

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA CAMPUS GOVERNADOR
VALADARES**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

Maisa Pereira Vieira

**Identificação de Biomarcadores nutricionais relacionados ao
desenvolvimento de hanseníase em associação com a infecção pelo *S.*
*mansoni***

Governador Valadares – MG

2024

Maisa Pereira Vieira

Identificação de Biomarcadores nutricionais relacionados ao desenvolvimento de hanseníase em associação com a infecção pelo *S. mansoni*

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) da Universidade Federal de Juiz de Fora – *Campus Governador Valadares*, como parte dos requisitos para obtenção do título em mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Lucia Alves de Oliveira Fraga

Governador Valadares – MG

2024

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

Pereira Vieira, Maisa.

Identificação de Biomarcadores nutricionais relacionados ao desenvolvimento de hanseníase em associação com a infecção pelo *S. mansoni* / Maisa Pereira Vieira. -- 2024.

80 p.

Orientador: Lucia Alves de Oliveira Fraga

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

1. Hanseníase. 2. Esquistossomose. 3. Vitamina D. 4. Vitamina A. 5. Ferritina. I. Alves de Oliveira Fraga, Lucia, orient. II. Título.

Maisa Pereira Vieira

Identificação de Biomarcadores relacionados ao desenvolvimento de hanseníase em associação com a infecção pelo *S. mansonii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 30 de julho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Gabriella Freitas Ferreira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Livia Tavares Colombo

UNIVALE

Juiz de Fora, 11/07/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Alves de Oliveira Fraga, Professor(a)**, em 30/07/2024, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Tavares Colombo, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 18:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira, Professor(a)**, em 01/08/2024, às 22:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1857482** e o código CRC **DE1CD5AE**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus, pela força e sabedoria concedidas ao longo deste percurso.

Ao meu esposo Leonardo e aos meus familiares, Aparecida, Silvano e Tainá, que sempre me apoiaram incondicionalmente, oferecendo amor, suporte emocional e financeiro. Sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga, pela orientação, paciência e encorajamento. Sua expertise e dedicação foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Marçal pela colaboração genuína no desenvolvimento desse estudo.

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisas em Hansenologia (NuPqHans), pela colaboração, apoio e troca de conhecimentos ao longo desta jornada. A amizade e o profissionalismo de vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas colegas de curso, pelo companheirismo, pelas discussões acadêmicas e pelas risadas compartilhadas. A colaboração e a troca de conhecimentos foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores, pelo ambiente acolhedor e pelas oportunidades de aprendizado e desenvolvimento.

Aos órgãos financiadores: Emory University, Atlanta – Geórgia, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG, UFJF-PROEX, PROPP, NIH-CNPq.

Por fim, dedico este trabalho a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho. Cada um de vocês tem um lugar especial nesta conquista.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, cujas manifestações são influenciadas pela resposta imune do hospedeiro. Infecções por helmintos e deficiências de micronutrientes podem coexistir com a hanseníase, levando a supressão da resposta imunológica. O objetivo desse trabalho é identificar biomarcadores nutricionais relacionados ao desenvolvimento de hanseníase em associação com a coinfeção pelo *S. mansoni*. Um estudo longitudinal conduzido pelo grupo NUPqHANS/CNPq, que selecionou aleatoriamente 1.200 participantes de Governador Valadares/MG e arredores. Coletaram-se amostras de sangue e urina. A reatividade de anticorpos ao antígeno Leprosy IDRI diagnostic 1 (LID-1) foi realizada via ensaio Multiplex (CDC-EUA). A detecção presuntiva de esquistossomose se deu por meio do Kit Urine CCA. A presença de anticorpos anti-SEA e anti-SWAP foi verificada por ELISA (CPqRR/FIOCRUZ/BH), e os níveis de vitamina D, A e Ferritina foram analisados em um laboratório parceiro. Dos 1200 participantes, 81 apresentaram anticorpos anti-LID (LID+). Esses foram monitorados para confirmação de hanseníase e agrupados em três grupos: LID(+)Schisto(-)ND (N=33), LID(+)Schisto(+)ND (N=26) e LID(+)Schisto(-)D (N=19). Os resultados destacam que os níveis de vitamina A e D foram significativamente menores no grupo com diagnóstico de hanseníase (LID(+)Schisto(-)D). Ambas as vitaminas se mostraram como biomarcadores eficazes para distinguir entre os grupos LID(+)Schisto(-)ND e LID(+)Schisto(-)D, bem como entre os grupos LID(+)Schisto(+)ND e LID(+)Schisto(-)D. Além disso, níveis mais elevados de ferritina estavam associados à gravidade da condição de saúde (LID(+)Schisto(+)ND e LID(+)Schisto(-)D). Assim, é possível se concluir que os marcadores nutricionais são regulados de maneiras distintas, dependendo da presença de uma ou ambas as infecções e da hanseníase.

