteriormente convocados para integrarem uma estratégia de vigilância, iniciada pelo exame dermatoneurológico e prescrição de BCG (WHO, 2016; BRASIL, 2016). Erros no diagnóstico ou sub-diagnóstico podem acontecer pelas dificuldades em se fazer uma avaliação essencialmente clínica e ainda pela escassez de sintomas no início da doença.

No Brasil, a cobertura de exame de contatos de casos novos de hanseníase mantém-se abaixo do preconizado pela OMS, indicando necessidade de investimentos. Além disso, as ações de controle vêm sendo realizadas de forma heterogênea, apesar dos esforços instituídos, tendendo à centralização, o que pode contribuir para a manutenção da endemia (RODRIGUES, 2012). Contatos domiciliares de casos de hanseníase têm risco maior de adoecimento (MATOS, 1999). Recentemente demonstrou-se que os casos que foram diagnosticados no momento do exame de contatos e que iniciaram imediatamente o tratamento, apresentaram menor chance de complicações clínicas. Esses dados reforçam que a vigilância de contatos deve ser a estratégia determinante no controle da hanseníase (MATOS, 1999; WHO, 2016).

Sendo o diagnóstico da doença essencialmente clínico, torna-se relevante a utilização de técnicas que permitam uma melhor avaliação do espectro clínico da doença. A incorporação de ferramentas para diagnóstico contribui na identificação de potenciais casos novos entre contatos. A fim de auxiliar na tomada de decisões sobre quem precisa de tratamento em uma fase pré-clínica ou estágio clínico inicial, novos testes diagnósticos para a hanseníase precisam ser altamente específicos, bem como sensíveis, para detectar a doença precocemente. São necessários testes que avaliem (múltiplos) biomarcadores que indiquem infecção por *M. leprae* e/ou que prevejam o desenvolvimento da doença em indivíduos infectados. Essa detecção precoce da hanseníase é considerada um passo essencial para ajudar a prevenir que sequelas imunopatológicas ocorram, e assim ajudar a interromper a transmissão do *M. leprae* e a incidência da doença (GELUK, 2013).

Testes sorológicos para identificação de anticorpos específicos, e testes celulares envolvendo a produção de citocinas/quimiocinas e expressão de marcadores de superfície celular após a estimulação de leucócitos com antígenos específicos do *M. leprae*, podem ser utilizados como marcadores de infecção subclínica. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo consiste em avaliar parâmetros imunológicos com potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase utilizando antígenos específicos do *Mycobacterium leprae*. Essa abordagem poderá possibilitar uma identificação precoce de indivíduos infectados ou que apresentam um maior risco de adoecer, que podem estar envolvidos na manutenção da cadeia de transmissão da hanseníase.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS

A hanseníase é uma doença granulomatosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), bacilo álcool-ácido resistente (GOULART et al., 2009; LYON e GROSSI, 2013). É transmitida no contato interpessoal, através do convívio de indivíduos suscetíveis com doentes contagiantes que ainda não receberam tratamento, com período médio de incubação de 2 a 5 anos (GOULART et al., 2010; SAMPAIO et al. 2011). O diagnóstico da doença é eminentemente clínico, através do exame dermatoneurológico, e é apoiado por recursos complementares como a baciloscopia de raspado dérmico, histopatologia e teste da histamina (REECE et al., 2006; LYON e GROSSI, 2013). Suas manifestações clínicas comportam-se de forma espectral, devido a uma imbricada combinação de fatores, que vão desde a imunologia, virulência do bacilo e genética da defesa do hospedeiro (GOULART et al., 2009).

Na fisiopatogenia da infecção causada pelo *M. leprae* no homem encontra-se o principal motivo para a relevância epidemiológica, social, econômica e cultural da hanseníase na sociedade: é primariamente uma doença neurológica, dada a predileção do bacilo de Hansen em se propagar para nervos periféricos (MONTROYA et al., 2009). O dano neural é devido à proliferação bacilar direta ou à resposta imunológica do hospedeiro contra os bacilos que lá se encontram. Tais mecanismos são os implicados na sintomatologia neural e, finalmente, na manutenção do estigma acerca da doença (GOULART et al., 2010).

No Brasil, a denominação hanseníase foi legalmente determinada em 1976 com o objetivo de diminuir o estigma, trazer nova compreensão desta doença e ampliar a detecção de novos casos (MONTROYA et al., 2009). Tida como negligenciada, recentemente, vem sendo alvo de intensificação para pesquisas e estudos, não só na área operacional e epidemiológica, mas também nas ciências básicas e quanto aos aspectos moleculares e genéticos (SILVA et al., 2011).

O domicílio é apontado com *importante* espaço de transmissão da doença, de maneira que contatos intradomiciliares de indivíduos com hanseníase vêm sendo alvo de

pesquisas atuais (DURÃES et al., 2010). Sabe-se que contatos intradomiciliares de casos de hanseníase têm risco maior de adoecimento (FINE, 2012). Recentemente demonstrou-se que os casos que foram diagnosticados no momento do exame de contatos e que iniciaram imediatamente o tratamento, apresentaram menor chance de complicações clínicas. Esses dados reforçam que a vigilância de contatos deve ser a estratégia determinante no controle da doença (CONTIN et al, 2011).

Sendo o diagnóstico da doença essencialmente clínico, torna-se relevante a utilização de técnicas que permitam uma melhor avaliação do espectro clínico da doença. A incorporação de ferramentas para diagnóstico contribui na identificação de potenciais casos novos, entre contatos. Testes sorológicos para identificação de anticorpos contra o glicolípido fenólico1 (α -PGL1) do *M. leprae* podem ser utilizados como marcadores de infecção subclínica, e auxiliam na classificação em Paucibacilar e Multibacilar. Mais recentemente, a decodificação do genoma completo do *M. leprae*, e o advento de novas ferramentas de biologia molecular, têm permitido a produção de proteínas recombinantes, e sua avaliação como antígenos potenciais para o diagnóstico da hanseníase (GELUK et al, 2010; RICHARDUS, OSKAM, 2015). O monitoramento dos contatos com o auxílio dessas ferramentas subsidiará elaboração de modelos que detectem indivíduos com maior risco de adoecer e que precisariam de acompanhamento diferenciado (DUPPRE, 2012; MARTINEZ, 2011; CABRAL et al. 2013;).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com relatórios oficiais a prevalência mundial da hanseníase no início de 2014 foi de 213.899 casos novos registrados, com coeficiente de detecção de 3,78/100.000 habitantes (WHO, 2015). De acordo com dados da OMS, foram registrados no Brasil 26.395 novos casos de hanseníase no ano de 2015 (WHO, 2016a). As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil são consideradas as de maior endemicidade para hanseníase, com áreas de importante manutenção da transmissão da doença (WHO, 2016). Neste aspecto, o Brasil destaca-se, figurando em

segundo lugar no mundo, em numero de detecção de novos casos, ficando a Índia com a primeira posição (WHO, 2015). Foram registrados, em 2014, casos de hanseníase em 31 países das americas, os quais somam 33.789 casos novos (coeficiente de detecção: 3,75/100.000 habitantes), ficando o Brasil em primeiro lugar nas américas com aproximadamente 92% do total de casos novos registrados (WHO, 2015).

Em trabalho realizado pelo grupo do Programa Nacional de Controle da Hanseníase (PNCH), os casos de hanseníase de 2005 a 2007 foram alocados espacialmente nas coordenadas geográficas das sedes dos municípios para delimitação de clusters correspondentes às áreas de maior risco. Segundo dados disponibilizados pela Coordenação do PNCH, os 10 clusters identificados incluem 1173 municípios, que representam 53,5% dos casos novos detectados no período considerado e apenas 17,5% da população do país (BRASIL, 2007).

Atualmente são descritos 26 clusters, identificados a partir da análise dos casos notificados no período de 2007 a 2009. Nas áreas de cluster a taxa de detecção média de casos de hanseníase, no período 2007 a 2009, foi de 56,16/100 mil habitantes, valor superior ao restante do Brasil, que foi de 20,58 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2010b).

No Estado de Minas Gerais, a taxa de detecção de casos novos de hanseníase em municípios que compõem os clusters é de 37,02/100.000 habitantes, há 9,89% da população em clusters, os quais agregam 36,28% dos casos. O município de Governador Valadares encontra-se no cluster 6, formado por parte dos Estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (BRASIL, 2010b). Governador Valadares e região, destacam-se no contexto estadual e nacional pela manutenção de coeficientes de detecção da hanseníase elevados, classificando-o como município hiperendêmico. De 2001 a 2006 o coeficiente de detecção variou de 60,7 a 184,3 (MORAIS, 2010). De acordo com os dados do SINAN, no período de 2010 a 2013 foram notificados 485 casos de hanseníase, sendo que conforme a classificação operacional 226 são paucibacilares e 259 são multibacilares. No estado do Rio de Janeiro foi possível identificar o cluster 24, no qual a taxa de detecção de casos novos é de 39,01/100.000 habitantes, 0,63% da população e 1,92% dos casos diagnosticados. A capital do estado, a cidade do Rio de Janeiro, apresenta uma taxa de detecção de casos de

5,9/100.000 habitantes. Esse caráter endêmico das regiões citadas, indica a necessidade de aprimorar diretrizes para um diagnóstico precoce e controle da hanseníase nessa cidade.

2.3 MYCOBACTERIUM LEPRAE

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta preferencialmente macrófagos e que tem uma particular afinidade por células de Schwann no sistema nervoso (SCOLLARD et al., 2006; EICHELMANN et al., 2013), provocando a destruição dos nervos periféricos, que resulta em incapacidades irreversíveis (CABALAR et al., 2014). É uma bactéria imóvel, de forma reta ou ligeiramente curva, que não esporula, microaerofílica e ácido-álcool resistente. (SCOLLARD et al., 2006). O bacilo não é cultivado em meio artificial, mas pode ser mantido em culturas axênicas onde permanece com um estado metabólico estável por algumas semanas (TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001). Como resultado, a propagação do *M. leprae* fica restrita a modelos animais, incluindo o tatu (TRUMAN, 2005) e camundongos normais, atímicos e *knockouts* para genes específicos (KRAHENBUHL; ADAMS, 2000). Estes sistemas têm fornecido recursos básicos para estudos genéticos, metabólicos e antigênicos do bacilo. O crescimento do *M. leprae* em pata de camundongo também oferece uma ferramenta útil para avaliar a viabilidade de uma preparação de bactérias e realizar testes de suscetibilidade de isolados clínicos a drogas (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

O *M. leprae* tem um genoma de aproximadamente 3.2 Mb, que é significativamente menor do que as demais micobactérias, e a ausência de genes fundamentais pode implicar na carência de vias enzimáticas críticas, sendo, desta forma, necessário o parasitismo (GELUK, DUTHIE, SPENCER 2011). O envelope do *M. leprae* é constituído por três compartimentos: membrana plasmática, parede celular e a cápsula. A membrana plasmática é uma bicamada assimétrica composta principalmente de fosfolípidos e proteínas. O lipoarabinomannan (LAM), componente do *M. leprae*, encontra-se ancorado à membrana plasmática via fosfatidilinositol (COLE; SUPPLY;

HONORE, 2001). A parede celular determina a forma e o tamanho da micobactéria e é composta por peptidoglicana. A peptidoglicana confere rigidez ao envelope do microrganismo (COLE; SUPPLY; HONORE, 2001). O *M. leprae* apresenta uma densa cápsula de lipídeos, externa à parede celular, que é rica em PGL-1 (glicolípido fenólico) (BUHRER-SEKULA et al., 2007). Esta cápsula vem sendo relacionada à resistência a radicais livres, permitindo a sobrevivência intracelular da micobactéria e limitando a penetração de drogas antimicrobiana (BUHRER-SEKULA et al., 2007). Estudos anteriores já mostraram que o PGL-1 pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares (CABRAL et al., 2013).

Além de se ligar a uma ou mais moléculas receptoras específicas, o *M. leprae* interage com o colesterol da membrana plasmática, o que estabiliza a ligação da micobactéria com o macrófago, permitindo sua posterior internalização (GARFIELD; PIETERS, 2000). A temperatura é um importante fator para a sobrevivência do *M. leprae* na célula hospedeira. Em macrófagos humanos o *M. leprae* manteve a sua viabilidade quando as células foram cultivadas a 35°C durante 4 semanas na ausência da citocina IL-10. No entanto, a viabilidade do *M. leprae* foi quase perdida em duas semanas, quando este foi cultivado a 37°C (FUKUTOMI et al., 2009). Quanto aos componentes bacterianos críticos para o tropismo, Rambukkana e colaboradores (2002) demonstraram o envolvimento do PGL-1 na afinidade do *M. leprae* pelos nervos periféricos. Mais tarde, acumularam-se evidências apontando a célula de Schwann como o alvo para o bacilo.

Alves e colaboradores (2004) demonstraram que o *M. leprae* viável pode interferir na via endocítica de maturação do fagossoma nas células de Schwann. Entretanto, o *M. leprae* inativado percorre a via normal de maturação endocítica. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a ativação intracelular de PTK (proteína tirosina quinase), PKC (proteína quinase dependente de cálcio) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) é necessária para a fagocitose da bactéria, tal como ocorre na infecção de monócitos humanos por *M. leprae* e BCG (LIMA et al., 2001). Na impossibilidade de estudar a interação de *M. leprae* vivo com células humanas, já que esta bactéria não é cultivável, ensaios com outras micobactérias patogênicas têm sido largamente utilizados para analisar alguns aspectos da infecção por micobactérias. Entre elas, o *M.*

avium que tem despertado interesse clínico, por ser uma das micobactérias que mais afetam pacientes infectados com HIV, cujo mecanismo de infecção ainda não está completamente elucidado (TURENNE; WALLACE, 2007).

2.4 FORMAS CLÍNICAS

As manifestações clínicas da hanseníase dependem mais da resposta imunológica do hospedeiro ao *M. leprae*, frente à capacidade de multiplicação bacilar. (MOSCHELLA, 2004; WALKER e LOCKWOOD, 2007; RODRIGUES e LOCKWOOD, 2011). O *M. leprae* possui tropismos pela pele e nervos periféricos, manifestando clinicamente por sinais e sintomas dermatoneurológicos. As manifestações cutâneas mais comuns são máculas discrômicas, pápulas, infiltrações, tubérculos e nódulos (LYON e GROSSI, 2013). Já o acometimento neurológico manifesta por processo inflamatório agudo nos nervos periféricos (neurite), podendo ser observado dor, espessamento neural, diminuição ou perda de sensibilidade e de força muscular nas áreas cujos nervos foram acometidos. Quando essas alterações não são diagnosticadas e tratadas corretamente, evoluem para deformidades físicas e consequente incapacidade (WALKER e LOCKWOOD, 2007; BRASIL, 2010).

Para o melhor entendimento do espectro da hanseníase, foram propostas classificações das formas clínicas da doença. Em 1953, foi proposta a classificação de Madri, que se baseou nas características clínicas e baciloscópicas para dividir a hanseníase em dois polos - um instável (indeterminado e dimorfo) e outro estável (tuberculóide e lepromatoso) (BRASIL, 1960). Em 1962, Ridley e Jopling, propuseram uma classificação mais completa, baseada em critérios clínicos, baciloscópicos, histopatológicos e imunológicos. Consideraram as formas polares tuberculóide-tuberculóide e lepromatoso-lepromatoso e subdividiram a dimorfa, de acordo com a proximidade dos polos, em: dimorfa-tuberculóide, dimorfa-dimorfa e dimorfa-lepromatoso (RIDLEY-JOPLING, 1966). Essa classificação é utilizada atualmente por diversos pesquisadores (LASTÓRIA e ABREU, 2012).

Com o propósito de facilitar o diagnóstico e a definição terapêutica em todos níveis de atenção a saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS), definiu a classificação operacional baseada apenas em critérios clínicos, considerando paucibacilar (PB) casos com até cinco lesões de pele e multibacilar (MB) casos com mais de cinco lesões de pele. A baciloscopia positiva, quando disponível, classifica o caso como MB, independente do número de lesões (BRASIL, 2016).

A hanseníase tuberculóide (HT) é uma forma estável, que manifesta clinicamente lesões cutâneas constituídas por pápulas ou placas bem delimitadas eritemato-acastanhadas, única ou múltiplas e de formas e tamanhos variados. A neuropatia periférica é comum, podendo trazer sequelas que levam a incapacidades e deformidades físicas, sociais e psicológicas (SCOLLARD et al., 2006). Trata-se de uma forma não contagiosa da doença (BOER et al., 2015). Histopatologicamente, encontram-se poucos granulomas coesos, constituídos por histiócitos epitelióides e ocasionais células gigantes tipo Langhans, contornados por bainha linfocitária. Apresentam escassez de bacilos e tríplice distribuição, perianexial, perivascular e perineural (GROSSI, 2010). Na forma tuberculóide, ocorre resposta imune mediada por células Th1, produtoras de IFN- γ , linfotoxinas ou TNF- α e IL-2, que induzem a formação de granulomas e limitam com sucesso a replicação do bacilo (ANNUNZIATO, 2014).

As formas clínicas intermediárias – dimorfa-tuberculóide (HDT), dimorfa-dimorfa (HDD) e dimorfa-lepromatosa (HDL) – caracterizam-se por numerosas lesões na pele, de aspectos variáveis e um forte acometimento dos nervos periféricos. A carga bacilar tende a ser negativa na HDT, intermediária na HDD e alta na HDL, sendo as duas últimas formas consideradas contagiosas (SCOLLARD et al., 2006). O quadro histopatológico é intermediário entre as duas formas polares HT e HV (GROSSI, 2010).

A hanseníase virchowiana apresenta muitas lesões cutâneas sem limites precisos. Pode ocorrer a fácies leonina, na qual encontra-se infiltração acentuada na face, com expressão dos sulcos naturais e perda das sobrancelhas (madarose). Nesta forma é encontrada uma alta carga bacilar, sendo a forma mais contagiosa. Caracteriza-se histologicamente pela presença de macrófagos vacuolados acompanhados por plasmócitos, estendendo-se pelo tecido subcutâneo e permeando anexos epidérmicos. Bacilos são comumente visualizados (SAMPAIO et al. 2011).

Existe também a hanseníase indeterminada (HI), que classicamente é a primeira manifestação clínica da doença, onde surge uma mancha com alteração da sensibilidade (SCOLLARD et al., 2006). Essas lesões frequentemente evoluem para cura espontânea, mas em aproximadamente 25% dos casos evoluem para outras formas clínicas da doença. Não são encontrados bacilos nessa forma clínica. Nos cortes histológicos é visualizado exclusivamente infiltrado linfocitário com distribuição perianexial, perivascular e perineural. Não havendo granulomas formado (GROSSI, 2010).

A hanseníase neural pura pode ocorrer em 5 a 15% dos pacientes. Caracteriza-se pelo acometimento assimétrico de nervos periféricos e ausência de manifestações cutâneas. É uma forma de difícil diagnóstico, podendo ser utilizado exames complementares como eletroneuromiografia e biópsia do nervo para confirmação do caso (JARDIM et al., 2007).