Palavras chave: hanseníase; esquistossomose; vitamina A; vitamina D; ferritina; biomarcadores.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, whose manifestations are influenced by the host's immune response. Helminth infections and micronutrient deficiencies may coexist with leprosy, suppressing the immune response. This study aimed to identify nutritional biomarkers associated with developing leprosy and coinfection by *S. mansoni*. A longitudinal study was conducted by the NUPqHANS/CNPq group, which randomly selected 1,200 participants from Governador Valadares/MG and surrounding areas. Blood and urine samples were collected. Antibody reactivity to the Leprosy IDRI diagnostic 1 (LID-1) antigen was performed using a Multiplex assay (CDC-USA). Presumptive detection of schistosomiasis was performed using the Urine CCA Kit. The presence of anti-SEA and anti-SWAP antibodies was verified by ELISA (CPqRR/FIOCRUZ/BH), and the levels of vitamin D, A, and Ferritin were analyzed in a partner laboratory. Of the 1200 participants, 81 presented anti-LID antibodies (LID+). These were monitored for confirmation of leprosy and grouped into three groups: LID(+)*Schisto*(-)ND (N=33), LID(+)*Schisto*(+)ND (N=26), and LID(+)*Schisto*(-)D (N=19). The results highlight that the levels of vitamin A and D were significantly lower in the group diagnosed with leprosy (LID(+)*Schisto*(-)D). Both vitamins were shown to be effective biomarkers to distinguish between the LID(+)*Schisto*(-)ND and LID(+)*Schisto*(-)D groups, as well as between the LID(+)*Schisto*(+)ND and LID(+)*Schisto*(-)D groups. Furthermore, higher ferritin levels were associated with the severity of the health condition (LID(+)*Schisto*(+)ND and LID(+)*Schisto*(-)D). Thus, it can be concluded that nutritional markers are regulated differently depending on the presence of one or both infections and leprosy.

Keywords: leprosy; schistosomiasis; vitamin A; vitamin D; ferritin; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES - FIGURAS

Figura 1 Distribuição da taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por município de residência no Brasil, de 2013 (A) a 2022 (B)	16
Figura 2 Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase segundo URS de residência em Minas Gerais entre 2017 e 2021.....	18
Figura 3 Classificação da hanseníase, segundo Ridley e Jopling	20
Figura 4 Principais estágios do ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 5 Resposta de células T na infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> em humano	25
Figura 6 Níveis de Vitaminas A, D e Ferritina no soro dos grupos de indivíduos participantes do estudo	53
Figura 7 Análise comparativa dos níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina entre os grupos de estudo	55
Figura 8 Análise da performance dos biomarcadores selecionados para identificar indivíduos dos subgrupos estudados	57
Figura 9 Níveis de vitamina A, D e Ferritina e análise de correlação nos grupos de estudo	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características sociodemográficas dos participantes..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB – Boderline boderline
BL – Boderline Lepromatoso
BT – Boderline Tuberculóide
DC – Células dendríticas
DMT1 – Transportador de metal divalente
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESF – Estratégia de saúde da família
Fe – Ferro
IB – Índice baciloscópico
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
KK – Kato Katz
LID-1 - Leprosy Infectious Disease Research Institute Diagnostic-1
LL – Lepromatoso
MB – Multibacilares
MBA – Multiplex Bead Assay
MFI – Média de fluorescência
NO – Óxido nítrico
OMS – organização Mundial da Saúde
PB – Paucibacilar
PBS - Tampão Fosfato Salino
PGL-1 - Glicolípido fenólico 1
POC – CCA - Teste rápido com o Antígeno Catódico Circulante
PQT – Poliquimioterapia
PTH – Paratireoide
SEA- Antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni*
SWAP – Antígeno Solúvel de verme adulto
TT – Tuberculóide
URS – Unidade Regional de Saúde
UVB – Ultravioleta tipo B
VA – vitamina A
VDBP - Proteína de ligação à vitamina D
VDR – Receptor de vitamina D

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Patogenicidade do <i>M. leprae</i>	14
2.2 Panorama Epidemiológico da Hanseníase	14
2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase	17
2.4 Classificação das formas clínicas	19
2.5 Esquemas terapêuticos / Tratamento	20
2.2.1 Co infecção por Helminhos (<i>Schistosoma mansoni</i>) e <i>M leprae</i>	21
2.2.2 Métodos para o diagnóstico da esquistossomose	26
2.3 Vitamina A, D e Ferritina na hanseníase	30
2.3.1 Vitamina D	30
2.3.2 Vitamina A	33
2.3.3 Ferritina e Ferro	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos	39
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 População e desenho de estudo	40
4.2 Critérios de inclusão e exclusão	40
4.3 Considerações éticas	41
4.4 Ensaio Multiplex bead Assay (MBA) para análise da reatividade de anticorpos ao antígeno Leprosy IDRI diagnostic 1 (LID-1).....	42
4.5 Coleta de sangue para ensaios imunológicos	43
4.6 Ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos anti-SEA (antígeno solúvel de ovo de <i>S. mansoni</i>) e anti-SWAP (antígeno solúvel de verme adulto de <i>S. mansoni</i>)	44
4.7 Teste para a detecção presuntiva de esquistossomose - Urine CCA (<i>Schisto</i>) .	45
4.8 Determinação quantitativa de vitamina A, D (25-OH vitamina D) e Ferritina	45
4.9 Análise estatística dos dados	46
4.10 Análise da assinatura das vitaminas A e D e da ferritina	46
4.11 Diagrama de Venn	47
4.12 Gráfico Volcano plot	47
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO	60
8 REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Seu diagnóstico baseia-se no exame clínico, baciloscopia e histopatologia, que, apesar de específicos, apresentam baixa sensibilidade e possuem limitações técnicas e práticas (CAVALCANTI, Ana Amélia Lucena et al., 2012). Além dos desafios diagnósticos, essa doença está associada à pobreza, coinfeção por helmintos e deficiências de micronutrientes (DENNISON, Cori L. et al., 2021).

A hanseníase integra o grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DNT), juntamente com doenças de origem protozoária, helmíntica, bacteriana, viral, fúngica e parasitária, prevalentes em países e territórios de clima tropical, onde são comuns situações de pobreza, desigualdade e iniquidades em saúde (SALAROLI, Robson et al., 2024). O leste de Minas Gerais é altamente endêmico tanto para esquistossomose quanto para hanseníase, apresentando significativa pobreza rural e urbana (FONSECA et al., 2014).

Sabendo que as manifestações e sintomas da hanseníase são em grande parte determinados pela resposta imune do hospedeiro, observou-se que infecções por helmintos podem facilitar a infecção por *M. leprae* e a progressão para suas formas mais infecciosas (DENNISON, Cori L. et al., 2021). Deficiências nutricionais também podem afetar a resposta imune na hanseníase.

Um estudo piloto de caso-controle que foi conduzido em 73 pacientes com hanseníase multibacilar em Belo Horizonte/ Brasil, demonstrou que 11 (15%) indivíduos da amostra apresentaram infecção por helmintos e mais da metade (52%) tinham deficiência de vitamina, demonstrando que deficiência de vitaminas e infecções por helmintos eram prevalentes nesses pacientes.

Determinar se infecções por helmintos e/ou deficiências de micronutrientes estão presentes em pacientes com hanseníase pode ampliar a compreensão dos fatores que influenciam a suscetibilidade à hanseníase e sua evolução. Dessa forma, o presente estudo foi desenvolvido para investigar associações potenciais entre hanseníase, infecções por helmintos e deficiências de micronutrientes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da hanseníase

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica que pode afetar a pele, os nervos periféricos (braços e pernas), os olhos e a mucosa nasal (WHO, 2018; JOPLING, 1983). É causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo intracelular obrigatório, com tropismo por macrófagos e células de Schwann (DAVEY, TF., 1977). Por possuir predileção pela pele e nervos periféricos a infecção apresenta alto poder incapacitante e se o diagnóstico for tardio ou o tratamento inadequado a doença pode ocasionar lesões neurais, oftálmicas e incapacidades físicas, que podem ser potencialmente irreversíveis (DAVEY, TF., 1977; BRASIL, 2017; BRASIL, 2024).

A hanseníase é considerada uma doença de evolução lenta e progressiva, por possuir longo período de incubação, durando em média dois a cinco anos (hanseníase paucibacilar) e cinco a dez anos (hanseníase multibacilar), atingindo pessoas de ambos os sexos de qualquer etnia ou idade (WHO, 2018; JOPLING, 1983).

A doença apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade; a forma de transmissão ocorre por meio de gotículas da mucosa nasal e orofaringe, durante o contato próximo e prolongado de indivíduos saudáveis com casos não tratados da doença (OMS, 2017). Outra hipótese de transmissão é o contato humano com carne de tatus naturalmente infectados pelo *M. leprae* (MENDONÇA et al., 2008).

2.2 Panorama Epidemiológico da Hanseníase

A prevalência da hanseníase está relacionada principalmente as condições socioeconômicas, baixa renda e acesso reduzido a cuidados de saúde, fatores que se relacionam principalmente ao estigma e exclusão social (OMS, 2020).