Episódios reacionais são fenômenos agudos ou subagudos sobrepondo à evolução crônica da hanseníase, decorrentes da resposta imunológica e processo inflamatório mediados por antígenos do *M. leprae*. Podem ocorrer antes, durante e após o tratamento. Paciente com alta carga bacilar (índice baciloscópico maior ou igual a 2), no diagnóstico, tem maior risco de apresentar reações (BRASIL, 2013; LYON e GROSSI, 2013). Há dois tipos de estados reacionais, as reações tipo 1 e as reações tipo 2.

A reação tipo 1 ou reação reversa ocorre em pacientes que apresentam algum grau de imunidade celular, como os tuberculóides e dimorfos. Envolvem, principalmente, mecanismos da imunidade mediada por células ou por reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV) (NERY et al., 2013). As lesões preexistentes tornam-se mais eritemato-edematosas e infiltradas. As máculas tornam-se placas com limites bem definidos. Novas lesões podem aparecer nas áreas adjacentes. Concomitante a essas alterações, pode ocorrer neurite nos nervos periféricos, com perda da função sensitivo-motora e conseqüentemente sequelas e incapacidades físicas. Essa é uma das mais frequentes e graves complicações da reação reversa. Em geral, não há comprometimento sistêmico. A detecção desses sinais requer acompanhamento

rigoroso e tratamento precoce com corticoterapia. (HASTING et al., 1986; SAMPAIO E RIVITTI, 2007).

A reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico acomete pacientes multibacilares como os virchowianos e dimorfos. Consiste, predominantemente, por reação inflamatória desencadeada por imunocomplexos (reação de hipersensibilidade do tipo III). Ocorre o aparecimento súbito de nódulos eritêmato-violáceos dolorosos, de tamanhos variados, com distribuição simétrica e bilateral, acometendo principalmente face, membros superiores e inferiores. Em casos graves, essas lesões podem evoluir com formação de bolha, ulceração e necrose. Podem estar presentes manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar, neuropatia, orquitepididimite, glomerulonefrite (por imunocomplexos), miosite, artralgia, sinovite, dactilite, iridociclite e uveíte, hepatoesplenomegalia, infartamento ganglionar generalizado, rinite, epistaxe, insônia e depressão. Todos os casos diagnosticados devem fazer repouso e receber anti-inflamatório, sendo os mais utilizados o corticosteróide e a talidomida (SAMPAIO E RIVITTI, 2007; LYON E GROSSI, 2013).

2.5 TRANSMISSÃO

Acredita-se que o principal modo de transmissão do *M. leprae* seja pela propagação de aerossol de secreções nasais e absorção através da mucosa nasal ou respiratória (NETO, 2000). O período de incubação da doença varia de 2 a 5 anos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Embora o *M. leprae* tenha a capacidade de infectar grande número de indivíduos, poucos adoecem devido a sua baixa patogenicidade, propriedade esta que não é função apenas de suas características intrínsecas, mas que depende, sobretudo, de sua relação com hospedeiro e do grau de endemicidade do meio (OPROMOLLA, 2000; SAMPAIO et al., 2011). O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da doença, por isso, existe uma preocupação com os indivíduos chamados de contatos (pessoa que convive ou conviveu de forma prolongada com o caso novo de hanseníase diagnosticado – caso índice) (OPROMOLLA, 2000; SAMPAIO et al., 2011; BRASIL, 2016).

Considera-se contato domiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase. Contato social é qualquer pessoa que conviva ou tenha convivido em relações familiares ou não, de forma próxima e prolongada. Os contatos sociais, que incluem vizinhos, colegas de trabalhos e de escola, entre outros, devem ser investigados de acordo com o grau e tipo de convivência, ou seja, aqueles que tiveram contato muito próximo e prolongado com o paciente não tratado. Atenção especial deve ser dada aos contatos familiares do paciente (pais, irmãos, avós, tios etc.) (BRASIL, 2016). Estes indivíduos são obrigatoriamente registrados e posteriormente convocados para integrarem a uma estratégia de vigilância, iniciada pelo exame dermatoneurológico e prescrição de BCG (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016).

Dentre as ações de controle e vigilância epidemiológica da hanseníase está a medida imunoprolática, que se dá por meio da administração intradérmica da BCG (RICHARDUS; OSKAM, 2015). No Brasil, a BCG-ID é oficialmente recomendada para contatos domiciliares de casos de hanseníase, sem presença de sinais e sintomas da doença, no momento da avaliação. A aplicação da vacina BCG depende da história vacinal e segue as seguintes recomendações: contato sem cicatriz aplicasse uma dose; contato com uma cicatriz aplica-se uma dose e contato com duas cicatrizes não é indicado aplicar nenhuma dose (BRASIL, 2010a).

A avaliação do uso de quimioprolaxia nos grupos de contatos de casos de hanseníase, configura-se como uma importante medida prolática para a doença. Há evidências de que a quimioprolaxia é efetiva na prevenção da hanseníase em áreas endêmicas e, portanto, pode contribuir para a redução de novos casos da doença (SMITH; SMITH, 2000). As drogas utilizadas como medida quimioprolática são a rifampicina, acedapsona e dapsona (REVEIZ; BUENDÍA; TÉLLEZ, 2009). As evidências científicas acumuladas ao longo dos anos apontam para a eficácia da quimioprolaxia com rifampicina em dose única (RICHARDUS; OSKAM, 2015).

2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Patógenos intracelulares tais como as micobactérias, são reconhecidos por células fagocitárias da imunidade inata, direta ou indiretamente via diferentes receptores. A ativação celular através do receptor do tipo Toll (TLR) pode contribuir para os mecanismos de defesa do hospedeiro regulando a fagocitose e ativando mecanismos antimicrobianos (STEFANI, 2008). O espectro da hanseníase é um dos exemplos mais claros de como um mesmo patógeno pode gerar apresentações clínico-patológicas distintas dependendo do perfil da resposta imune do hospedeiro. Tendo em vista que as vias aéreas superiores representam a via de transmissão do *M. leprae* melhor estabelecida (ARAUJO et al., 2016), as células dendríticas (DCs) da mucosa nasal do hospedeiro podem representar as primeiras células do sistema imune que reconhecem o bacilo por meio dos PRRs (*Pattern recognition receptors*) (DEMANGEL; BRITTON, 2000). As DCs são células apresentadoras de antígenos profissionais que foram definidas inicialmente por sua potente capacidade de ativar células T *naïve* e gerar uma resposta de células T eficaz. Além disso, atualmente já é bem estabelecido seu papel na manutenção da tolerância periférica de células T (MOSER, 2003).

Os macrófagos são as células hospedeiras primárias do *M. leprae*, desempenhando importante papel na defesa do organismo o bacilo. Os macrófagos estão envolvidos no reconhecimento/captura, processamento e apresentação de antígenos, além da secreção de citocinas, contudo, na ausência de uma resposta imune adaptativa eficaz, os bacilos podem se multiplicar no seu interior (SCOLLARD et al., 2006).

Vários PRRs estão envolvidos no reconhecimento do *M. leprae* pelas DCs e macrófagos. Os receptores para fragmentos do sistema complemento, como CR1, CR3 e CR4 promovem a fagocitose do *M. leprae*. O PGL-I, um lipídeo específico da parede celular do *M. leprae* é reconhecido pelo CR3 (TABOURET et al., 2010). Os receptores *Toll-like* (TLR) são cruciais para o reconhecimento de microorganismos por macrófagos e células dendríticas durante a resposta imune inata (BEUTLER, 2009). Até o momento já foram identificados dez TLRs em humanos (O'NEILL et al., 2013). Os heterodímeros de TLR2-TLR1 e os homodímeros TLR2 e TLR4 são essenciais para o reconhecimento de micobactérias (SCOLLARD et al., 2006).

Esses receptores estimulam a produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e quimiocinas que coletivamente induzem a uma resposta inflamatória local, além de aumentar a fagocitose e morte mediada por macrófagos ativados (PASARE; MEDZHITOV, 2004). Polimorfismos gênicos que alteram a expressão ou função dos TLRs são capazes de influenciar na suscetibilidade do hospedeiro à infecção pelo *M. leprae* e no desenvolvimento de formas clínicas (HART; TAPPING, 2012). Mutações no domínio intracelular do TLR2 foram associados com hanseníase LL na população Coreana (KANG; CHAE, 2001). Estudo mostrou que o heterodímero (TLR2-TLR1) foi mais fortemente expresso nas lesões da forma TT quando comparado com lesões da forma LL (MONTROYA; MODLIN, 2010). Os receptores “*scavenger*” de macrófagos (CD36) podem se ligar a moléculas de fosfolipídio oxidado da parede celular do *M. leprae*, facilitando a fagocitose do bacilo (MOSSER; EDWARDS, 2008). Lesões TT expressam IL-15, enquanto lesões LL expressam IL-10. Macrófagos estimulados por IL-10 realizam fagocitose excessiva de bacilos via receptores *scavenger* e receptores de manose, mas apresentam atividade microbiana limitada, dessa forma o bacilo se acumula dentro do macrófago. Já macrófagos estimulados por IL-15 apresentam uma atividade fagocítica menor, entretanto, ativam vias antimicrobianas dependentes da vitamina D e eliminam os bacilos fagocitados (MONTROYA et al., 2009).

Dentre os PRRs para patógenos intracelulares, temos o receptor NOD2 (*nucleotide binding oligomerization domain 2*), um receptor citoplasmático pertencente da família de receptores NOD-like (NLR). Foram identificados 22 receptores NLR em humanos e 33 em camundongos que estão envolvidos na detecção de patógenos no citoplasma e ativação de cascatas inflamatórias (PEDRA et al., 2009). O receptor NOD2 reconhece peptídeo glicano, incluindo o derivado de micobactérias, pela ligação a dipeptídeos muramil (MDP) presentes no peptídeo glicano. O MDP é capaz de ativar o inflamassoma, um complexo multiproteico composto por NLRs, proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD- Caspase-recruitment domain*) e a molécula central do complexo: a caspase -1. Após ativação do complexo ocorre a clivagem de pró-citocinas pela caspase-1 e secreção das formas ativas de IL-1 β , IL-18 e IL-33 (CHEN; PEDRA, 2010).

A relevância de NOD2 na patogênese da hanseníase foi demonstrada em um estudo de associação de genoma completo (*genomewide association study*/GWAS) realizado com 706 pacientes com hanseníase e 1225 controles saudáveis recrutados no leste da China (ZHANG et al., 2009). Este estudo identificou uma associação significativa entre a manifestação de hanseníase MB e SNPs nos genes CCDC122, C13orf31, NOD-2, TNFSF15, HLA-DR e RIPK2 e uma tendência para uma associação com um SNP no gene LRRK2. Este estudo sugere que os SNPs em NOD2 e RIP2 estão entre os mais relevantes na suscetibilidade para hanseníase MB.

A diferenciação de monócitos em macrófagos ou DCs de acordo com a ativação de diferentes PRRs (NOD2 ou TLR2/1) por PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) derivados do *M. leprae* foi analisada por Schenk e colaboradores em 2012. A ativação de TLR2/1 por lipopeptídeos triacilados induz a diferenciação de monócitos em macrófagos, por outro lado, a ativação de NOD2 pelo seu ligante MDP promove a diferenciação de monócitos em DCs. O estudo sugere que o *M. leprae* vivo e o ligante de NOD2 (MDP) induzem a produção de IL-32 que por sua vez promove a diferenciação de monócitos em DCs, o que não é observado quando TLR2/1 é ativado. A análise de lesões de pele e monócitos do sangue periférico de pacientes com hanseníase mostrou que a ativação de NOD2 via MDP e consequente diferenciação de DCs correlaciona-se com o desenvolvimento da forma TT (SCHENK et al., 2012). Bacilos viáveis de *M. leprae* podem suprimir a interação entre DCs e linfócitos T por meio da diminuição da expressão de moléculas do MHC em DCs derivadas de monócitos (MAEDA et al., 2003). Além disso, estudo recente indicou uma menor expressão de moléculas co-estimuladoras (CD86) em monócitos de pacientes com hanseníase LL quando comparados com pacientes com hanseníase TT. Essa deficiência de CD86 pode interferir na formação da sinapse imunológica comprometendo a ativação de células T (PALERMO et al., 2012). Durante a apresentação de antígenos derivados do *M. leprae* aos linfócitos T, as DCs secretam citocinas e quimiocinas que regulam a inflamação e modulam a resposta imune adaptativa para o perfil Th1 ou Th2 (SCOLLARD et al., 2006). A polarização da resposta imune para o perfil Th1 é eficaz para destruição do bacilo e confere resistência a doença, a qual se apresenta de forma mais localizada. Por outro lado, a polarização

da resposta imune para o tipo Th2 não é eficaz para destruir os bacilos, pois induz produção de anticorpos que são ineficazes contra bacilos intracelulares, conferindo susceptibilidade à hanseníase que tende a se apresentar de forma disseminada (ARNOLDI et al., 1990).

A resposta imune humoral presente no pólo virchowiano exhibe altos títulos de anticorpos IgM, IgG, IgE e IgA contra antígenos do *M. leprae*, principalmente o PGL-1, sem, contudo conferir proteção significativa, pois o indivíduo elimina bacilos e contribui para disseminação bacilar (BUHRER-SÉKULA et al., 2007; LYON et al., 2008; LYON e GROSSI, 2013). Foi demonstrado na literatura, as respostas de subclasses de IgG contra antígenos do *M. leprae*. Alguns autores observaram que os anticorpos IgG1 e IgG3 poderiam ser marcadores de doença progressiva da hanseníase (Hussain et al., 1995). A maior diferença em anticorpos contra o antígeno sonicado do *M. leprae*, entre os pacientes com hanseníase MB e grupos de controle saudáveis foi detectada para IgG1 > IgG3 > IgG2. Atividade de anticorpos muito baixa foi detectada para os isotipos IgG4 e IgE (Hussain et al., 1995), Anticorpos IgG2 são direcionados principalmente a antígenos de carboidratos (Barret e Ayoub, 1986), enquanto que anticorpos IgG1 e IgG3, por outro lado, são direcionados a antígenos protéicos (Finkelman et al., 1993). Em pacientes com hanseníase, a resposta de subclasses de IgG para antígeno recombinante 18K do *M. leprae*, foi detectada em IgG1 e IgG3 em todo o espectro de lepra. Entre as quatro subclasses de IgG, IgG1 e IgG3 são biologicamente as mais ativas e podem desempenhar um papel importante na patogênese e progressão da doença (Hussain et al., 1994).

A resposta imune celular, presente no polo tuberculóide, é caracterizada pela presença de citocinas do tipo 1 (IFN- γ , IL-2) e confere ao indivíduo resistência ao bacilo. macrófagos e linfócitos ativados por citocinas formam granulomas, com a presença de células T CD4+ no centro e, linfócitos T CD8+ na periferia (GOULART et al., 2009; LASTÓRIA et al., 2012).

A imunidade mediada por célula representa um fator importante no controle da infecção pelo *M. leprae*. As células Th1 produzem IFN- γ que ativa macrófagos, e IL-2 que estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando na redução da carga bacilar ou cura. Células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e ampliam a resposta

humoral. IL-4 estimula a produção de IgE, e ambas IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem a ativação de macrófagos resultando em infecção progressiva (LASTÓRIA et al., 2012). Acentuando o fenômeno da imunoregulação, a presença da IL-10 nas lesões suprime a produção de citocinas do tipo 1 por células TCD4, com uma redução significativa de IFN- γ e IL-2, resultando em uma resposta ineficiente aos antígenos de *M. leprae* (LASTORIA E ABREU, 2014).

Tem sido também investigado o papel imunomodulador do fator transformador do crescimento-beta1 (TGF- β 1) na hanseníase por GOULART et.al 2009; SOUSA et al, 2013; Braga et al 2013). Estes autores detectaram grande quantidade de células macrofágicas positivas para TGF- β 1 no infiltrado virchowiano, e ao contrário, constataram ausência dessa citocina no granuloma da forma tuberculóide. Tem sido demonstrada também, a produção de TGF- β 1 ativo em sobrenadantes de cultura de macrófagos, de portadores de hanseníase com uma produção significativamente maior naqueles, da forma virchowiana, quando comparados com os pacientes da forma tuberculóide (GOULART et al., 2009; SOUSA et al, 2013). O TGF- β 1 contrapõe os efeitos do IFN- γ na atividade antimicrobiana mediada pelo óxido nítrico (NO) e inibe a síntese de TNF- α , dessa forma contribuindo para a manutenção da infecção (SOUSA et al, 2013). Além disso, já foi demonstrado que em lesões de pacientes lepromatosos a expressão de cicloxigenase (COX-2) está aumentada quando comparada às lesões de pacientes tuberculóides (LYON et al., 2008). Esses dados corroboram estudos anteriores que observaram a liberação de mediadores como prostaglandina E2 (PGE2) e IL-10 por monócitos de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculóides. Tais mediadores contribuíram para a inibição da linfoproliferação frente ao ML em indivíduos sabidamente respondedores à bactéria. A PGE2 inibe a produção de IL-2 e também de IFN- γ , citocinas em geral, fracamente expressas nas lesões lepromatosas, mas importantes para gerar resposta imune específica (DAGUR et al, 2012).

Recentemente, SAVAGE e colaboradores (2008), demonstraram a presença de macrófagos anti-inflamatórios no sangue periférico de pacientes com hanseníase, capazes de induzir células T reguladoras do tipo Foxp3+GITR+CD25+. Estes autores reforçam a importância da compreensão dos mecanismos derivados da atuação desses

macrófagos, considerando que estas células apresentam um papel especial no controle e exacerbação das doenças inflamatórias crônicas, como é o caso da hanseníase.

Um terceiro tipo de células T CD4 foi descoberto em camundongos e no homem, sendo denominada como Th17, pela sua capacidade de produzir IL-17 e favorecer o desenvolvimento de respostas pró-inflamatórias, sendo sua indução modulada pela presença simultânea de IL-6 e TGF- β (BETTELLI et al 2006). Foi recentemente descrito que células Th17 podem se transformar em células Th1, originando uma dicotomia em relação à população de células Th1, ou seja, células Th1 clássicas (as originalmente descritas) e não clássicas (derivadas de células Th17). Esses diferentes tipos de células Th1 podem apresentar atividades biológicas distintas podendo ter um papel importante na proteção e imunopatologia (ANNUNZIATO, 2014).

As células Th17, desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas, especialmente nas superfícies mucosas. A diferenciação dessa população é dependente de citocinas como TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 e as células Th17 secretam principalmente IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (HARRINGTON et al., 2005). A produção de IL-17 e IL-22 pelas células Th17 gera imunidade de mucosa por ativar a produção de peptídeos antimicrobianos e promover o recrutamento de neutrófilos, contudo essa subpopulação de linfócitos T CD4+ também está associada a diversas doenças autoimunes (KURTS, 2008). A expressão de células do perfil Th17 foi avaliada em pacientes com hanseníase (TT e LL) e contatos saudáveis em PBMCs e lesões de pele.

Os contatos saudáveis apresentaram maior expressão de células do perfil Th17 quando comparados com pacientes com hanseníase, sugerindo que após exposição ao *M. leprae* este perfil está associado ao início da resposta imune adaptativa ao bacilo. Entre as formas clínicas da hanseníase, as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e o fator de transcrição RORC (retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C) apresentaram maior expressão em pacientes com hanseníase TT do que em pacientes LL. Este estudo sugere que as células Th17 atuam como uma via alternativa de diferenciação celular para o controle da carga bacilar em pacientes que foram incapazes em montar uma resposta Th1 ou Th2 (SAINI et al., 2013).

Outro estudo demonstrou que a IL-17A foi detectada em pacientes com ENH (Eritema Nodoso Hansênico), sugerindo que o perfil Th17 pode estar envolvido na imunopatogênese do ENH (MARTINIUK et al., 2012). Esses dados foram confirmados por um estudo recente que indicou um aumento de células Th17 e citocinas/quimiocinas associadas a esse perfil celular (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-2, CCL20 e CCL22) em pacientes reacionais (RR e ENH) (SAINI et al., 2016).

Um subtipo de células Th com atividade supressora (Tregs) foi caracterizado pela expressão constitutiva de receptores para IL-2a (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 (FLANAGAN, 2004; BOER et al., 2015). Foi descrito que o número de células Tregs (CD4+ CD25+ Foxp3+) está aumentado em lesões de pacientes com hanseníase e isto correlaciona com aumento na expressão das moléculas antiinflamatórias IL-10 e CTLA-4 (PALERMO et al., 2012). As células T reguladoras são responsáveis pela imunomodulação e homeostasia, evitando respostas exacerbadas e dano tecidual ao hospedeiro. Estas células são capazes de produzir citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β e induzem supressão mediada por contato célula-célula por meio da molécula CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) (MALOY; POWRIE, 2001).

Diversos estudos têm avaliado o papel das células T reguladoras na hanseníase, contudo com resultados contraditórios. Um maior número de células T reguladoras foi observado em sangue periférico de pacientes com hanseníase do que em controles saudáveis. Em relação às formas clínicas da hanseníase, uma maior porcentagem de T reguladoras foi encontrada nos pacientes com hanseníase TT em comparação com os pacientes LL (ATTIA et al., 2010). Estudo posterior não encontrou diferença significativa na expressão de Foxp3 nas lesões de pele de pacientes com hanseníase classificados de acordo com Ridley & Jopling (TT, BT, BL e LL), mas houve uma tendência ($p=0,042$) de aumento na expressão de Foxp3 em biópsias de pele de pacientes com reação hansênica tipo I (RT1) em comparação com ENH e em pacientes sem reação (MASSONE et al., 2010). Resultados concordantes foram observados em estudo posterior do mesmo grupo com maior número de amostras. A expressão de Foxp3 em lesões de pele foi maior entre pacientes com RT1 em comparação com pacientes não reacionais (I, BT e LL) (PARENTE et al., 2015). Outro estudo indicou uma maior

proporção de células T reguladoras e IL-10 na circulação de pacientes LL. Já a produção de IFN γ e resposta linfoproliferativa foram maiores entre os pacientes com hanseníase TT. Nas lesões de pele, células T reguladoras, IL-10 e CTLA-4 foram expressas nas lesões de pacientes LL (PALERMO et al., 2012).

Resultados semelhantes foram observados por Saini e colaboradores (SAINI et al., 2014) ao investigar o papel das células T reguladoras na hanseníase por meio da avaliação de lesões de pele e PBMCs de pacientes com hanseníase. Uma maior expressão de Foxp3, TGF- β e IL-10 foi observada nos pacientes com hanseníase LL em comparação com hanseníase TT e tanto na pele, quanto em cultura de PBMCs. O estudo sugere que a maior expressão de células T reguladoras em pacientes LL favorece a não responsividade aos antígenos do *M. leprae* contribuindo para a persistência de alta carga bacilar. Um estudo inédito em hanseníase avaliou as subpopulações de células T reguladoras CD4+ e CD8+ em pacientes com hanseníase menores de 15 anos de Fortaleza identificando maior número de células T reguladoras (CD4+ e CD8+) em pacientes MB em comparação com pacientes PB e contatos saudáveis de pacientes MB.

A maior frequência de células T reguladoras estava diretamente relacionada com o número de lesões e carga bacilar sugerindo que o monitoramento dessa população celular em contatos poderá indicar se a frequência de células T reguladoras pode ser utilizada como indicador para o desenvolvimento de hanseníase (FERNANDES et al., 2013)

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de hanseníase é essencialmente clínico e baseado em um ou mais dos três sinais: manchas hipocrômicas ou avermelhadas com perda de sensibilidade, nervos periféricos espessados e bacilo álcool-ácido resistente detectado em esfregaços de pele ou biópsia de material (WALKER; LOCKWOOD, 2007). A identificação do bacilo é feita através da coloração do esfregaço de raspado dérmico e biópsias de pele (baciloscopia). O índice baciloscópico (IB) corresponde a um valor dado em escala

logarítmica (variando 1-6) quantificando a densidade de *M. leprae* em esfregaços de raspado dérmico e é utilizado para avaliar a carga bacteriana para classificação e resposta ao tratamento (WALKER; LOCKWOOD, 2007).

Frequentemente, o exame histopatológico é realizado para confirmar casos clinicamente duvidosos. Além disso, também é utilizado como um dos critérios na classificação espectral de Ridley-Jopling. Pode ser estabelecido de forma definitiva pelo encontro do bacilo de Hansen ou, de forma presuntiva, pela presença de um infiltrado inflamatório com tríplice distribuição: perivascular, perianexial e perineural. A natureza das células inflamatórias varia de acordo com resposta imune do paciente (LYON e GROSSI, 2013).

Devido a dificuldades na realização de exames histopatológicos e visando a descentralização do acompanhamento médico dos pacientes, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) sugeriu aos países endêmicos que adotassem uma simplificação do critério diagnóstico de acordo com o índice baciloscópico (IB) feito a partir de esfregaços de raspado dérmico. De um modo geral, pacientes Tuberculóides (TT) e Borderline Tuberculóides (BT) são paucibacilares, com IB=0 e pacientes lepromatosos são multibacilares, com IB>0 (GALLO et al., 2005).

A PCR consiste na amplificação de regiões genômicas espécies-específicas. Através dessa técnica é possível identificar DNA do *M. leprae*, mesmo em pequenas quantidades no sangue, no raspado dérmico, no *swab* nasal e material de biópsia (pele, mucosa e nervo) (TORRES et al., 2003). Assim, pode-se detectar o *M. leprae* em casos de infecção subclínica ou nas diversas manifestações da hanseníase. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, porém de alto custo. Uma das limitações desse método é a inabilidade de distinção entre bacilos viáveis e inviáveis (SANTOS et al., 2001). Atualmente, encontra-se disponível apenas nos centros de pesquisa

Testes sorológicos possibilitam a pesquisa de anticorpos específicos frente a antígenos do *M. leprae*. Dentre os antígenos, destaca-se o PGL-1, o qual induz a produção de anticorpos IgM, medidos por ensaios imunoenzimáticos. A presença desses anticorpos reflete a carga bacilar, com títulos elevados nos multibacilares e baixos ou ausente nos paucibacilares (MOURA et al., 2008). Há estudos que indicam que testes anti-PGL-1 são úteis como fator prognóstico em contatos intradomiciliares de

pacientes multibacilares, visto que os contatos com anticorpos anti-PGL-1 tem risco 8 vezes maior de desenvolverem sintomas clínicos em comparação com os que apresentam sorologia negativa (DOUGLAS et al., 2004; GOULART et al., 2008). No entanto, muitos contatos com sorologia positiva nunca desenvolverão hanseníase e existem contatos que desenvolvem a doença mesmo com sorologia negativa. Uma estratégia para minimizar essa situação é utilizar antígenos altamente específicos, que associados ao PGL-1 podem melhorar a sensibilidade do diagnóstico.

Após o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, contendo 3.268.203 pares de bases (COLE, SUPPLY e HONORE, 2001), ferramentas da biologia molecular e bioinformática possibilitaram o reconhecimento de antígenos específicos do bacilo que podem ser utilizados para o sorodiagnóstico da hanseníase (DUTHIE et al., 2008; GELUK, DUTHIE e SPENCER, 2011). Assim, tem se obtido proteínas recombinantes a partir da expressão de produtos proteicos produzidos por uma bactéria geneticamente modificada pela incorporação de um ou mais fragmentos de DNA do bacilo (NGAMYING et al., 2001; NOMAGUCHI et al., 2002).

Cerca de 200 proteínas recombinantes do *M. leprae* foram estudadas quanto a reatividade humoral e celular e quanto ao potencial uso no desenvolvimento de testes “point of care” (GELUK et al. 2011). Estes testes poderiam contribuir para a classificação de pacientes com hanseníase (PB/MB), triagem de contactantes com alto risco de adoecimento, e permitir o diagnóstico precoce e monitorização do tratamento

Diversos pesquisadores estudaram proteínas recombinantes do *M. leprae* (tabela 1) quanto à reatividade humoral (REECE et al, 2006; DUTHIE et al, 2007, 2008a, 2008b; SAMPAIO et al, 2011; RADA et al., 2012; KUMAR et al., 2014; WENT et al., 2014).

Em 2006, Reece e colaboradores estudaram a reatividade de IgG frente a 13 proteínas recombinantes em soro de pacientes com hanseníase, contatos intradomiciliares, grupo de indivíduos saudáveis e pacientes com tuberculose. Eles demonstraram que as proteínas ML0405 e ML2331 são imunogênicas e específicas em soros de pacientes MB. A proteína ML2055 apresentou reatividade em soro de pacientes MB e contatos domiciliares de MB.

Em 2007, Duthie e colaboradores descreveram a reatividade do anticorpo IgG em soro de pacientes com hanseníase utilizando 7 proteínas recombinantes. Esse estudo demonstrou que as proteínas ML0405 e ML2331 foram imunogênicas e específicas nos soros de pacientes MB.

Tabela 1 - Proteínas recombinantes específicas do *M. leprae* estudadas nos últimos anos.

| Referencias | Proteínas recombinantes |
|---|--|
| Reece et al. 2006 | ML0050/ML0049, ML0091, ML0317, ML0405, ML0568, ML1213, ML2028, ML2055, ML2655, ML0097, ML1812, ML2331, ML2496 |
| Sampaio et al. 2011 | ML0022, ML0051, ML0098, ML0176, ML0276, ML0393, ML0405, ML0489, ML0491, ML0540, ML0810, ML0811, ML0840, ML1383, ML1556, ML1632, ML1181, ML1481, ML1633, ML1685, ML2028, ML2044, ML2055, ML2203, ML2331, ML2346, ML2358, ML2380, ML2541, ML2603, ML2629, ML2655, ML2659 |
| KUMAR et al. 2014 | ML0022, ML0051, ML0098, ML0176, ML0276, ML0393, ML0405, ML0489, ML0491, ML0540, ML0810, ML0811, ML0840, ML1383, ML1556, ML1632, ML1181, ML1481, ML1633, ML1685, ML2028, ML2044, ML2055, ML2203, ML2331, ML2346, ML2358, ML2380, ML2541, ML2603, ML2629, ML2655, ML2659 |
| RADA et al. 2012; Duthie et al. 2007; Duthie et al. 2011; Duthie et al.2014; Qiong-Hua et al. 2013; Souza et al. 2014; Fabri et al. 2015. | LID-1, NDO-LID, NDO-HSA |

Fonte: Reece et al. 2006, Duthie et al. 2007, Duthie et al. 2008a, Sampaio et al. 2011, Rada et al., 2012, Kumar et al., 2014

Posteriormente, em 2008 foi realizado um estudo no Nepal no qual testaram a reatividade de 71 proteínas recombinantes do *M. leprae* utilizando o microarranjo de proteínas, em soro de pacientes com hanseníase e controle sadios. As proteínas ML0405, ML2331, ML0050-ML0049, LID-1, ML0091 e ML2055 foram as que apresentaram diferença significativa entre o grupo MB e controles sadios (DUTHIE et al., 2008b).

Kumar e colaboradores em 2014, desenvolveram um estudo no qual avaliou-se a resposta humoral (ELISA) em soro de casos de hanseníase e contatos intradomiciliares frente a 33 proteínas recombinantes. Verificaram que as proteínas ML0405 e ML2331 apresentaram alta detecção de IgG em pacientes virchowianos. Diante desses estudos prévios, as proteínas ML0405, ML2331 e ML2055 foram determinadas como imunogênicas e imunodominantes do *M. leprae*.

Considerando as dificuldades em se fazer uma avaliação essencialmente clínica e ainda pela escassez de sintomas no início da doença, é comum acontecerem erros no diagnóstico ou sub-diagnósticos. O diagnóstico precoce e a introdução do tratamento específico são importantes para reduzir fontes de transmissão e para prevenir doença grave com incapacidade e deficiência física (STEFANI, 2008).

Dentre os antígenos mais estudados e aplicados no diagnóstico da hanseníase se destacam o PGL-1, principal glicolípido antigênico do *M. leprae* (LOBATO et al, 2011), o *Natural Disaccharide linked to Human Serum Albumin via Octyl* (NDO-HSA), que é uma forma sintética do glicolípido fenólico conjugada com soro albumina bovina (DUTHIE et al, 2014a, Lobato et al 2011), o Leprosy IDRI diagnostic 1 (LID-1), que é uma combinação das proteínas recombinantes do *M. leprae* ML0405 e ML2331 (DUTHIE et al, 2007; 2011; 2014a; SOUZA et al, 2014), e o conjugado NDO-LID (CARDOSO et al, 2013; Duthie et al 2014a, Duthie et al 2014b, FABRI et al. 2015). Estes antígenos passaram a ser utilizados em testes auxiliares no diagnóstico da hanseníase, embora nenhum deles seja considerado padrão ouro para o diagnóstico da doença.

Foi demonstrado que a resposta imune às proteínas ML0405, ML2331 e LID-1 mostrou diferença significativa entre o grupo MB e controles sadios, em um estudo no Nepal (DUTHIE et al., 2008b). Kumar e colaboradores, 2014, desenvolveram um estudo

no qual avaliou-se a resposta humoral em soro de pacientes hansenianos e contatos intradomiciliares frente a 33 proteínas recombinantes. Verificaram que as proteínas ML0405 e ML2331 apresentaram alta detecção de IgG em pacientes virchowianos. Esses estudos sugerem a utilização das proteínas imunodominantes do *M. leprae*, ML0405, ML2331, ML2055 e LID-1 no diagnóstico precoce da hanseníase, por se mostrarem fortemente imunogênicas (DUTHIE et al. 2007).

Para avaliar a capacidade de LID-1 diagnosticar precocemente pacientes com hanseníase, amostras provenientes de um estudo de seguimento de contatos de pacientes com hanseníase MB das Filipinas foram testadas. No soro de alguns contatos que desenvolveram hanseníase MB, os níveis de anticorpos anti-LID-1 apresentaram aumento um ano antes do diagnóstico clínico, sendo o aumento dos anticorpos anti-LID-1 maior do que os anticorpos anti-PGL-I, indicando que LID-1 poderia fornecer o diagnóstico precoce da hanseníase (Duthie et al. 2007). Fabri e colaboradores, 2015, sugeriram que testes baseados na detecção de anticorpos contra PGL-1 e/ou LID-1 são eficazes na detecção de pacientes MB, enquanto que o NDO-LID pode ser útil na identificação de pacientes PB, e também na detecção de indivíduos infectados com *M. leprae* entre contatos domiciliares saudáveis e na população em geral.

Outros testes avaliaram a detecção de IFN- γ como marcador de imunidade celular após estímulo de células sanguíneas com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos do *M. leprae*. A secreção de IFN- γ em resposta a proteínas e peptídeos do *M. leprae* é observada tipicamente em pacientes TT/BT, contatos domiciliares e controles endêmicos (ARAOZ et al. 2006; Duthie et al. 2008a; GELUK et al. 2010; SAMPAIO et al. 2011; SAMPAIO et al. 2012). O monitoramento dos contatos com o auxílio de antígenos específicos do *M. leprae* aplicados no diagnóstico pode subsidiar a elaboração de modelos que detectem indivíduos com maior risco de adoecer e que precisariam de acompanhamento diferenciado (DUPPRE, 2012; MARTINEZ, 2011; CABRAL et al. 2013; LIMA, 2014). Um desafio é a incorporação de tais tecnologias à rotina do SUS.

2.8 TRATAMENTO

A hanseníase é uma doença curável e é tratada através de uma poliquimioterapia (PQT). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2010), a rifampicina (600mg, uma vez por mês), clofazimina (300mg, uma vez por mês e 50mg / dia) e dapsona (100mg por dia) são utilizadas para o tratamento de pacientes multibacilares, por um período de um ano. Para os pacientes paucibacilares, apenas a rifampicina (600mg, mensal) e dapsona (100mg por dia) são empregadas por seis meses (BRASIL, 2013).

Em indivíduos impossibilitados de tomar clofazimina ou dapsona, outros agentes como, fluoroquinolonas, ofloxacina, moxifloxacina ou pefloxacina, ciclinamino e o macrolídeo claritromicina, são ativos contra o *M. leprae* e podem potencialmente serem utilizados como agentes de segunda linha (BRITTON e LOCKWOOD, 2004).

O seguimento dos casos de hanseníase em tratamento deve ser mensal em uma unidade de saúde, para a administração da dose supervisionada. A OMS definiu o critério de alta da seguinte forma: 1) para os PB – tratamento com 6 doses supervisionadas em até 9 meses, e; 2) para os MB – tratamento com 12 doses supervisionadas em até 18 meses. Na última dose, todos os pacientes deverão ser submetidos a exame dermatoneurológico e de acordo com o prognóstico, receber alta por cura (BRASIL, 2016).

Estudo recente mostrou que contatos intradomiciliares diagnosticados por vigilância ativa, em contraste com os detectados passivamente, iniciaram o tratamento precocemente, pouco tempo depois do início do tratamento do caso índice, apresentando menor chance de formas graves e sequelas (HACKER et al., 2012). Esses dados reforçam que a vigilância de contatos deve ser estratégia fundamental no controle da doença (NETO et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune humoral e celular de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares utilizando proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* com potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar níveis séricos de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e IgM contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA do *M. leprae* de pacientes com hanseníase, contatos intradomiciliares e controles sadios moradores de área endêmica.

Comparar a reatividade de anticorpos IgM, IgG e IgG1 de contatos intradomiciliares e controles endêmico.