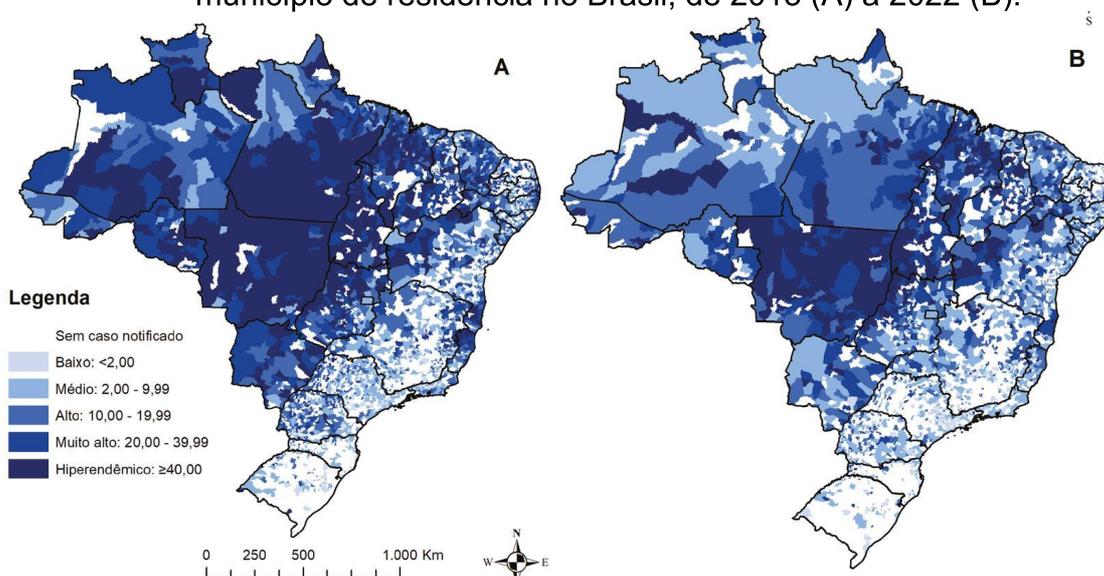
Segundo Souza e colaboradores (2020) os indivíduos que vivem nas periferias das cidades, em condições inapropriadas de moradia, com pouco acesso aos serviços municipais e em alto grau de vulnerabilidade apresentam alto risco de contrair a doença. Desse modo, a ascensão econômica dos indivíduos impacta diretamente na educação, saneamento, estado nutricional e condições de moradia que são determinantes sociais comprovadamente envolvidos na manutenção da cadeia epidemiológica de transmissão da hanseníase.

Por estar ligada diretamente à pobreza, más condições sanitárias e de habitação, a hanseníase tem acometido famílias marginalizadas, residentes em regiões pobres e privadas de bens de consumo. Essas circunstâncias tem impedido a adoção de comportamentos saudáveis e o acesso a serviços básicos, o que aumenta ainda mais a vulnerabilidade dessas populações (LEVANTEZI; SHIMIZU; GARRAFA, 2020; MENDONÇA et al., 2008).

Apesar de apresentar terapêutica comprovadamente eficaz, a hanseníase persiste como problema de saúde pública em muitos países no mundo, inclusive no Brasil (MONTEIRO et al., 2017). Dados do Boletim Epidemiológico de Hanseníase publicado pelo Ministério da saúde no ano de 2024, demonstraram que embora nas últimas décadas avanços sobre as perspectivas de prognóstico e tratamento da hanseníase tenham sido conquistados, em 2022 foram registrados 174.087 casos novos da doença no mundo. O Brasil permanece em segundo lugar no ranking mundial em número de casos novos, sendo classificado como um país prioritário para hanseníase pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2020; BRASIL, 2024).

Durante o período de 2013 a 2022 foram notificados 316.182 casos de hanseníase no Brasil, sendo que 80,6% (n=254.918) eram “casos novos”; 7,4% (n=23.432), “transferências”; 7,0%), (n=22.177), “outros reingressos”; e 4,7% (n=14.926), “recidivas”. Abaixo (Figura 1) encontra-se a distribuição da taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por município de residência no Brasil, de 2013 (A) a 2022 (B).

Figura 1 Distribuição da taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por município de residência no Brasil, de 2013 (A) a 2022 (B).



Fonte: Ministério da saúde 2024

Entre os anos de 2013 e 2022 houve uma redução de 28,9% no número de casos notificados. Entretanto, reanálise desses dados mostrou que durante a pandemia de covid-19 houve um alto grau de subdiagnósticos, uma vez que nos anos pré-pandemia da covid-19 (2013 a 2019) ocorreu uma redução de apenas 0,8% no número de casos notificados (BRASIL, 2024).