Avaliar a sensibilidade e especificidade da sorologia para detecção de anticorpos (IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti LID-1, anti NDO-LID e anti-NDO-HSA para potencial diagnóstico da hanseníase. Analisar o perfil de citocinas secretadas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hanseníase e contatos, após estimulação com os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA do *M. leprae*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

A tabela 2 apresenta características sociodemográficas dos indivíduos incluídos no estudo. Os pacientes com hanseníase multibacilar ($n = 18$) e paucibacilar ($n = 20$) foram diagnosticados na unidade ambulatorial da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ, Brasil). O diagnóstico ocorreu após o exame clínico de critérios dermatoneurológico, com suporte laboratorial. Os pacientes foram agrupados de acordo com o sistema de classificação Ridley-Jopling de manifestações clínicas (Ridley & Jopling, 1966). Todos os pacientes e controles deram um consentimento por escrito e a aquisição das amostras biológicas foi aprovada pelo Comitê de Ética Humana da Fundação Oswaldo Cruz (1.896.348). Os pacientes foram estratificados em paucibacilares (PB) ao apresentar cinco ou menos lesões cutâneas e baciloscopia negativa, ou multibacilares (MB), ao apresentar mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva, conforme descrito pela classificação operacional adotada pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1991). Quarenta contatos familiares (HHC) que residiam com pacientes com hanseníase multibacilares (HHC-MB, $n = 28$) ou paucibacilares (HHC-PB, $n = 20$) ou tinham residido com pacientes com hanseníase cinco anos antes do diagnóstico confirmativo foram selecionados e examinados por médicos com formação específica. Vinte e um indivíduos saudáveis do Rio de Janeiro sem história prévia de doença micobacteriana foram incluídos como controles endêmicos (EC).

Foram incluídos também no estudo, pacientes e contatos residentes na região de Governador Valadares/MG. Casos de hanseníase Multibacilar ($n=10$), casos de hanseníase paucibacilar ($n=10$), contatos de PB ($n=8$), contatos de MB ($n=9$) e controles endêmicos ($n=11$). Os casos de hanseníase foram diagnosticados pelo corpo técnico do Centro de Referência de Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES), Secretaria Municipal de Saúde de Gov. Valadares.

Foram critérios de inclusão dos pacientes: diagnóstico de hanseníase, de acordo com critérios do Ministério da Saúde; contatos intradomiciliares que não possuíam sinais e sintomas clínicos de hanseníase; controles sadios sem história prévia de

hanseníase ou contato com pacientes hansenianos; fornecer/assinar TCLE. Os critérios de exclusão foram: disfunção hepática/alcoolismo, diabetes melitus, gravidez, pacientes HIV-positivo e uso de drogas imunossupressoras.

Tabela 2: Características dos participantes do estudo

| Grupos | n | Sexo (M/F) | Idade em anos (media) | | | |
|------------------------|-----|---------------|--------------------------|----------------------|---------------|--------------------------|
| | | | | n | Sexo (M/F) | Idade em anos (media) |
| Rio de Janeiro | | | | Governador Valadares | | |
| Pacientes - PB | 20 | 7/13 | 23-80 (55,7) | 10 | 7/3 | 12-68 (43,6) |
| Pacientes - MB | 18 | 11/7 | 13-74 (45,5) | 10 | 4/6 | 47-66 (55,5) |
| Contato de PB (CPB) | 20 | 9/11 | 19-68 (38,4) | 08 | 5/3 | 7-60 (39) |
| Contato de MB (CMB) | 28 | 10/18 | 15-62 (37,1) | 09 | 3/6 | 13-56 (31,2) |
| Controle Endêmico (EC) | 20 | 3/17 | 20-49 (26,40) | 11 | 4/7 | 11-74 (43,25) |
| Total | 106 | 40/66 | 13-80 (40,6) | 48 | 23/25 | 7-74 (42,51) |

Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

4.2 COLETA DE DADOS E EXAME CLÍNICO

Para obtenção de informações relativas aos participantes do estudo, que permitiram melhor caracterização da população, foram coletados dados fornecidos pelo SINAN, e prontuários clínicos. Todos os participantes do estudo passaram por exame clínico para o diagnóstico de hanseníase, que é baseado em um ou mais dos três sinais: manchas hipocrômicas ou avermelhadas com perda de sensibilidade, nervos periféricos espessados e exame bacterioscópico para detecção de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) em esfregaços de pele ou biópsia de lesão, segundo protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Após o exame clínico a prescrição de BCG é feita de acordo com as normas do Ministério da Saúde.

4.3 COLETA DE SANGUE.

As amostras de sangue dos participantes do estudo foram coletadas por profissionais qualificados da área de saúde, respeitando as técnicas de biossegurança,

tais como uso de luvas, material estéril e descartável. São coletados 30 ml de sangue utilizando tubos estéreis a vácuo e descartáveis (VACUTAINER, Grand Island, NY, USA), para os ensaios sorológicos de detecção de anticorpos e citocinas.

Os soros são obtidos por meio de centrifugação de amostras de sangue a 800g por 10 min a 4°C. As amostras de soro foram acondicionadas à -20°C em alíquotas de 1ml e utilizadas posteriormente para determinação dos isotipos específicos, na primeira etapa e de citocinas e quimiocinas na segunda etapa.

4.4 MÉTODO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS

Amostras de soro de pacientes com hanseníase, contatos e controles sadios vem sendo analisadas pelo teste ELISA indireto de acordo com Souza et al. (2005), com adaptações. Em resumo, placas de poliestireno para ELISA (Corning – Costar, fundo chato, 96 poços) são sensibilizadas com 2µg/ml (100µl/poço) de antígeno (ML0405, ML2331, ML2055 e Ag85B) em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas 'overnight' a temperatura de 4°C em câmara úmida. Após esse período, as placas são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS a 0,15M, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). As placas são novamente incubadas por 1h à temperatura ambiente com 100 µL de solução de bloqueio PBST contendo 1% de albumina bovina (BSA).

Em seguida, são adicionadas as amostras de soro (100µl/poço, em duplicata) na diluição de 1/50 em PBST + 0,1% BSA. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas são lavadas e o conjugado anticorpo anti-Ig (IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM)-peroxidase adicionado (100 µL/poço), na diluição de 1/1000. Após 1 hora de incubação a 37°C, as placas foram lavadas e o substrato OPD (tampão citrato de sódio/ácido cítrico, pH 5,5 contendo peróxido de hidrogênio e orto-fenilendiamina) adicionado (100µl/poço). Após cerca de 10 minutos há o desenvolvimento da cor e a reação é interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura efetuada em leitor de microplaca (Spectramax-190, Molecular Devices) a 492nm. Os resultados foram expressos por índice ELISA,

calculados pela fórmula $IE = \frac{\text{média da densidade óptica (DO) das amostras}}{\text{média da DO do branco} + 3 \text{ vezes o desvio padrão}}$.

4.5 ANTÍGENOS

No presente trabalho foram utilizados os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, gentilmente cedidos pelo Dr. Malcon Duthie, do Infectious Disease Research Institute (IDRI), Seattle, USA. Os antígenos utilizados foram diluídos inicialmente em água ultra-pura e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até serem usados nos ensaios.

4.6 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PELO MÉTODO CBA

Amostras de $5\text{ }\mu\text{l}$ dos soros dos participantes do estudo, serão utilizadas para quantificação de citocinas e quimiocinas por meio do método “cytometric bead array” (CBA). Os reagentes utilizados nesta etapa serão provenientes dos kits (“Human chemokine – kit I” e “Human Th1/Th2 cytokine kit II”) adquiridos da Becton Dickinson. Em cada tubo com essas alíquotas serão adicionados $20\text{ }\mu\text{l}$ de diluente G. Posteriormente, as amostras irão receber $3\text{ }\mu\text{l}$ de cada reagente, para marcar a presença de cada quimiocina (CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2 e CCL5) e citocina (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-2, IL-17), e em seguida os tubos serão lavados com $500\text{ }\mu\text{l}$ de reagente F e centrifugados a 1300 rpm durante 7 minutos . Em cada tubo os sobrenadantes provenientes dessa centrifugação serão aspirados com bomba à vácuo, restando aproximadamente $100\text{ }\mu\text{l}$ de amostras marcadas. Serão adicionados $18\text{ }\mu\text{l}$ de revelador (reagente B) em cada amostra, para incubação à temperatura ambiente por $1\text{ hora e }30\text{ minutos}$. Após esse período, as amostras serão novamente lavadas, centrifugadas e aspiradas nas mesmas condições citadas acima. Em cada tubo serão colocados $100\text{ }\mu\text{l}$ de reagente F para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson). Após a leitura dos tubos contendo padrões e amostras, os dados serão

analisados no software BD CBA Isotype Analysis (Becton Dickinson), onde os valores serão representados em concentração (pg/ml) de cada quimiocina e citocina.

4.7 RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVE - CURVA ROC

Neste estudo, utilizou-se a *receiver operating characteristic curve*, conhecida como curva ROC, para análise dos valores de acurácia – área sob a curva ROC, sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança. As curvas foram obtidas utilizando-se programa estatístico MedCalc Statistical - versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html). Os grupos de pacientes escolhidos para a realização da curva ROC, foram o grupo de pacientes com Hanseníase Multibacilar (positivo) e o grupo de contatos intradomiciliares (negativo).

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro positivo) no eixo vertical e do complemento da especificidade (taxa de falso positivo) no eixo horizontal. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte¹, determinando assim a área sob a curva (ASC). A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado.

A curva ROC além de indicar a acurácia global dos testes avaliados permitiu identificar com precisão o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos do teste. Cada ponto do gráfico representa também os índices de sensibilidade e (100 – especificidade) de um ponto de corte estabelecido. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidades.

Outra forma pelo qual avaliamos os testes foi através do cálculo da razão de verossimilhança (likelihood ratio). A razão de verossimilhança é definida como a razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença. Para um teste dicotômico (positivo/negativo), a razão de

¹ Pontos de corte são valores normativos, acima dos quais um teste é considerado positivo e abaixo dos quais o teste é considerado negativo.

verossimilhança é calculada para o resultado positivo e para o resultado negativo. A razão de verossimilhança positivo (RV+) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes, e a razão de verossimilhança negativo (RV-) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes (MEDRONHO et al., 2003).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das médias entre os grupos foi realizada, para cada antígeno, através do teste não paramétrico Mann Whitney U , como apropriado. Para testar a significância das diferenças entre as curvas ROC dos vários antígenos, foi utilizado o teste de Wilcoxon, como apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

5 RESULTADOS

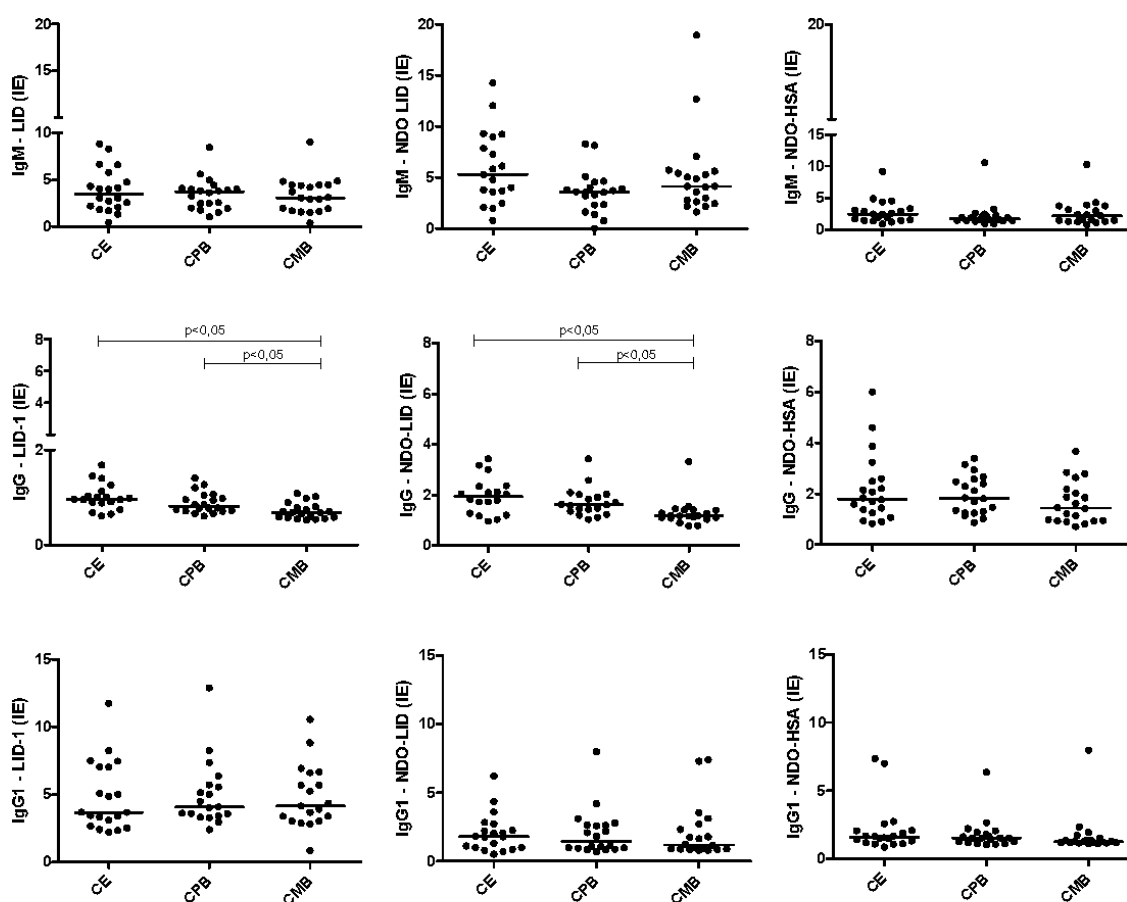
O potencial diagnóstico de três antígenos específicos do *M. leprae*: (i) LID-1 ou “Leprosy IDRI diagnostic 1”, uma proteína de fusão das proteínas recombinantes ML0405 e ML2331; (ii) NDO-HSA, um conjugado formado pelo dissacarídeo natural octil (NDO), uma versão sintética do glicolípido fenólico 1 (PGL-1) ligado à albumina sérica humana (HSA); e, (iii) NDO-LID, um conjugado originado da combinação de LID-1 com o NDO foi avaliado utilizando soro de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares. Foram estudados pacientes hansenícos virgens de tratamento, paucibacilares (PB) e multibacilares (MB), bem como contatos de pacientes paucibacilares (CPB) e multibacilares (CMB) de duas áreas endêmicas para a hanseníase, Governador Valadares e Rio de Janeiro. Grupos controle endêmico (CE) e controle sadio (CS) foram incluídos neste estudo.

5.1 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGG E IGG1 CONTRA OS ANTÍGENOS LID-1, NDO-LID E NDO-HSA EM AMOSTRAS DE SORO DE INDIVÍDUOS CONTROLE ENDÊMICOS E CONTATOS INTRADOMICILIARES DE PACIENTES COM HANSENÍASE RESIDENTES NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.

Anticorpos IgM, IgG e IgG1 com reatividade frente aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDOL-HSA do *M. leprae* foram avaliados em soro de indivíduos sadios residentes em área de alta endemicidade para hanseníase (CE) e em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar (CPB e CMB). A figura 1 mostra que não houve diferença significativa nos níveis séricos de anticorpos IgM e IgG1 produzidos contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA, assim como não foi detectada diferença na produção de IgG anti-NDO-HSA, entre os grupos estudados. A produção de IgG anti-LID-1 e anti-NDO-LID, foi significativamente maior nos indivíduos do grupo CE quando comparados com os grupos CPB e CMB, porém situando-se próximo do limiar de significância.

Contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase representam uma população em risco de desenvolver a doença, por esse motivo, a vigilância de contatos visa a descoberta de novos casos entre aqueles que vivem ou viveram, por muito tempo com o novo caso de hanseníase diagnosticado (caso índice). Além disso, aumenta a chance de encontro de possíveis fontes de infecção no ambiente familiar ou em seu entorno, independentemente da classificação do caso índice em MB ou PB.

Figura 1 - Níveis séricos de anticorpos IgM, IgG e IgG1 contra os antígenos LID-1, NDO-LID, NDO-HSA em indivíduos controle endêmicos (CE) e contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar (CPB e CMB). As barras representam a mediana. IE = Índice ELISA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

5.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGG E SUBCLASSES DE IGG CONTRA OS ANTÍGENOS LID-1, NDO-LID AND NDO-HSA EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM HANSENÍASE E CONTATOS INTRADOMICILIARES RESIDENTES NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.

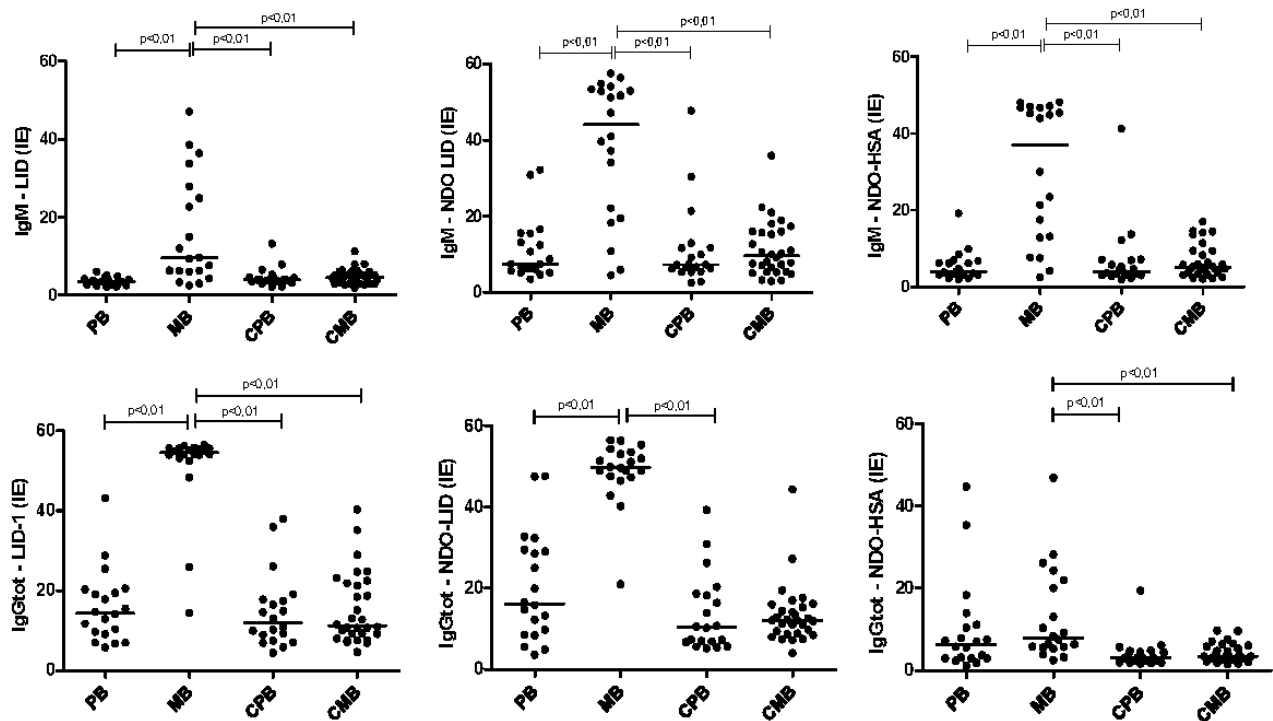
Considerando a resposta dos contatos ser igual ou ligeiramente inferior a apresentada pela população endêmica, e sendo este grupo o mais provável a desenvolver a doença e o mais fácil de ser avaliado como estratégia de vigilância epidemiológica, direcionamos nossos estudos para uma comparação direta entre os contatos intradomiciliares e os pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar. Entendemos que, desta forma, os testes sorológicos empregados no diagnóstico da hanseníase podem detectar indivíduos positivos entre os contatos, auxiliando na identificação de portadores de infecção subclínica, que podem assim serem selecionados para a aplicação de quimioprofilaxia.