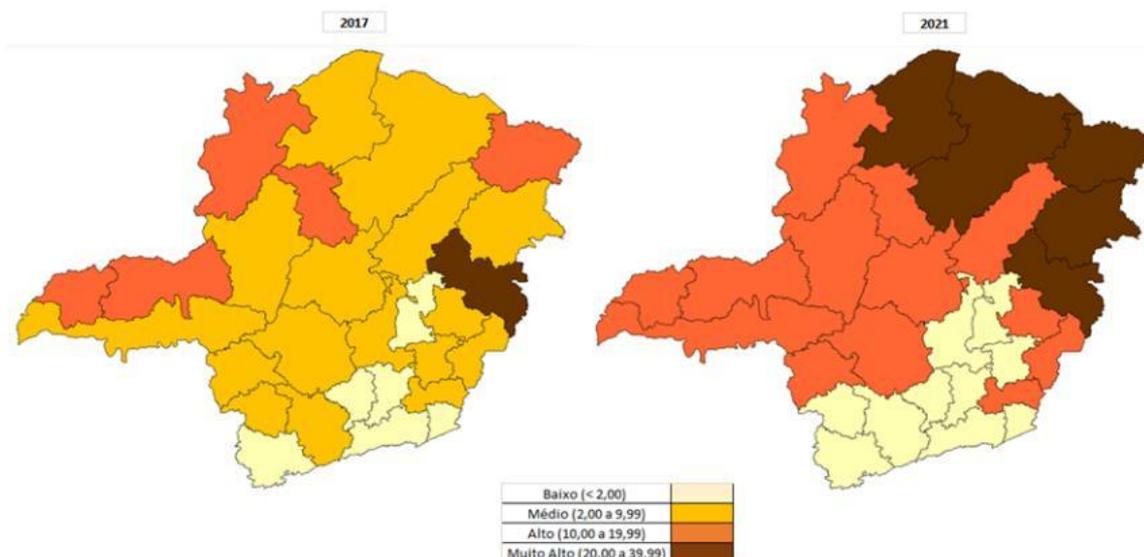
Além disso, 4,7% (n=14.126) das notificações caracterizavam como recidivas, demonstrando a necessidade contínua de aprimoramento nas estratégias de prevenção e acompanhamento dos pacientes.

Em relação ao perfil de casos novos (n=254.918 casos) mais da metade são do sexo masculino (55,6%), idade entre 30 e 59 anos (53,9%), maioria parda (58,3%) e ensino fundamental incompleto (47,6%). Quanto à forma clínica, 46,7% (n=118.945) foram classificados como “dimorfa”, 16,4% (n=41.707) como “virchowiana”, 14,3% (36.534) como “tuberculoide”, 13,2% (n=33.644) como “indeterminada” e 5,7% (n=14.438) não foram classificados.

Os dados da taxa de detecção de hanseníase por Unidade Regional de Saúde (URS) publicados no boletim epidemiológico da (SE/MG, 2022) demonstraram que no ano de 2017 cerca de 97,89% dos municípios do estado possuía baixa prevalência de hanseníase, ao passo que nenhum município apresentava alta, muito alta ou hiperendemia da doença. Já, em 2021 foi possível observar uma mudança nesse cenário, visto que a baixa prevalência foi reduzida para 80,77% com o surgimento de prevalência de alta (2,11%), muito alta (0,23%) e hiperendemia (0,12%).

Em 2017 apenas Governador Valadares apresentava taxa de detecção muito alta em Minas Gerais, mas em 2021 os municípios de Januária, Montes Claros, Pedra Azul e Teófilo Otoni também apresentaram essa taxa. Além disso, a alta detecção, que era percebida em 5 URS em 2017, passou a ocorrer em 13 URS em 2021 e nesse mesmo ano 10 URS apresentaram baixa taxa de detecção, o dobro das regionais classificadas em 2017 (BRASIL, 2022) (Figura 2).

Figura 2 Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase segundo URS de residência em Minas Gerais entre 2017 e 2021



Fonte: BRASIL, 2022

2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase

Atualmente não existe padrão-ouro para o diagnóstico da hanseníase, visto que o *M. leprae* não pode ser cultivado em meios sintéticos ou em culturas de células. Além disso, o bacilo pode não ser encontrado nos exames de baciloscopia de raspado dérmico e histopatológicos, o que torna o diagnóstico eminentemente clínico e epidemiológico (ALVES, FERREIRA e FERREIRA, 2014, BRASIL, 2017).

O diagnóstico clínico é realizado frente a presença de um ou mais dos três sinais cardinais da doença: lesão(ões) de pele hipopigmentadas ou avermelhadas com alteração de sensibilidade térmica, dolorosa ou tátil; acometimento de nervo(s) periférico(s), com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; e baciloscopia de esfregaço intradérmico positiva (BRASIL, 2017).

Embora a baciloscopia demonstre alta especificidade, apresenta baixa sensibilidade, não sendo capaz de detectar a hanseníase paucibacilar. Além disso, a avaliação clínica detecta a doença já instalada, porém não é capaz de diagnosticar indivíduos infectados, mas que ainda são assintomáticos. O diagnóstico da doença enfrenta ainda uma série de desafios técnicos devido à sua natureza invasiva, requisitos específicos de materiais e a necessidade de conhecimentos especializados (AMORIM, Francianne M. et al., 2016).

Numerosos ensaios sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico precoce da hanseníase, monitoramento da poliquimioterapia (PQT) e vigilância dos contatos domiciliares. Um dos principais é baseado na detecção de anticorpos contra o glicolípido fenólico I (PGL-I), um antígeno específico do *M. leprae* descoberto nos anos 1980 (HUNTER e BRENNAN, 1981). Atualmente, a porção dissacarídica terminal do PGL-I é amplamente utilizada para investigar a presença de anticorpos IgM contra *M. leprae*, sendo os títulos diretamente relacionados à carga bacilar dos pacientes. Níveis elevados indicam hanseníase MB ativa, tratada recentemente ou exposição recente e intensa ao *M. leprae*. Embora útil para o diagnóstico de hanseníase neural primária, essa sorologia não detecta anticorpos na maioria dos pacientes PB (BOVOLINI; SILVA; DE SOUZA, 2019).

Visando o aprimoramento do diagnóstico sorológico, especialmente para pacientes PB, uma proteína recombinante, LID-1 (leprosy IDRI diagnostic-1) foi desenvolvida pela fusão dos genes *ml0405* e *ml2331* para produzir uma única proteína quimérica com melhor sensibilidade do que as proteínas originais sozinhas. Observou-se que os antígenos proteicos recombinantes ML0405 e ML2331 exibiram alta sensibilidade para a detecção de anticorpos contra a hanseníase em todo o espectro clínico quando testados contra grandes painéis de soros de muitas regiões geográficas diferentes (Filipinas, Brasil e Japão) (AMORIM, Francianne M. et al., 2016.)

Sendo um antígeno proteico de significativa importância, o LID-1 pode ser reconhecido por anticorpos IgG presentes no soro da maioria dos pacientes multibacilares (MB) em várias regiões endêmicas de hanseníase no mundo. Sua notável reatividade o posicionou como uma das opções mais promissoras para a criação de testes voltados à detecção da hanseníase (FREITAS, Alline Araújo et al., 2016; BOVOLINI; SILVA; DE SOUZA, 2019).

A LID-1 pode atuar como um indicativo de infecção por *M. leprae* antes do aparecimento de sinais que permitam o diagnóstico clínico da hanseníase, sendo que a avaliação regular dos níveis de anticorpos durante e após o tratamento pode ser utilizado para avaliar sua eficácia. Desse modo a triagem de anticorpos anti-LID-1 na população pode acelerar o tratamento de pacientes com hanseníase contribuindo significativamente para a redução da taxa de transmissão (CARVALHO et al., 2017).

Apesar dos avanços, ainda existem desafios na implementação ampla da LID-1 em unidades de saúde devido às variações na sensibilidade e especificidade em diferentes populações e formas clínicas da doença. A adoção desses testes depende de mais estudos que validem sua eficácia e de políticas de saúde pública que integrem esses métodos de diagnóstico de forma eficaz no sistema de saúde (TELES, Stéfanie Ferreira et al., 2020, GOBBO, Angélica Rita et al., 2022).

2.4 Classificação das formas clínicas

A classificação espectral da hanseníase foi proposta por Ridley e Jopling (1962) e baseia-se nas características clínicas, baciloscópicas e histopatológicas dos indivíduos infectados e distingue-se em dois polos: O polo Tuberculóide (TT), que é a forma de alta resistência à infecção, na qual as manifestações estão relacionadas à exacerbação da resposta imune celular, com a formação de granuloma bem definido, limitação das lesões e destruição completa dos bacilos. E o polo Lepromatoso (LL) que é a forma de alta susceptibilidade, que se caracteriza por deficiência de resposta imune celular, excessiva multiplicação bacilar e disseminação da infecção para vísceras e tecido nervoso (FOSS, 1997; MENDONÇA et al., 2008). Figura 3.