A reatividade de anticorpos IgM e IgG frente aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDOL-HSA foi testada utilizando soro de pacientes com hanseníase MB e PB e em grupos de contatos intradomiciliares (CMB e CPB), representados por indivíduos com maior exposição à doença, mas que não apresentavam sintomas clínicos. A Figura 2 mostra que os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA estão marcadamente aumentados apenas em pacientes MB, em comparação com os grupos CMB ou CPB. Como esperado, os anticorpos IgM apresentaram maior reatividade contra o antígeno NDO, ao passo que os anticorpos IgG apresentaram reatividade aumentada contra o antígeno LID-1. A combinação de NDO com LID-1 favoreceu a detecção de altas quantidades de anticorpos específicos, das classes IgM e IgG, mas com maior dispersão nos resultados, em comparação com esses antígenos em separado (Fig. 2). Os pacientes MB apresentaram níveis mais elevados de anticorpos IgM e IgG do que os pacientes PB, com exceção da detecção de IgG contra NDO-HSA. Não houve diferença significativa entre os grupos CMB e CPB em relação aos anticorpos IgM ou IgG contra os antígenos estudados.

Em seguida, avaliou-se a reatividade das subclasses de IgG contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase (MB e PB) e contatos

intradomiciliares (CPB e CMB). Os indivíduos com Hanseníase MB apresentaram reatividade de anticorpos IgG1 significativamente maior ($IgG1 > IgG3 > IgG2$), contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com os grupos CMB e CPB (Fig. 3). Os níveis de IgG1 e IgG3 contra os antígenos LID-1 e NDO-LID foram maiores em pacientes com Hanseníase MB em comparação com pacientes PB.

Figura 2 - Níveis séricos de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA, em indivíduos com Hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) e em contatos intradomiciliares de pacientes com Hanseníase paucibacilar (CPB) e multibacilar (CMB). As barras representam a mediana. IE = índice ELISA.

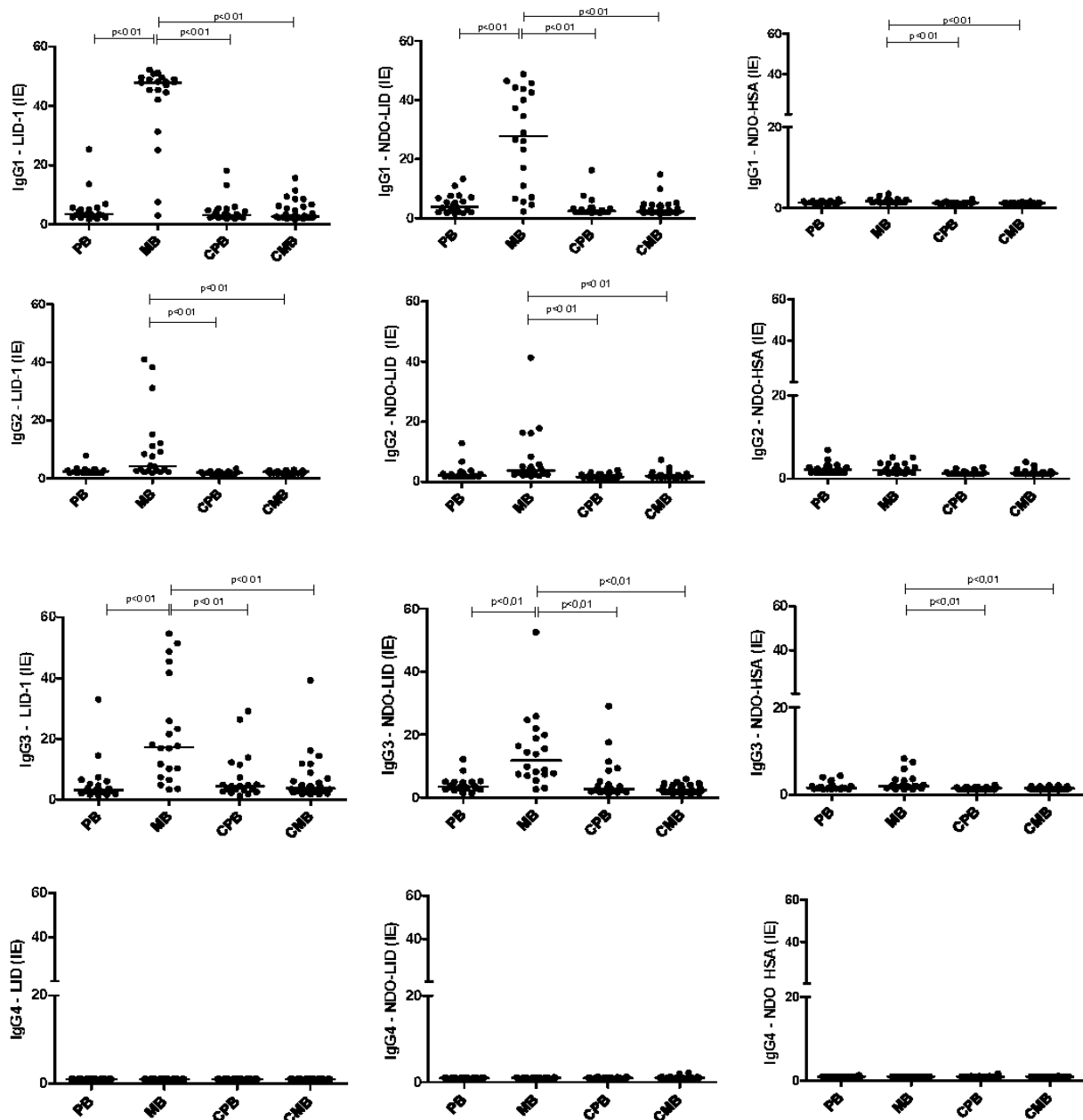


Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

A reatividade das subclasses de IgG ao NDO-HSA foi muito baixa em todos os grupos, no entanto, os níveis de IgG1 e IgG3 contra o antígeno NDO-HSA se mostraram ligeiramente aumentados em pacientes com Hanseníase MB em comparação com os indivíduos dos grupos CMB e CPB. Anticorpos IgG4 específicos

aos antígenos testados foram sempre detectados em níveis baixos, não apresentando diferença significativa entre os grupos estudados (Fig. 3).

Figura 3 - Níveis séricos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em indivíduos com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) e em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar (CPB e CMB). As barras representam a mediana. IE = índice ELISA.



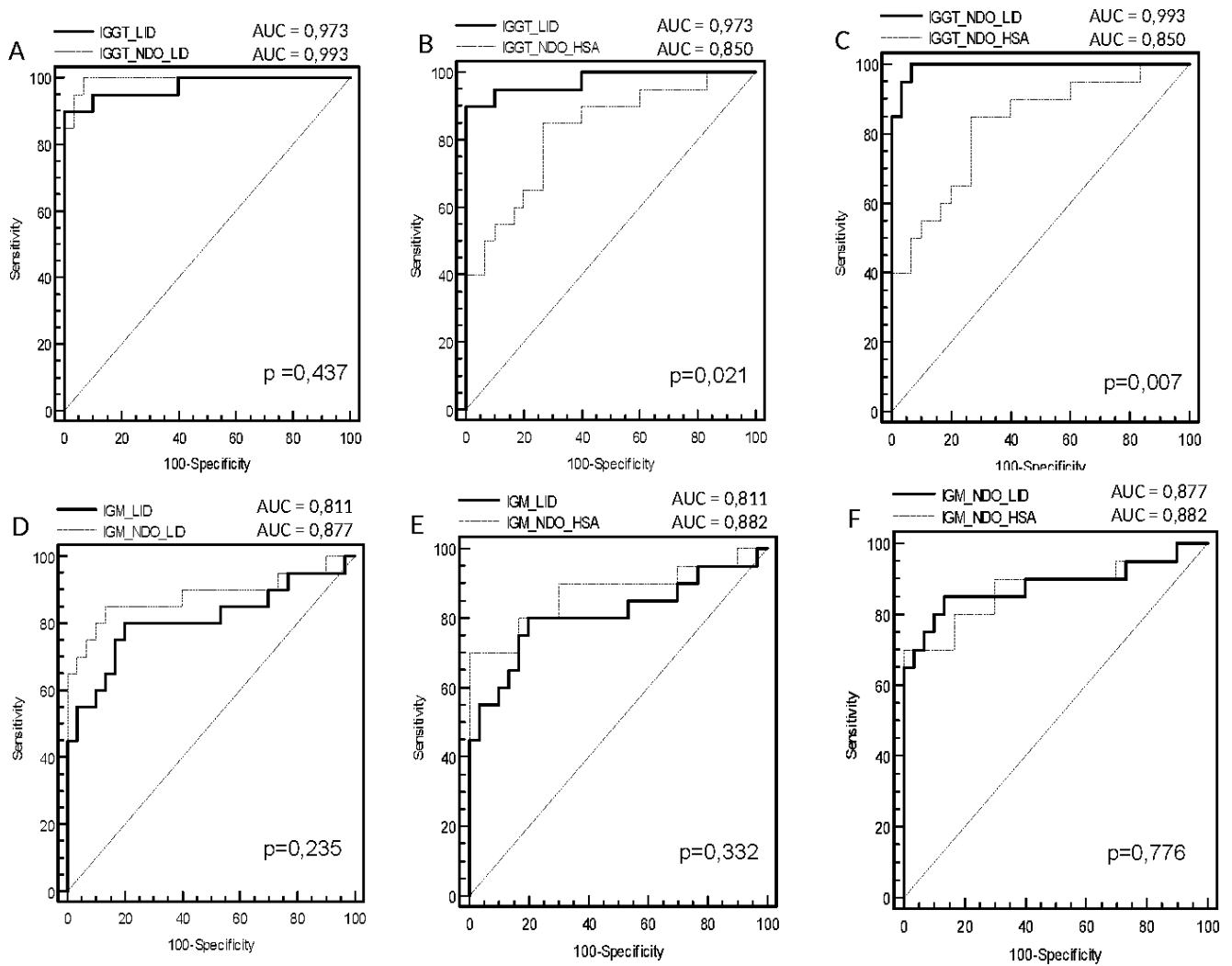
Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

5.3 ANÁLISE DAS CURVAS ROC DOS TESTES DE ELISA PARA OS ANTÍGENOS LID-1, NDO-LID E NDO-HSA

Análise da curva ROC foi realizada para avaliar parâmetros relativos à resposta de anticorpos (IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM), frente aos antígenos LID-1, NOD-LID e NDO-HSA e sua aplicabilidade no diagnóstico da hanseníase. Tais parâmetros incluem a acurácia do teste, representada pela área sob a curva ROC (ASC), os valores de sensibilidade e especificidade, bem como as razões de verossimilhança positiva e negativa quando necessário.

Análise da curva ROC (Fig. 4 e Tabela 3) usando dados do grupo com hanseníase MB, mostrou que os valores das áreas sob a curva (AUC) para as respostas de IgM contra LID-1 [AUC = 0,811], NOD-LID [AUC = 0,877] e NDO-HSA [AUC = 0,882] foram similares, porém levemente aumentados para NDO-HSA, o que corrobora com estudos prévios que mostram resposta aumentada de IgM anti-NDO-HSA (CARDOSO et al., 2013, AMORIM et al., 2016). Os valores de AUC para as respostas de IgG anti-LID-1 [AUC = 0,973] e anti-NDO-LID [AUC = 0,993] foram significativamente maiores do que os valores de AUC anti-NDO-HSA [AUC = 0,850]. Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100% (localizado mais próximo do canto superior esquerdo do espaço cartesiano da curva ROC). Em relação aos níveis de IgM específicos para NDO-HSA, foi detectada sensibilidade e especificidade de 70 e 98% respectivamente, com razão de verossimilhança positiva de 35 e razão de verossimilhança negativa de 0,31. Em relação à reatividade de anticorpos IgG, os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA apresentaram sensibilidade de 90, 95 e 85%, respectivamente, e especificidade de 100, 98 e 78%, respectivamente. Em termos de razão de verossimilhança, os valores para IgG foram respectivamente 48,0, 47,5 e 3,86 para razão de verossimilhança positiva e 0,10; 0,5 e 0,19 para razão de verossimilhança negativa. Esses resultados confirmam a melhor performance dos antígenos LID-1 e NDO-LID em comparação com o antígeno NDO-HSA.

Figura 4 - Curva ROC para as respostas de IgG contra LID-1 versus NDO-LID (A), LID-1 versus NDO-HSA (B) e NDO-LID versus NDO-HSA (C); e IgM contra LID-1 versus NDO-LID (D), LID-1 versus NDO-HSA (E) e NDO-LID versus NDO-HSA (F).



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Tabela 3. Sensibilidade e Especificidade dos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA no sorodiagnóstico da hanseníase multibacilar.

| <u>Antígenos</u> | <u>Isotipo</u> | <u>Cutoff^a</u> | <u>Sensibilidade^b</u> | <u>Especificidade^b</u> | <u>+RV^c</u> | <u>-RV^c</u> |
|------------------|----------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
| LID-1 | IgM | 6.06 | 80 | 82 | 4.44 | 0.24 |
| | IgG | 40.26 | 90 | 100 | 48.0 | 0.10 |
| | IgG1 | 18.10 | 90 | 100 | 11.0 | 0.10 |
| | IgG2 | 2.49 | 80 | 88 | 6.67 | 0.23 |
| | IgG3 | 6.13 | 85 | 74 | 3.27 | 0.20 |
| NDO-LID | IgM | 18.02 | 85 | 86 | 6.07 | 0.17 |
| | IgG | 39.28 | 95 | 98 | 47.50 | 0.05 |
| | IgG1 | 5.15 | 90 | 90 | 9.00 | 0.11 |
| | IgG2 | 2.36 | 85 | 82 | 4.72 | 0.18 |
| | IgG3 | 5.14 | 90 | 88 | 7.50 | 0.11 |
| NDO-HSA | IgM | 16.93 | 70 | 98 | 35.00 | 0.31 |
| | IgG | 5.25 | 85 | 78 | 3.86 | 0.19 |
| | IgG1 | 1.31 | 75 | 88 | 6.25 | 0.28 |
| | IgG2 | 1,56 | 65 | 78 | 2.95 | 0.45 |
| | IgG3 | 1,82 | 70 | 84 | 4.37 | 0.36 |

a – Dados do cutoff, sensibilidade e especificidade foram determinados baseados na análise da curva ROC.

b – Os valores de sensibilidade e especificidade foram correspondentes aos ponto de corte da curva ROC próximo ao ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%.

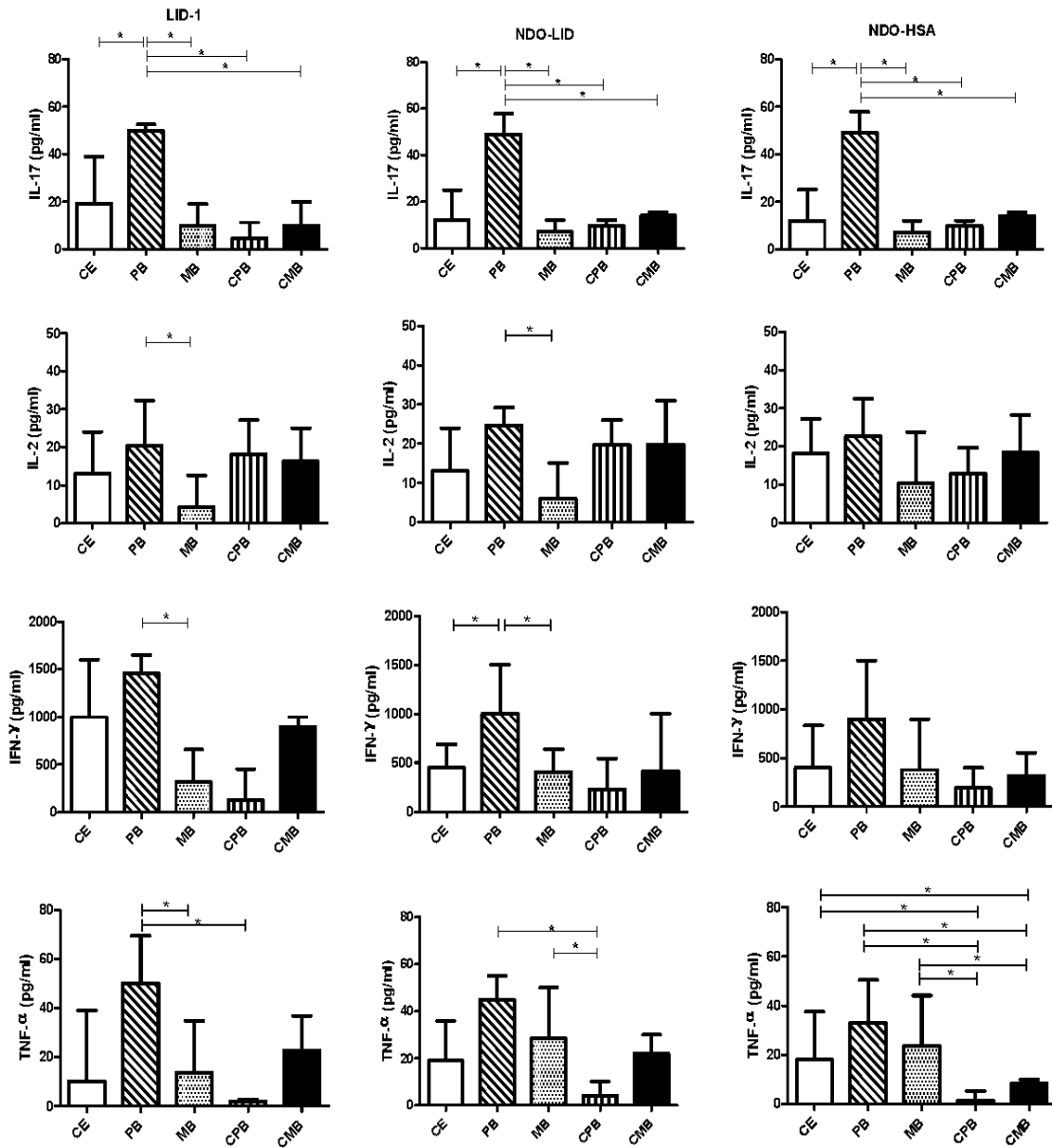
c - +RV e -RV = razão de verossimilhança positiva e negativa (RV).

Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

5.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM RESPOSTA ÀS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LID-1, NDO-LID E NDO-HSA

As proteínas recombinantes LID-1, NDO-LID e NDO-HSA foram utilizadas para induzir a produção de citocinas em PBMC de pacientes com hanseníase Paucibacilar (PB), Multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de pacientes Paucibacilares (CPB) e Multibacilares (CMB), bem como em controles endêmicos (CE). A produção de IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, foi avaliada no sobrenadante de cultura de PBMC, utilizando o método CBA. A figura 5 mostra que as proteínas recombinantes LID-1 e NDO-LID foram hábeis para estimular alta produção de IL-17, em pacientes PB, em comparação com os demais grupos estudados. A produção de IL-17 frente a proteína NDO-HSA foi significativamente maior no grupo PB, quando comparado com o grupo MB. Interessantemente, observa-se também alta produção de IFN- γ e TNF- α (figura 5), no sobrenadante de cultura de PBMCs estimulados com LID-1, de pacientes PB, comparando com os resultados obtidos de pacientes MB. A produção de IL-2 (figura 5) em pacientes PB, foi também maior frente ao estímulo com os antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com o grupos de pacientes MB ($p < 0,05$).

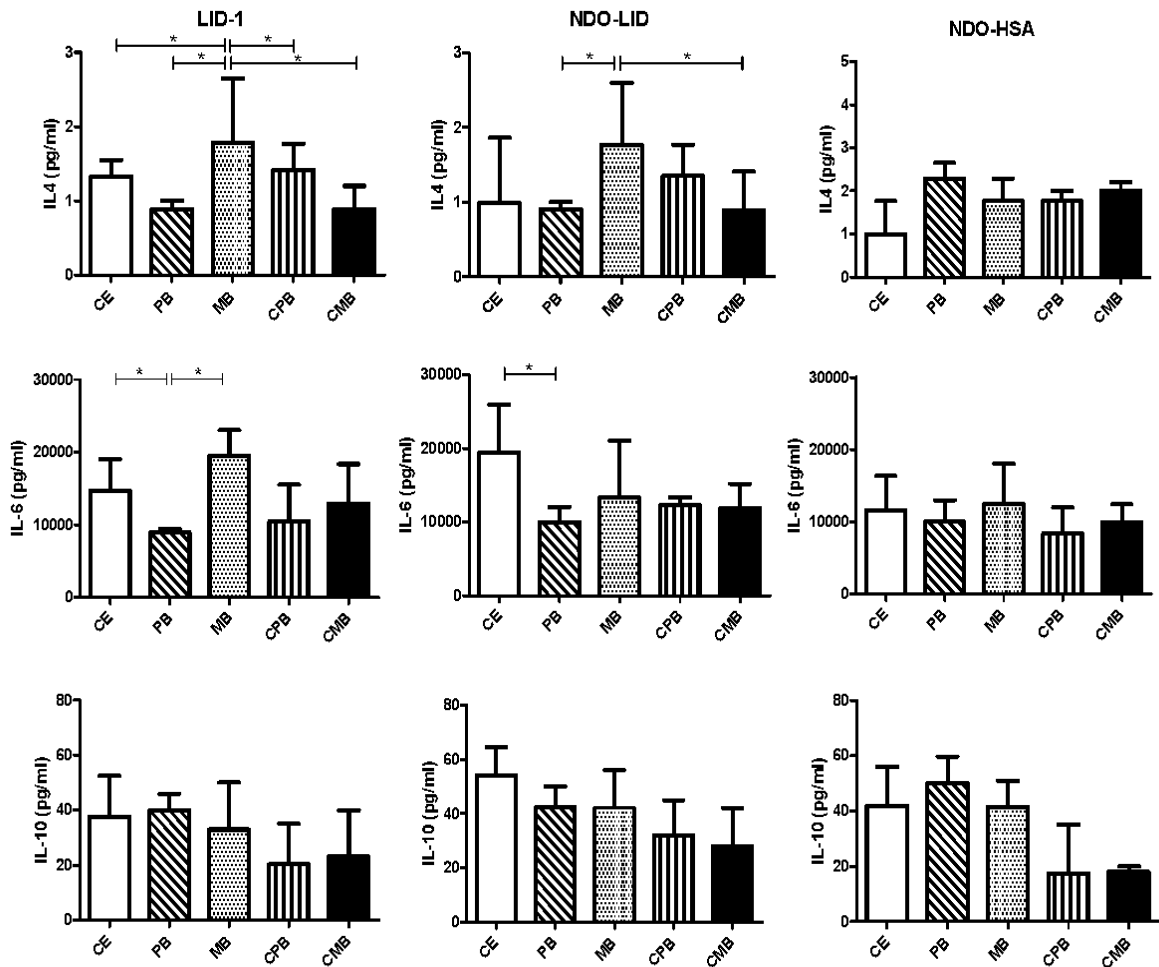
Figura 5 - Produção de IL-17, IL-2, IFN- γ e TNF- α por PBMCs estimulados com LID-1, NDO-LID e NDO-HSA (2 μ g/ml) em indivíduos controle edêmico (CE), pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de PB (CPB) e MB (CMB).



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

A produção de IL-6 (Fig. 6), no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes MB, estimulados com LID-1, foi significativamente maior, quando comparado com pacientes PB. Além disso, houve alta produção de IL-4, produzido frente aos estímulos com LID-1 e NDO-LID, em pacientes com hanseníase MB.

Produção de IL-4, IL-6 and IL-10 por PBMCs estimulados com LID-1, NDO-LID e NDO-HSA (2µg/ml) em indivíduos controle edêmico (CE), pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de PB (CPB) e MB (CMB).



Fonte: Elaborado pelo autor (2017)

Em conjunto esses resultados sugerem a possibilidade de uso dessas proteínas recombinantes para avaliação da resposta celular. Além da discriminação entre grupos de indivíduos com hanseníase Multibacilar e Paucibacilar, o que pode auxiliar na diagnóstico e classificação das formas clínicas da doença. Soma-se a isso, a possibilidade de encontrar entre os contatos intradomiciliares, indivíduos com predisposição ao desenvolvimento da hanseníase.

6 DISCUSSÃO

O principal objetivo desse estudo consistiu na avaliação da reatividade imunológica de proteínas recombinantes específicas do *M. leprae*, testadas em soros de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar, contatos intradomiciliares, e indivíduos sadios moradores de área endêmica (controle endêmico). O diagnóstico da hanseníase é baseado no exame clínico dermatoneurológico, portanto só é possível quando a doença já se manifestou. Até os dias atuais, não existe um exame laboratorial com sensibilidade e especificidade ideal para esse fim. Em vista disso, o desenvolvimento de um teste imunológico específico e sensível para diagnóstico precoce da hanseníase tornou-se objetivo de várias pesquisas (REECE et al., 2006; DUTHIE et al., 2008; GELUK, DUTHIE e SPENCER, 2011; RADA et al. 2012; KUMAR et al., 2014). O diagnóstico realizado antes da manifestação clínica da hanseníase, aliado a um tratamento precoce, pode prevenir o surgimento de sequelas e deformidades físicas, além de interromper a cadeia de transmissão da doença (BAHMANYAR et al., 2016; GELUK et al., 2005). Ferramentas diagnósticas que melhorem a detecção da hanseníase são necessárias para garantir o tratamento precoce e interromper a progressão da doença para incapacidades físicas, especialmente em crianças (GOULART; GOULART, 2008). Neste estudo, moléculas capazes de estimular a resposta imunológica de forma diferenciada em indivíduos com hanseníase foram testadas como possíveis alvos para ferramentas diagnósticas.

Uma ferramenta importante para a detecção precoce da infecção pelo bacilo de Hansen é o teste sorológico. Após o sequenciamento do genoma do *M. leprae* foi possível identificar prováveis antígenos específicos que poderão ser utilizados para o diagnóstico. O diagnóstico precoce da hanseníase antes mesmo do aparecimento das manifestações clínicas pode ter um impacto sobre a evolução da doença (DUTHIE et al., 2008a; LASTORIA e ABREU, 2014b).

Nesse estudo, utilizamos o ensaio ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM contra as proteínas recombinantes LID-1, NDO-LID, NDO-HSA. Observou-se que o grupo de pacientes MB apresentou uma ampla resposta de anticorpos para as diferentes proteínas recombinantes estudadas, o que permite uma

diferenciação desse grupo dos demais grupos de indivíduos incluídos no estudo. Notou-se, no grupo MB sem tratamento, maior produção de IgG e IgG1 anti-LID-1 e anti-NDO-LID, bem como maior produção de IgM anti-NDO-HSA. Os pacientes MB, principalmente os virchowianos, apresentam alta carga bacilar e uma exacerbada resposta imune do tipo Th2 (SAMPAIO et al., 2011; LASTORIA e ABREU, 2014b; KUMAR et al., 2014). O aumento da resposta humoral não é capaz de eliminar todos os bacilos, permitindo assim progressão da doença e disseminação bacilar (BUHRER-SEKULA et al., 2007; LYON e GROSSI, 2013). Logo, a alta detecção de anticorpos é diretamente proporcional a intensa carga bacilar que induz uma forte resposta humoral nos pacientes MB. As respostas anti-LID-1 são expressivas, devido ao fato de que LID-1 é uma proteína de fusão e as respostas a ele representam a soma das respostas sorológicas de duas proteínas altamente imunogênicas ML0405 e ML2331 (MIZOGUTI et al., 2015). Segundo Fabri et al. (2015), as respostas maiores observadas em pacientes com MB ocorrem porque eles apresentam uma carga bacteriana alta e mais desenvolvida, e uma resposta humoral definida. A análise da reatividade de IgG anti-LID1 é considerada auxiliar no diagnóstico e na classificação operacional da hanseníase (DUTHIE et al., 2008; DUTHIE et al., 2011; DUTHIE et al., 2014b), assim como a de IgM e IgG anti-NDO-LID (CARDOSO et al., 2013; DUTHIE et al., 2014b). Além disso, a análise da reatividade de anticorpo anti-NDO-LID pode aumentar a sensibilidade e especificidade do teste sorológico anti-PGL-1 (DUTHIE et al., 2014a). Esses achados possibilitam a identificação do grupo de pacientes MB, os quais são os principais responsáveis pela transmissão da hanseníase (DOUGLAS et al., 2004). Estima-se que doentes multibacilares, sem tratamento, são capazes de eliminar pela via nasal cerca de 10^7 bacilos viáveis por dia (DOUGLAS et al., 2004). Assim, um diagnóstico precoce desse grupo possibilita o início de tratamento poliquimioterápico e interrupção da cadeia de transmissão.

Interessantemente, os níveis séricos de anticorpos contra os antígenos LID-1, NOD-LID e NDO-HSA não foram diferentes entre os pacientes com hanseníase PB e os grupos de contatos (CPB e CMB), indicando que os contatos apresentaram alguma reatividade contra os antígenos do *M. leprae*. Está documentado que contatos apresentam maior risco de infecção por *M. leprae*, do que a população em geral

(BRASIL et al., 2003), pelo que se espera que observe uma maior positividade entre contatos do que na população em geral, visto que contatos estão regularmente expostos a *M. leprae* até que o paciente inicie o tratamento (BRASIL et al., 2003). Outros estudos também encontraram maior soropositividade anti-PGL-1, nativo ou sintético, nos contatos de pacientes com hanseníase MB (CARVALHO et al., 2015). A soropositividade anti-PGL-1 nos contatos indica um risco 6 vezes maior de desenvolvimento (GOULART et al., 2008) e o risco de desenvolver lepra MB é 34,4 vezes maior quando comparado aos pacientes com sorologia negativa (DOUGLAS et al. 2004). Contatos com alta soropositividade contra os antígenos em questão podem ser elegíveis para o processo quimioprolático. A Quimioprofilaxia pode ser usada como uma intervenção adicional para a redução da transmissão da hanseníase. A evidência científica mais robusta da eficácia da quimioprofilaxia com rifampicina veio de estudo randomizado, controlado e duplo cego em área de alta endemicidade em Bangladesh. O estudo foi denominado “Contact Leprosy Patient - COLEP” (MOET et al. 2008; RICHARDUS, OSKAN, 2015). Este estudo mostrou que a dose única de rifampicina na quimioprofilaxia reduz a incidência de hanseníase nos primeiros dois anos em 60%. Embora o benefício da profilaxia não tenha aumentado após dois anos, o efeito foi mantido após 4 e 6 anos. Em metanálise verificou-se que a quimioprofilaxia com dose única de rifampicina reduz o risco de hanseníase em contatos de pacientes diagnosticados com a doença em 57% após dois anos (REVEIZ; BUENDÍA; TÉLLEZ, 2009). Paralelamente ao presente estudo, têm-se estudado contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase que receberam quimioprofilaxia. A produção dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM, frente aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA foi mensurada no soro de contatos intradomiciliares de pacientes Multibacilares residentes na cidade do Rio de Janeiro. Resultados préveios mostram que os níveis séricos de IgG1 e IgG2 (dados não mostrados) produzidos frente ao antígeno NDO-HSA, aumentaram após a quimioprofilaxia.

Além disso, nossos dados indicam que, não houve diferença significativa entre os grupos CPB, CMB e CE, em relação aos anticorpos IgM ou IgG1 contra os antígenos estudados. O grupo CE apresentou altos níveis de IgG contra LID-1 e NDO-LID quando comparados com os grupos de contatos. Corroborando com o presente estudo, outro

trabalho examinou a presença de anticorpos contra antígenos particulares do *M. leprae* entre vários grupos que vivem em uma região endêmica para a hanseníase. Observou-se uma maior taxa de positividade anti-NDO-LID e anti-NDO-HSA na população geral do que em contatos, e uma correlação positiva para anticorpos contra os antígenos LID-1, NDO-HSA e NDO-LID (FABRI et al., 2015). A maior taxa de endemicidade na região a partir da qual as amostras de indivíduos do grupo CE foram coletadas provavelmente contribuiu para a maior taxa de soropositividade (Moet et al., 2008). Essa população é regularmente exposta a *M. leprae* e sugere que a prevalência oculta da hanseníase pode ser bastante alta (Fabri et al. 2015). Em relação à NDO-LID, Cardoso et al. (2013) não detectou diferença entre a soropositividade de contatos (PB e MB) usando o Smart Reader® da Orange Life®.

Uma ferramenta bastante utilizada para avaliar o desempenho de um teste diagnóstico, é a curva ROC, visto que determina a associação entre os pacientes com resultado positivo (sensibilidade) e o quantitativo de indivíduos não doentes, com resultado indesejadamente positivo (especificidade) (HAKIAN-TILAKI, 2013). A análise pela curva ROC mostrou que a produção de IgG e IgG1 contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, apresentou maior acurácia em discriminar pacientes multibacilares de contatos intradomiciliares. Considerando a produção de IgG e comparando pacientes MB com a população de risco (contatos intradomiciliares) obteve-se sensibilidade de 90% e especificidade de 100% para o antígeno LID-1. Com relação ao antígeno NDO-LID esses valores foram de 95% e 98% para sensibilidade e especificidade, respectivamente. Estudos recentes abordaram possíveis aplicações da sorologia anti-LID-1. Um teste rápido usando os antígenos ND-O e LID-1 como um único complexo de fusão (ND-O-LID) impregnado em uma membrana de nitrocelulose foi desenvolvido como um sistema simples e rápido que pode ser usado com uma quantidade mínima de treinamento para fornecer um diagnóstico objetivo de hanseníase MB (CARDOSO et al., 2013). Duthie et al. (2016), utilizando um teste rápido contendo NDO-LID para diagnóstico da hanseníase em soro de pacientes e controles (contatos e população em geral), mostrou sensibilidade de 80,3% na detecção de anticorpos, comparando pacientes e contatos. Em outro estudo, Amorin et al., (2016), trabalhando com casos de hanseníase e população em risco de adoecimento (contatos intradomiciliares), mostrou

que alta sensibilidade e especificidade para os antígenos LID-1 e NDO-LID, indicando através da curva ROC que não houve diferença entre os antígenos em questão. Estudos de diferentes áreas no Brasil (estados de Minas Gerais e Paraíba) confirmaram sorologia anti-LID-1 como uma ferramenta para a detecção da hanseníase MB e para a identificação de indivíduos com infecção subclínica (SOUZA et al., 2014, FABRI et al., 2015).

Os dados do presente estudo, corroboram com dados publicados anteriormente. Foi possível observar através da análise da curva ROC, que os valores da área sob a curva (AUC) para respostas de IgG anti-LID-1 e anti-NDO-LID foram maiores do que os valores de AUC para NDO-HSA. Um estudo usando NDO-LID e LID-1 para investigar respostas de anticorpos de pacientes com hanseníase da Colômbia e das Filipinas em um sistema de ensaio ELISA rápido indicou correlação com o índice baciloscópico, sugerindo seu uso para substituir esfregaços de pele (DUTHIE et al., 2014). Em áreas no sudoeste da China, respostas anti-LID-1 em amostras seqüenciais de contatos de pacientes com hanseníase foram utilizadas para o diagnóstico precoce de hanseníase MB (QIONG-HUA et al. 2013). O estudo atual acrescenta outra aplicação potencial da sorologia anti-LID-1, anti-NDO-LID e anti-NDO-HSA como ferramenta para discriminar pacientes com hanseníase que podem ser mais suscetíveis.

Interessantemente, pode-se observar uma sensibilidade de 70% e especificidade 98% com relação à produção de IgM anti-NDO-HSA em pacientes MB. Num estudo realizado por Freitas et al., 2015, verificou-se perfil de sensibilidade do NDO-HSA de 76%, sendo considerado satisfatório, uma vez que foi capaz de identificar a maioria dos pacientes doentes. Nesse mesmo estudo, o antígeno NDO-LID apresentou especificidade de 78% e acurácia de 73%, podendo contribuir para otimização do diagnóstico da hanseníase. Estudos anteriores demonstraram perfis de sensibilidade e especificidade altos para NDO-LID, trabalhando com pacientes diagnosticados tardiamente (AMORIM et al., 2016; CARDOSO et al., 2013) DUTHIE et al. (2014), mostrou que o LID-1, foi o marcador com melhor acurácia (85%), auxiliando, portanto, em uma melhor diferenciação sorológica de indivíduos doentes e não doentes. Os resultados desse estudo reforçam a indicação da utilização dos testes sorológicos como ferramentas auxiliares no diagnóstico da hanseníase e na classificação

operacional. Estudos prévios já demonstraram que a análise da reatividade de IgM anti-PGL-1 sintético contribui para correta classificação dos casos de hanseníase (BRITO et al., 2008; BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; BÜHRER-SÉKULA et al., 2007; GROSSI et al., 2008b) e auxilia na diferenciação entre casos PB e MB (ARAÚJO et al., 2012; FERREIRA et al., 2008; DUTHIE et al., 2008; DUTHIE et al., 2014b; LOBATO et al., 2011; SILVA et al., 2010; STEFANI et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2008).

Interessantemente, no presente estudo, os resultados indicaram que a produção de IgG e IgG1 contra ambos os antígenos LID-1 e NDO-LID representam ferramentas importantes para discriminar casos MB comparando com uma população de risco (contatos intradomiciliares). Considerando que não houve diferença entre as AUC dos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA com relação a produção de IgM, pode-se dizer que os três antígenos apresentam potencial diagnóstico. Amorin et al (2016), mostrou que contatos intradomiciliares com sorologia positiva para desenvolver hanseníase foi de 8,3% para LID-1 e 10,4% pra NDO-LID. E que ambos os antígenos LID-1 e NDO-LID apresentam potenciais ferramentas para diagnóstico da Hanseníase.

Resultados obtidos em investigações paralelas ao presente estudo demonstram que a resposta sorológica contra os antígenos LID-1, ML0405 e ML2331 em indivíduos residentes em Governador Valadares (dados não mostrados), demonstrou de modo geral, que o grupo de pacientes com hanseníase MB apresentou reatividade sorológica aumentada frente aos 3 antígenos testados. Além disso a produção de IgM anti-ML2331 foi maior em pacientes MB e PB e os níveis séricos de IgG1 anti LID-1 e anti-ML0405, também de mostraram aumentados em pacientes MB. Esses resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram que a proteína recombinante ML0405 é altamente reativa com anticorpos da classe IgG em pacientes MB (REECE et al., 2006; DUTHIE et al., 2007, 2008; SAMPAIO et al., 2011; KUMAR et al., 2014). Kumar e colaboradores em 2014, demonstraram que pacientes MB, classificados no polo virchowiano, apresentam níveis mais altos de anticorpos IgM e IgG. Foi sugerido que, de maneira geral, os antígenos de citoplasma e parede celular do *M. leprae* induzem predominantemente o anticorpo IgG e antígenos da membrana celular, o anticorpo IgM (KUMAR et al., 2014). Sabe-se que a resposta de IgM para antígenos

proteicos é relativamente baixa. Enquanto que antígenos não proteicos como PGL-1 estimulam preferencialmente resposta de IgM (BUHRER -SEKULA, 2007).

Diferentemente de outros estudos, as subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) contra os antígenos LID-1, NOD-LID e NDO-HSA foram medidas no presente estudo. Foi possível observar que os pacientes com MB apresentaram uma reatividade IgG1 significativamente maior, $IgG1 > IgG3 > IgG2$, contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com os grupos CPB e CMB. A reatividade da subclasse de IgG ao NDO-HSA foi muito baixa em todos os grupos, no entanto, os níveis de IgG1 e IgG3 contra NDO-HSA foram ligeiramente aumentados em pacientes com MB em comparação com CPB e CMB. As respostas de anticorpos séricos podem refletir os níveis de infecção e indicam que esta poderia ser uma técnica mais simples e menos invasiva do que os esfregaços de pele para estimar a carga bacteriana de *M. leprae*. Esses testes certamente podem contribuir para o diagnóstico preciso de hanseníase, especialmente em áreas onde os exames histopatológicos não estão disponíveis (AMORIN et al., 2016). Foi demonstrado na literatura, as respostas de subclasses de IgG contra antígenos do *M. leprae*. Alguns autores observaram que os anticorpos IgG1 e IgG3 poderiam ser marcadores de doença progressiva da hanseníase (HUSSAIN et al., 1995). A maior diferença em anticorpos contra o antígeno sonicado do *M. leprae*, entre os pacientes com MB e grupos de controle saudáveis foi detectada para $IgG1 > IgG3 > IgG2$. Atividade de anticorpos muito baixa foi detectada para os isotipos IgG4 e IgE (HUSSANIN et al., 1995), semelhantemente aos achados do presente estudo, com relação aos antígenos LID-1 e NDO-LID. Os níveis elevados de anticorpos IgG1 e IgG3 seguidos por IgG2, podem ser explicados porque os anticorpos IgG2 são direcionados principalmente a antígenos de carboidratos (BARRET e AYOUB, 1986). Os anticorpos IgG1 e IgG3, por outro lado, são direcionados a antígenos protéicos (FINKELMAN et al., 1993). Nossos resultados de subclasses de IgG estão de acordo com outros estudos que mostraram que em pacientes com hanseníase, a resposta de subclasses de IgG para antígeno recombinante 18K do *M. leprae*, foi detectado em IgG1 e IgG3 em todo o espectro de lepra. Entre as quatro subclasses de IgG, IgG1 e IgG3 são biologicamente as mais ativas e podem desempenhar um papel importante na patogênese e progressão da doença (HUSSAIN et al., 1994). Aumento dos níveis

séricos de IgG1 foram demonstrados em outras micobacterioses. Um estudo demonstrou a distribuição de subclasse IgG em resposta a antígenos proteicos e polissacarídicos de micobacterias em pacientes com hanseníase e tuberculose. Os resultados indicaram uma similar conversão de IgG1 a IgG2 anti-LAM em pacientes com hanseníase, enquanto que em pacientes com tuberculose, anticorpos contra polissacarídeos e proteínas eram predominantemente de subclasse de IgG1. Mattos et al. (2016) mostraram que a detecção de anticorpos IgG1 contra antígenos do *M. tuberculosis*, incluindo proteínas DosR e Rpf, pode representar uma ferramenta adicional no diagnóstico da doença. Os autores observaram que os pacientes com Tuberculose ativo apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG1 contra ESAT-6 / CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 em comparação com controles saudáveis ($p < 0,001$). Estes níveis permaneceram elevados após o início do tratamento.

Em um estudo realizado por SAMPAIO et al., 2011, os autores sugeriram que testes com proteínas recombinantes de *M. leprae* devem considerar sua capacidade de induzir respostas celulares, visto que segundo o espectro imunológico da doença, indivíduos com hanseníase paucibacilar apresentam pouca resposta humoral e alta resposta imune celular. De acordo a literatura, os pacientes PB e os seus contatos apresentam predomínio da resposta imune do tipo Th1 e baixa resposta do tipo Th2, havendo reduzida carga bacilar (SAMPAIO et al., 2011; RADA et al., 2012; KUMAR et al., 2014). Em concordância, notamos que os grupos PB e CPB apresentaram uma baixa detecção de anticorpos. Desta forma, testes para avaliação da resposta imune celular, como a determinação de IFN- γ , são, em tese, mais indicados que os testes sorológicos, para a identificação precoce dos pacientes PB e seus contatos. Sabe-se que o defeito das células T é uma característica comum em pacientes com hanseníase multibacilar em contraste com os pacientes paucibacilares. A hanseníase tuberculóide é caracterizada por uma forte resposta das células de tipo Th1 com lesões localizadas, enquanto a lepra lepromatosa é marcada por sua anergia celular seletiva de células T de *Mycobacterium leprae* levando a doença disseminada e progressiva (SADHU et al., 2016). Com base nessas informações, nesse estudo foi analisada resposta imune

celular dos indivíduos com base na produção das citocinas IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 por meio da técnica de CBA.

Observou-se que os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA foram capazes de estimular produção significativa das citocinas IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-2 em pacientes com hanseníase Paucibacilar (PB). Visando desenvolver um método diagnóstico para hanseníase PB, diversos estudos tem utilizado a detecção de IFN- γ como marcador de imunidade celular após estímulo de células sanguíneas com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos do *M. leprae*. Corroborando com os achados do estudo atual, tem sido mostrado que a secreção de IFN- γ em resposta a proteínas e peptídeos do *M. leprae* é observada tipicamente em pacientes TT/BT, contatos domiciliares e em alguns controles saudáveis de áreas endêmicas que foram expostos/infectados pelo *M. leprae* (ARAOZ et al., 2006a; ARAOZ et al., 2006b; DUTHIE et al., 2008a; GELUK, 2013a;2013b; GELUK et al., 2012; GELUK et al., 2005; GELUK et al., 2009; GELUK et al., 2010; SAMPAIO et al., 2011). Sahud et al., (2016), mostrou frequência aumentado de células TH17, produtoras de IL-17 em pacientes com hanseníase tuberculóide.

As células Th17 são uma subpopulação de linfócitos T CD4+ que desempenha importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas. Entre as formas clínicas da hanseníase, as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e o fator de transcrição RORC (*retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C*) apresentaram maior expressão em pacientes com hanseníase TT do que em pacientes LL. Este estudo sugere que as células Th17 atuam como uma via alternativa de diferenciação celular para o controle da carga bacilar em pacientes que foram incapazes em montar uma resposta Th1 ou Th2 (SAINI et al., 2013).

O estudo demonstrou claramente um perfil de citocinas inflamatórias (IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-2) produzidas no sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos com hanseníase tuberculóide. Diferentemente do observado em pacientes com hanseníase multibacilar, que apresentou produção aumentada de citocinas IL-2 e IL-4, características da resposta Th2.

Em resumo, nossos dados sugerem que produção de IgG e IgG1 anti LID-1 e NDO-LID por ELISA, bem como o uso dos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA para a avaliação da resposta imune celular em pacientes paucibacilares, pode auxiliar na

identificação de populações em risco de desenvolver hanseníase. Em áreas endêmicas para hanseníase é essencial a utilização de ferramentas que auxiliem no diagnóstico clínico. Considerando os resultados e a fácil execução de testes sorológicos, é interessante considerá-los com potencial para discriminação de indivíduos doentes de uma população sadia em risco de adoecimento e consequente controle da doença.

7 CONCLUSÕES

- Níveis séricos de IgM e IgG contra LID-1, NDO-LID e NDO-HAS se mostraram marcadamente aumentados em pacientes MB. Pacientes MB apresentaram níveis séricos de IgM e IgG maiores do que pacientes PB e contatos domiciliares;
- Anticorpos IgM apresentam maior reatividade com o antígeno NDO, enquanto que anticorpos IgG apresentam maior reatividade contra o antígeno LID-1. Os valores da AUC para as respostas de IgG contra os antígenos LID-1 e NDO-LID foram significativamente maiores do que os valores de AUC contra NDO-HAS;
- Não houve diferença significativa entre os grupos CPB, CMB e CE com relação as respostas de IgG e IgM contra os antígenos estudados;
- Pacientes MB apresentaram maior reatividade para a subclasse IgG1 (IgG1>IgG3>IgG2), contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com os grupos CPB e CMB;
- Houve predomínio das subclasses IgG1 e IgG3... enquanto que IgG2 foi baixa e IgG4 muito reduzida. Esses achados sugerem um perfil de subclasses de IgG mais próximo do perfil Th1, em pacientes MB, dado que pode ser explicado pela característica proteica do antígeno LID-1;
- A reatividade de todas as subclasses de IgG contra o antígeno NDO-HSA foi notadamente baixa. Reforçando a maior reatividade frente de IgM frente a esse antígeno, o que corrobora com dados da literatura;

- A pesquisa de citocinas contra os antígenos em questão constitui bons biomarcadores para a caracterização das formas clínicas de hanseníase;
- De maneira geral, com base na análise das curvas ROC, os dados indicam o melhor performance dos antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com o antígeno NDO-HSA no sorodiagnóstico da hanseníase;
- Considerando a boa acurácia que os antígenos LID-1 e NDO-LID apresentaram com relação à detecção de anticorpos e citocinas nos grupos de pacientes com hanseníase, considera-se importante utilizá-los para caracterização da resposta imunológica em contatos intradomiciliares, a fim de possivelmente caracterizar àqueles contatos elegíveis a quimioprofilaxia e interrupção da cadeia de transmissão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES L; DE MENDONÇA LIMA L; DA SILVA MAEDA E; CARVALHO L; HOLY J; SARNO EN, et al. Mycobacterium leprae infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiol.** set. 2004; 238(2):429-437.

AMORIM FM, NOBRE ML, FERREIRA LC, NASCIMENTO LS, MIRANDA AM, MONTEIRO GR, DUPNIK KM, DUTHIE MS, REED SG, JERONIMO SM. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS Negl Trop Dis.* Sep 22;10(9). 2016

ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, MAGGI E, ROMAGNANI S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. **Immunology.** v. 144, p. 343–351, 2014

ARAOZ R; HONORE N; CHO S; KIM JP; CHO SN; MONOT M; DEMANGEL C; BRENNAN PJ; COLE ST. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infection and Immunity.** out. 2006: 175-182.

ARAÚJO, S.; LOBATO, J.; REIS, E. M.; SOUZA, D. O.; GONÇALVES, M. A; COSTA, A. V.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v.107, suppl I, p. 55-59, dez. 2012.

ATTIA, E. A. et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol*, v. 49, n. 10, p. 1152-8, Oct 2010.

BAHMANYAR ER, SMITH WC, BRENNAN P, CUMMINGS R, DUTHIE M, RICHARDUS JH, SAUNDERSON P, SHWE T, ROSEN S, GELUK A. Leprosy Diagnostic Test Development As a Prerequisite Towards Elimination: Requirements from the User's Perspective. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(2): e0004331. 2016

BARRETO, J.G. et al. Spatial analysis spotlighting early childhood transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. **PloS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2665, feb. 2014.

BARRETT DJ AND AYOUB EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Exp. Immunol.* 63:127–134.1986

BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, KORN T, STROM TB, OUKKA M, WEINER HL, KUCHROO VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature.** 441(7090):235-8, 2006.

BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-407, Feb 12 2009.

BOER M, JOOSTEN S, OTTENHOFF T. Regulatory T-cells at the interface between human host and pathogens in infectious diseases and vaccination. **Frontiers in immunology**. v. 6, p. 1-15, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de Saúde. Manual de leprologia. Brasília: Ministério da Saúde, 1960. 192 p.

BRASIL MTLRF, OLIVEIRA LR, RÍMOLI NS, CAVALLARI FS, GONÇALVES OS, LESSA ZL. Anti PGL-1 serology and the risk of leprosy in a highly endemic area in the State of São Paulo, Brazil: four-year follow-up. *Rev Bras Epidemiol*. 6(3):262–71.2003

BRASIL. Ministério da Saúde. **Normas para a eliminação da hanseníase no Brasil**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM N 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. **Diário Oficial da União**. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases : **plano de ação 2011-2015**. Brasília, 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil - análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 44, p.1-12, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações demográficas. [2016] Disponível em: <www.datasus.gov.br.

BRITTON WJ; LOCKWOOD DN. Leprosy. **Lancet**. 2004: 1209–1219.

BRITO, M. F. M.; XIMENES, R. A.; GALLO, M. E.; BÜHRER-SÉKULA. S. Association between leprosy reactions after treatment and bacterial load evaluated using anti PGL-I serology and bacilloscopy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 67-72, 2008.

BUHRER-SEKULA, S. et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Lepr Rev**, v. 78, n. 1, p. 70-9, mar. 2007.

CABALAR, M. et al. The clinical & Neurophysiological study of leprosy. **Pak J Med Sci.**, v. 30, n. 3, p. 501-6, may. 2014.

CABRAL, PB et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. **Int J Infect Dis.** Jul 16, 2013

CARDOSO LP, DIAS RF, FREITAS AA, HUNGRIA EM, OLIVEIRA RM, COLLOVATI M, REED SG, DUTHIE MS, STEFANI M MA. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infect Dis.** v. 13:497. 2013

CARVALHO AP, FABRI ACOC, CORRÊA OLIVEIRA R, LANA FC. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. **BMC Infect Dis.** May 30;15:219. 2015

CHEN, G.; PEDRA, J. H. The inflammasome in host defense. *Sensors (Basel)*, v. 10, n. 1, p. 97-111, 2010.

COLE, S.T.; SUPPLY, P.; HONORE, N. Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity. **Lepr Rev**, v. 72, n. 4, p. 449-61, dec. 2001.

CONTIN L, ALVES C, FOGACNOLO L, NASSIF P, BARRETO J, LAURIS J, NOGUEIRA M. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 91-95. Jan/feb. 2011.

DAGUR et al. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. **Lipids in Health and Disease** 2012

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol*, v. 78, n. 4, p. 318-24, Aug 2000.

DOUGLAS, J.T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 5, p. 897-900, sep. 2004.

DUPPRE NC et al. Impact of PGL-1 seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **PLoS Negl Trop Dis.** 6(6): e1711, 2012.

DURÃES, Sandra M. B. et al. Estudo epidemiológico de 107 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias – Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.l.□, v. 85(3), pp. 339-45, 2010.

DUTHIE, M.S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 11, p. 1400-08, nov. 2007.

DUTHIE, M.S. et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1659-65, nov. 2008a.

DUTHIE, M.S. et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 10, p. 1590-97, oct. 2008b.

DUTHIE, M.S. et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n.10, p. 1257-65, oct. 2011.

DUTHIE MS, RAYCHAUDHURI R, TUTTERROW YL, MISQUITH A, BOWMAN J, CASEY A, BALAGON MF, MAGHANOY A, BELTRAN-ALZATE JC, ROMERO-ALZATE M, CARDONA-CASTRO N, REED SG. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 79(2): 233-239, 2014.

DUTHIE MS, BALAGON MF, MAGHANOY A, ORCULLO FM, CANG M, DIAS RF, COLLOVATI M, REED SG. Rapid quantitative serological test for detection of infection with mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. **J Clin Microbiol**. 52(2): 613–619, 2014.

DUTHIE MS, ORCULLO FM, ABBELANA J, MAGHANOY A, BALAGON MF. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3267–3275. 2016

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr*, v. 104, n. 7, p. 554-63, sep. 2013.

FABRI ACOC, CARVALHO APM, ARAUJO S, GOULART LR, GOULART IMB, MATTOS AMM, TEIXEIRA HC, DUTHIE MS, CORREA-OLIVEIRA R, LANA FCF. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infect Dis**.15:218-218, 2015.

FERNANDES, C. et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e79072, 2013.

FERREIRA, M. A. A.; ANTUNES, C. M. D. F. Factors associated with ML Flow test seropositivity in leprosy patients and household contacts under the age of 18. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 60-66, 2008.

FINE, Paul E.M. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in Northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 91-102,1997.

Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/content/146/1/91.full.pdf+html>> Acesso em 09.abr.2012.

FINKELMAN FD, KATONA IM, MOSMANN TR, COFFMAN RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 140:1022–1027.1988

FOSS, N.T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An Bras Dermatol**, v. 74, n. 2, p. 113-9, 1999.

FLANAGAN K, MOROZIEWICZ D, KWAK H, HÖRIG H, KAUFMAN HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatoryCD4+ T cells. **Cell Immunol.** 231(1-2): 75-84, 2004.

FUKUTOMI Y; MAEDA Y; MATSUOKA M; MAKINO M. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi.** fev. 2009: 7-16.

GALLO MEN, SAMPAIO EP, NERY JAC, MORAES MO, ANTUNES SLG, PESSOLANI MCV, SARNO EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. **Coura, JR (ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, p.1383-94, 2005.

GARFIELD J; PIETERS J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. **Science.** jun 2000:1647- 50.

GELUK A, OTTENHOFF TH. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. **Human Immunology.** p. 439-445, 2010.

GELUK, A.; DUTHIE, M.S.; SPENCER, J.S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 402-21, dec. 2011.

GELUK, A. Biomarkers for leprosy: would you prefer T (cells)? *Lepr Rev*, v. 84, n. 1, p. 3-12, Mar 2013a.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. *Expert Opin Med Diagn*, v. 7, n. 3, p. 265-74, May 2013b.

GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *J Immunol*, v. 188, n. 10, p. 4782-4791, May 15 2012.