Figura 3 Classificação da hanseníase, segundo Ridley e Jopling

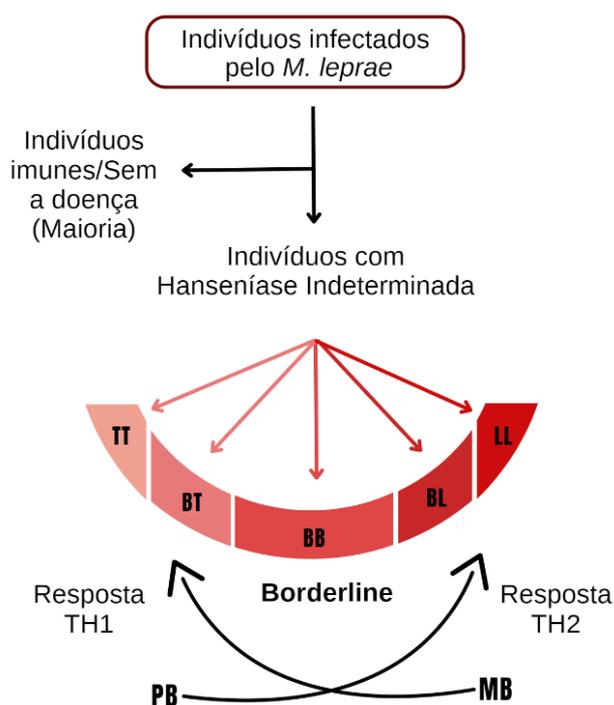


Figura 3 TT - tuberculóide tuberculóide; BT - borderline tuberculóide; BB - borderline borderline; BL - borderline lepromatoso; LL - lepromatoso lepromatoso.

Fonte: Adaptado de Hargrave et al., (2010)

Entre os dois polos há três formas intermediárias e dinâmicas. A forma mais próxima da Tuberculóide é chamada Borderline tuberculóide (BT), a mais centralizada é conhecida como Borderline borderline (BB) e assemelhando-se ao polo Lepromatoso têm-se a forma Borderline lepromatoso (BL) (MENDONÇA et al., 2008).

Para pesquisas científicas a classificação de Ridley e Jopling (RIDLEY e JOPLING, 1966) é a mais recomendada (MENDONÇA et al., 2008). Entretanto, devido a necessidade de expansão da campanha de eliminação da hanseníase, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs em 1982, a classificação da doença, conforme o resultado do exame de baciloscopia (ALVES, FERREIRA e FERREIRA, 2014). Sendo assim, considerando os critérios clínicos os pacientes podem ser classificados em paucibacilares (até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido) e multibacilares (mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido). Nos centros de referência onde o exame baciloscópico é disponível, pacientes com resultado positivo são considerados multibacilares, independentemente do número de lesões (BRASIL, 2002).

2.5 Esquemas terapêuticos / Tratamento

A estratégia terapêutica adotada pela WHO para o tratamento da Hanseníase, baseia-se no uso da poliquimioterapia (PQT), um esquema terapêutico composto por Dapsona, Rifampicina e Clofazimina visando a cura, redução das taxas de deformidade e interrupção da cadeia de transmissão da doença. Tal estratégia é adotada, uma vez que o tratamento com apenas uma droga (monoterapia) poderia contribuir para a seleção de cepas resistentes (CRESPO e GONÇALVES, 2014; BRASIL, 2017).

O tratamento deve ser iniciado já na primeira consulta após o diagnóstico, sendo necessária a classificação dos pacientes como PB ou MB para definição da duração do tratamento, que deverá ocorrer por 6 e 12 meses, respectivamente (BRASIL, 2017). As primeiras doses de medicação já são efetivas para interromper a transmissão, apesar disso a maior causa de recidivas da doença se dá pelo tratamento inadequado ou incorreto, sendo a conclusão do tratamento primordial para a cura e

prevenção de reincidências e novas contaminações (MAYMONE et al., 2020; Brasil, 2002).

A rifampicina é considerada a droga mais importante na PQT padrão, sendo assim, os poucos pacientes que iniciam o tratamento e têm resistência à rifampicina isoladamente ou em associação com a resistência à dapsona, devem recomeçar um tratamento completo de segunda linha, independentemente dos resultados clínicos com a PQT (BRASIL, 2017).

2.2.1 Co infecção por Helmintos (*Schistosoma mansoni*) e *M leprae*

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada por platelmintos parasitas (vermes achatados) do gênero *Schistosoma* (Filo: *Platyhelminthes*, Classe: *Trematoda*) que apresenta como característica a existência de sexos separados, com nítido dimorfismo sexual (BUDDENBORG et al., 2023). O *Schistosoma mansoni* é um patógeno importante que infecta humanos e causa a esquistossomose, também conhecida como Doença dos Caramujos, Bilharziose, Xistose, Xistosa, Barriga d'Água, Doença de Manson-Pirajá da Silva e outras designações menos usuais (BRASIL, 2014).

A esquistossomose é a infecção helmíntica humana mais importante em termos de morbidade e mortalidade global, representando um problema de saúde pública em países endêmicos, como o Brasil, acometendo milhões de pessoas, provocando um número expressivo de formas graves e óbitos (OLIVEIRA et al., 2016). Em geral, a infecção ocorre em locais sem saneamento ou com saneamento básico inadequado, sendo adquirida através da pele e mucosas em consequência do contato humano com águas contendo formas infectantes do *S. mansoni* (BRASIL, 2014).