GELUK, A. et al. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect Immun*, v. 73, n. 9, p. 5636-44, Sep 2005.

GELUK, A. et al. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*, v. 16, n. 3, p. 352-9, Mar 2009.

GELUK, A. et al. Enhancing sensitivity of detection of immune responses to *Mycobacterium leprae* peptides in whole-blood assays. *Clin Vaccine Immunol*, v. 17, n. 6, p. 993-1004, Jun 2010.

GOULART, I.M. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. ***Clin Vaccine Immunol***, v. 15, n. 1, p. 101-5, jan. 2008.

GOULART, I.M.; GOULART, L.R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. ***Arch Dermatol Res***, v. 300, n. 6, p. 269-90, jul. 2008.

GOULART LR, GOULART IMB. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. ***Arch. Dermatol. Res.*** p. 123–137, 2009.

GOULART LR, VIEIRA CU, FRESCHI APP, CAPPARELLI FE, FUJIMURA PT, ALMEIDA JF, FERREIRA LF, GOULART IMB, MADURRO AGB, MADURRO JM. Biomarkers for Serum Diagnosis of Infectious Diseases and Their Potential Application in Novel (F.I. 3.241). ***Critical Reviews in Immunology***. v. 30, p. 201-222, 2010.

GROSSI, M. A. D. F.; LEBOEUF, M. A.; ANDRADE, A. R.; LYON, S.; ANTUNES, C. M.; BÜHRER-SÉKULA, S. The influence of ML Flow test in leprosy classification. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 41, suppl. II, p. 34-38, 2008a.

GROSSI, M. A. D. F.; LEBOEUF, M. A.; ANDRADE, A. R.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ANTUNES, C. M. Risk Factors for ML Flow Seropositivity in Leprosy Patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 41, suppl. II, p. 39-44, 2008b.

GROSSI MAF. Hanseníase: situação atual. **SEMINÁRIO ESTADUAL DE HANSENÍASE**. 2010.

HACKER, M. A. et al. A profile of patients treated at a national leprosy outpatient referral clinic in Rio de Janeiro, Brazil, 1986-2007. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 31, n. 6, p. 485-491, 2012.

HAIJIAN-TILAKI K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med*. Spring; 4(2): 627–635. 2013

HART, B. E.; TAPPING, R. I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. *J Trop Med*, v. 2012, p. 415057, 2012.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005.

HELENA T. M. et al. Control of household contacts of leprosy by family health teams. **Rev APS**. v. 15, n. 2, p. 139-47, jun. 2012.

HUSSAIN R; KIFAYET A AND CHIANG TJ. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 Antibodies Are Markers of Progressive Disease in Leprosy. **INFECTION AND IMMUNITY**. p. 410–415. 1995

HUSSAIN R, DOCKRELL HM AND CHIANG TJ. IgG subclass antibody to Mycobacterium leprae 18 000MWantigen is restricted to IgG1 and IgG3 in leprosy. **Immunology**. 83 495-500. 1994

JARDIM, M.R. et al. Pure neural leprosy: steroids prevent neuropathy progression. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 4A, p. 969-73, dec. 2007.

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

KUMAR, A. et al. Analysis of antigens of Mycobacterium leprae by interaction to sera IgG, IgM and IgA response to improve diagnosis of leprosy. **BioMed Res Int**, v. 2014, jun. 2014.

KURTS, C. Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, n. 3, p. 816-9, Mar 2008.

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

LASTÓRIA, J.C.; ABREU, M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, v. 17, n. 4, p. 173-179, 2012.

LASTÓRIA, J.C.; ABREU, M.A.M.M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - part 1. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 2, p. 205-18, mar-apr. 2014.

LIMA CS; RIBEIRO ML; SOUZA LA; SARDELLA AB; WOLF VM; PESSOLANI MC. Intracellular signals triggered during association of Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis BCG with human monocytes. **Microb. Pathog.** jul. 2001: 31(1):37-45.

LIMA, C.S.O. et al. Leprosy: surveillance of contacts. **Rev Enferm UFPE**, v. 8, n. 5, p. 1136-41, mai.2014.

LYON S, LYON AC, DA SILVA RC, GROSSI MA, LYON SH, BÜHRER-SÉKULA S, ROCHA MO. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the

bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. **Leprosy Rev.** v. 79(2):162-70, jun. 2008.

LYON, S.; GROSSI, M.A.D.F. Hanseníase. Rio de Janeiro: **MedBook**, 2013.

LOBATO J, COSTA MP, REIS EM, GONÇALVES MA, SPENCER JS, BRENNAN PJ, GOULART LR, GOULART IM. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev.** v. 82(2): 389-401, 2011.

MAEDA, S. M. et al. Comparison between anti-PGL-I serology and Mitsuda reaction: clinical reading, microscopic findings and immunohistochemical analysis. *Lepr Rev*, v. 74, n. 3, p. 263-74, Sep 2003.

MASSONE, C. et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol*, v. 32, n. 3, p. 251-256, May 2010.

MATTOS AMM, CHAVES AS, FRANKEN KLMC, FIGUEIREDO BBMF, FERREIRA AP, OTTENHOFF THM, TEIXEIRA HC. Detection of IgG1 antibodies against Mycobacterium tuberculosis DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy. *Tuberculosis* 96 (2016) 65e70. 2016

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*, v. 2, n. 9, p. 816-22, Sep 2001.

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

MEDRONHO R.A.; CARVALHO, D. M. B., K.V.; LUIZ, R.R.; WERNECK, G.L. *Epidemiologia*. São Paulo, SP: 2003.

MIZOGUTI DF, HUNGRIA EM, FREITAS AA, OLIVEIRA RM, LUDIMILA CARDOSO PV, COSTA MB, SOUSA ALM, DUTHIE MS, STEFANI MMA. Multibacillary leprosy patients with high and persistente serum antibodies to leprosy IDRI diagnostic-1/LID-1: higher susceptibility to develop type 2 reactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 110(7): 914-920.2015

MONTOYA, D.; CRUZ, D.; TELES, R. M. B.; LEE, D. J.; OCHOA, M. T.; KRUTZIK, S. R.; CHUN, R.; SCHENK, M.; ZHANG, X. R.; FERGUSON, B. G.; BURDICK, A. E.; SARNO, E. N.; REA, T. H.; HEWISON, M.; ADAMS, J. S.; CHENG, G. H. & MODLIN, R. L. Divergence of Macrophage Phagocytic and Antimicrobial Programs in Leprosy. ***Cell Host & Microbe***, v.6, p.343-353, 2009.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*, v. 105, p. 1-24, 2010.

MARTINEZ AN. et al. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5(10): 1354. 2011.

MORAIS, S.G. Avaliação das ações de controle da hanseníase no município de Governador Valadares, Brasil, no período de 2001 a 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2010.

MOSCHELLA, S.L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 51, n. 3, p. 417-26, sep. 2004.

MOSER, M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity*, v. 19, n. 1, p. 5-8, Jul 2003.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008.

MOURA, R.S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, suppl 2, p. 11-8, 2008.

NETO, J.M.P. et al. O controle dos comunicantes de hanseníase no Brasil: uma revisão de literatura. **Hanseologia Internationalis**, v. 25, n. 2, p. 163-76, 2000.

NERY, J.A. et al. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 787-92, sep-oct. 2013.

NGAMYING, M. et al. Effects of vaccination with several mycobacterial proteins and lipoproteins on *Mycobacterium leprae* infection of the mouse. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 69, n. 1, p. 43-5, mar. 2001.

NOMAGUCHI, H. et al. Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 70, n. 3, p. 182-90, sep. 2002.

OLIVEIRA R. et al. Synergistic antigen combinations for the development of interferon gamma release assays for paucibacillary leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**. V. 33, p 1415-1424, 2014.

O'NEILL, L. A. et al. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 6, p. 453-60, Jun 2013.

OPROMOLLA DVA. Noções de hansenologia. **BAURU: INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA**, 2000.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*, v. 6, n. 15, p. 1382-7, Dec 2004.

PALERMO M, PAGLIARI C, TRINDADE M, YAMASHITAFUJI T, DUARTE A, CACERE C, BENARD G. Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 86(5), p. 878–883. 2012.

PARENTE, J. N. et al. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An Bras Dermatol*, v. 90, n. 1, p. 41-7, Jan-Feb 2015.

PEDRA, J. H. et al. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol*, v. 21, n. 1, p. 10-6, Feb 2009.

QIONG-HUA P, ZHONG-YI Z, JUN Y, YAN W, LIAN-CHAO Y, HUAN-YING L, REED SG, DUTHIE MS 2013. Early Revelation of Leprosy in China by Sequential Antibody Analyses with LID-1 and PGL-I. *Journal of Tropical Medicine*. 2013.

RADA, E. et al. Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 e LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. **Mem Int Oswaldo Cruz**, v. 107, supl. 1, dec. 2012.

REECE, S.T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 3, p. 333-40, mar. 2006.

RIDLEY DS, JOPLING WH: Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr.** 1962: 34, 255–273.

RIDLEY D, JOPLING W. Classification of leprosy according immunity- a five-group system. *Int J Lepr* 34: 255-273.1966

RICHARDUS JH, OSKAM L. Protecting people against leprosy: chemoprophylaxis and immunoprophylaxis. **Clin Dermatol.** v. 33(1):19-25, 2015.

RODRIGUES, L.C.; LOCKWOOD, D. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis*, v. 11, n. 6, p. 464-70, jun. 2011.

RAMBUKKANA A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Curr. Opin. Microbiol.** fev. 2001: 4(1):21-27.

REVEIZ. L.; BUENDÍA, J. A.; TÉLLEZ, D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Revista panamericana de salud pública*, Washington, v. 26, n. 4, p. 341-349, out. 2009.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Hanseníase. In: HECHT, M. (Ed.). **Dermatologia**. 3. São Paulo: Artes Médicas, 2007. cap. 41, p.1585.

SAMPAIO L, STEFANI M, OLIVEIRA R, SOUSA A, IRETON G, REED S, DUTHIE M. Immunologically reactive M. leprae antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infectious Diseases**. 2011.

SAMPAIO P, ROSSI T, JUNIOR C, ZANDONADE A. Spatial analysis of new cases of leprosy in the State of Espírito Santo, Brazil, between 2004 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 45(3):380-384, may-jun, 2012

SANTOS, A.R. et al. Detection of Mycobacterium leprae DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1129-33, nov. 2001.

SAINI, C. et al. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SAINI, C. et al. Increase in TGF-beta secreting CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 1, p. e2639, 2014.

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 Negl Trop Dis*, v. 10, n. 4, p. e0004592, Apr 2016.

SAVAGE et al. Mycobacterial r32-kDa antigen-specific T-cell responses correlate with successful treatment and a heightened anti-microbial response in human leprosy patients. *Int. Immunol*; 2008

SCOLLARD, D.M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-81, apr. 2006.

SCHENK, M. et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med*, v. 18, n. 4, p. 555-63, Apr 2012.

SILVA, R. C.; LYON, S.; LYON, A. C.; GROSSI, M. A.; LYON, S. H.; BÜHRERSÉKULA, S.; ANTUNES, C. M. Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 104, n. 8, p. 546–550, aug. 2010.

SILVA ML; MARTINS MA; ESPIRITO-SANTO LR; CAMPI-AZEVEDO AC; SILVEIRA-LEMOES D; RIBEIRO JG; HOMMA A; KROON EG; TEIXEIRA-CARVALHO A; ELOI-SANTOS SM; MARTINS-FILHO OA. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**. 2011: v.29, p.583.

SMITH, W. C. Review of current research in the prevention of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev*, v. 71 Suppl, p. S138-44; discussion S145, Dec 2000.

SOUSA JR; PINTO DS; SILVA PYA; FUZZI HT. Immunolabeling of TNF- α and TGF- β in lesions of patients in several clinical forms of leprosy by immunohistochemistry. **Rev Pan-Amaz Saude** 2013.

SOUZA M, NETTO E, NAKATANI M, DUTHIE M. Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection and leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2014

SOUZA et al. STANDARDIZATION AND VALIDATION OF ELISA FOR DIAGNOSIS OF BOVINE LEPTOSPIROSIS. **Biosci. J**. 2005

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. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 2, p. 260-7, feb. 2011.

STEFANI MMA. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41(Suplemento II):89-94, 2008.

STEFANI, M. M. A.; GRASSI, A. B.; SAMPAIO, L. H.; SOUSA, A. L.; COSTA, M. B.; SCHEELBEEK, P.; NEUPANE, K. D.; HAGGE, D. A.; MACDONALD, M.; CHO, S. N.; OSKAM, L.; BÜHRER-SÉKULA, S. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 107, suppl. I, p. 124-131, dez, 2012

TABOURET, G. et al. *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001159, 2010.

TEIXEIRA, A. C.; CRUVINEL, D. L.; ROMA, F. R.; LUPPINO, L. F.; RESENDE, L. H.; SOUSA, T. D.; BÜHRER-SÉKULA, S.; GOULART, I. M. B. Evaluation of the agreement between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 48-55, 2008.

TELES, R.M. et al. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann cells in human leprosy. **Infect Immun**, v. 78, n. 11, p. 4634-43, nov. 2010.

TORRES, P. et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Lepr Rev**, v. 74, n. 1, p. 18-30, mar. 2003.

TRUMAN R W; J L KRAHENBUHL. Viable *M. leprae* as a research reagent. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 2001: 1–12.

TRUMAN, R. Leprosy in wild armadillos. **Lepr. Rev.** 2005: 198–208.

TURENNE CY; WALLACE R; BEHR MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. **Clin. Microbiol. Rev.** abr. 2007: 20(2):205-229.

VAN BEERS, S. M.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, n. 2, p. 119-28, jun. 1999.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 2, p. 165-72, mar-apr. 2007.

WENT, Y. et al. Evaluation of novel tools to facilitate the detection na characterization of leprosy patients in China. **BioMed Res Int**, v. 2014, p. 371828, aug. 2014.

WHO. Leprosy Resolution WHA 44.9. Forty-fourth World Health Assembly. Geneva. 1991.

WHO. Estratégia Global aprimorada para a redução adicional da carga da Hanseníase. Geneva. 2010.

Weekly epidemiological record. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. Geneva. 2015.

WHO. Global Leprosy Strategy 2016-2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Geneva. 2016.

ZHANG, F. R. et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*, v. 361, n. 27, p. 2609-18, Dec 31 2009.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF

36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “*Análise da transmissibilidade entre contatos de hanseníase em Governador Valadares e Teófilo Otoni, MG*”. Nesta pesquisa pretendemos “Entender porque algumas pessoas, tendo contato com os doentes podem desenvolver a doença e outras não”. O motivo que nos leva a estudar a hanseníase, baseia-se nas elevadas taxas de detecção de casos novas nas cidades em questão. Nosso principal objetivo está na busca de novas estratégias de vigilância e monitoramento biológicos dos indivíduos infectados com o *M.leprae* e seus contatos intradomiciliares, contribuindo para ações de controle, apresentando novas formas de diagnóstico clínico-laboratorial e aumentando a perspectiva de entendimento mais aprofundado da doença. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos:

Inicialmente será realizado um exame clínico, por profissionais da saúde treinados. Durante o exame clínico, o profissional de saúde, através de um questionário, fará perguntas a respeito da doença hanseníase que alguém da sua família tem e que mora na mesma casa que você. Você poderá recusar a responder qualquer pergunta que porventura lhe causar algum constrangimento.

Além do exame médico, é necessário realizar testes para auxiliar o médico a detectar a doença. Um destes testes é chamado de Teste de Fluxo lateral. Este é um teste utilizado na rotina médica e consiste na coleta de sangue do seu braço. O sangue também será utilizado para a realização de outros testes como, por exemplo, o teste de ELISA para medir anticorpos e outras substâncias presentes no sangue como as citocinas que irão mostrar como o seu organismo se defende deste micróbio. Outros materiais biológicos como saliva, raspado dérmico, secreção muco-nasal e urina serão utilizados para avaliar a presença do micróbio *M. leprae*. Estes testes serão realizados no laboratório de Imunologia da Univale e para isso será necessário coletar cerca de 30 ml do seu sangue.

O sangue será coletado por profissional treinado. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. A coleta de sangue pode causar leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Poderá ocorrer um desconforto a você paciente como tonturas e desmaios, ou outros desconfortos psíquicos como ansiedade e medo, que será levado em conta no momento da coleta, e será providenciado uma coleta mais cuidadosa e você coletará o sangue deitado, para evitar qualquer tipo de constrangimento, ou aborrecimento.

Coleta de saliva: Coloca-se um pedaço de algodão odontológico embaixo da língua do doador durante 5 minutos. Após este tempo, retira-se o algodão com o auxílio de uma pinça e o transfere para um tubo apropriado. Desconfortos e riscos: Podem ocorrer vômitos. Não existem riscos na retirada desse material.

Coleta de secreção muco nasal: Uma pessoa treinada irá passar um cotonete na região mais adequada do nariz (mais bacilo). A seguir este cotonete será colocado em um tubo contendo álcool 70°. Desconfortos e riscos: São cócegas na região onde o cotonete será passado e espirros convulsivos. Não existem riscos na retirada desse material.

Coleta de linfa (coleta de linfa dos lóbulos dos ouvidos, cotovelo e por vezes também dos joelhos): Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a coleta da linfa com o auxílio de um bisturi. Desconfortos e riscos: Ardência e muito raramente uma infecção.

Medidas de biossegurança são adotadas em todos os procedimentos realizados neste projeto, que visam salvaguardar o coletor de qualquer possibilidade de contaminação, bem como evitar injúria ao paciente, no ato da coleta de coleta de sangue via punção venosa, e uso de bisturis, onde são observadas medidas de segurança para acidentes com perfuro cortantes, riscos de contaminação, que são minimizadas com a realização de antissepsia do ponto de punção, assepsia das mãos entre o atendimento dos pacientes e imunização ativa contra tétano, difteria e hepatite B, para todos os profissionais de saúde envolvidos neste projeto.

Caso os resultados dos exames clínicos e laboratoriais sejam positivos para a hanseníase, você será orientado adequadamente e encaminhado para tratamento médico gratuito.

Para participar deste estudo o Sr (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso seja identificado e comprovado danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito a indenização. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Núcleo de Pesquisa em Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce - Univale** e a outra será fornecida ao senhor. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa “*Análise da transmissibilidade entre contatos de hanseníase em Governador Valadares e Teófilo Otoni, MG*”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, _____ de _____ de 20 .

| | | |
|------|-------------------------|------|
| Nome | Assinatura participante | Data |
|------|-------------------------|------|

| | | |
|------|------------------------|------|
| Nome | Assinatura pesquisador | Data |
|------|------------------------|------|

| | | |
|------|-----------------------|------|
| Nome | Assinatura testemunha | Data |
|------|-----------------------|------|

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano-UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

Nome do Pesquisador Responsável: Lúcia Alves Fraga

Endereço: Rua Euzebinho de Cabral

CEP: / Juiz de Fora – MG

Fone: (32)

E-mail: luciaalvesfraga@yahoo.com.br