Sendo uma doença de veiculação hídrica, a transmissão da esquistossomose ocorre quando o indivíduo suscetível entra em contato com águas onde existem cercárias livres. A cadeia de transmissão da doença se inicia quando o homem infectado por parasitas adultos sexualmente maduros, elimina ovos viáveis de *S. mansoni* por meio de suas fezes. Ao entrar em contato com a água esses ovos expelidos, eclodem e liberam larvas móveis chamadas miracídios, as quais infectam caramujos aquáticos (hospedeiros intermediários). Após 48 horas, o miracídio perde a mobilidade e se transforma em esporocisto primário, cujas células germinativas se multiplicam e dão origem a esporocistos secundários. Após quatro a sete semanas da

infecção, o molusco começa a liberar cercárias, sendo essa a forma que o *S. mansoni* infecta o hospedeiro definitivo, seja ele o homem ou qualquer vertebrado suscetível (BERRIMAN et al., 2009; BRASIL, 2014).

Uma vez nos tecidos do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Esses caem na circulação sanguínea e atravessam a vasculatura até que os parasitas masculinos e femininos amadureçam sexualmente. Os vermes maduros residem na vasculatura portal humana, depositando ovos na parede intestinal que passam para o lúmen intestinal e são eliminados nas fezes, ou migram para o fígado, onde ocorre a formação de granuloma e fibrose periportal (BERRIMAN et al., 2009). Figura 4.

Figura 4 Principais estágios do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*



Figura 4 O platelminto *S. mansoni* passa por uma série de transições morfológicas ao longo do desenvolvimento, usando estágios aquáticos para fazer a transição entre o hospedeiro intermediário (caramujo), e o hospedeiro definitivo (homem). Parasitas adultos sexualmente maduros excretam ovos nas fezes de seu hospedeiro definitivo que, ao entrar em contato com a água, eclodem para liberar larvas móveis chamadas miracídeos. Os miracídeos procuram e infectam caracóis hospedeiros intermediários de água doce e sofrem replicação clonal assexuada antes de reentrar na água como cercárias para infectar o hospedeiro definitivo mamífero. Dentro do hospedeiro mamífero, as cercárias se desenvolvem em

esquistossômulos e atravessam a vasculatura até que os parasitas masculinos e femininos amadureçam, tornando-se reprodutivamente competentes nas veias mesentéricas dos intestinos.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014, BUDDENBORG et al., 2023 e PEARCE; MACDONALD, 2002.

O curso clínico dessa parasitose é influenciado por vários fatores, incluindo a localização do parasita, a intensidade da infecção e a resposta imunológica do indivíduo aos antígenos do *Schistosoma*. A infecção pelo *S. mansoni* pode causar diversas manifestações clínicas no hospedeiro definitivo e pode cursar em duas fases distintas: Aguda e crônica (CARVALHO, 2016).

A resposta imunológica contra o patógeno inicia-se quando as cercarias penetram através da pele e liberam moléculas imunogênicas que a auxiliam na entrada e transformação em esquistossômulos. Nesse momento a resposta imune é inata, sendo poucos dias depois seguida por uma resposta adaptativa do tipo TH1 dominante (IFN γ , IL-2, IL-1, IL-6) que ativa macrófagos e induzem a produção de imunoglobulina G (IgG) pelos linfócitos B (BURKE et al., 2009).

Por volta da sexta semana de infecção, à medida em que os parasitas amadurecem, acasalam e começam a produzir ovos a resposta imune altera-se acentuadamente, levando a uma diminuição no componente imunológico tipo 1 e ao surgimento concomitante de uma resposta potente do tipo 2 com uma forte estimulação da produção de IL-4 e IL-5, que aliada a IL-10, resulta na modulação da resposta Th1 e polarização da resposta Th2 estimulando o aumento e ativação de eosinófilos, basófilos, mastócitos e altos níveis de IgE circulantes (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013; BURKE et al., 2009).

Sabe-se que os ovos produzidos por vermes fêmeas maduras são potentes indutores de resposta tipo 2 e o pico dessa resposta corresponde a atividade celular máxima contra o ovo e está intimamente associado à magnitude da inflamação granulomatosa que o envolve. Os antígenos solúveis do ovo (SEA) promovem essa atividade além de estimular a secreção de IL-10. A produção de IL-10 pode contribuir para o desenvolvimento da população de células T regulatórias e inibir respostas inflamatórias, tanto a resposta imune Th1 quanto a Th2, regulando a intensidade da inflamação, atuando na redução da formação de granulomas hepáticos e da indução de fibrose (Figura 5) (CARVALHO, 2016; BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013; BURKE et al., 2009; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

Figura 5 Resposta de células T na infecção por *Schistosoma mansoni* em humano

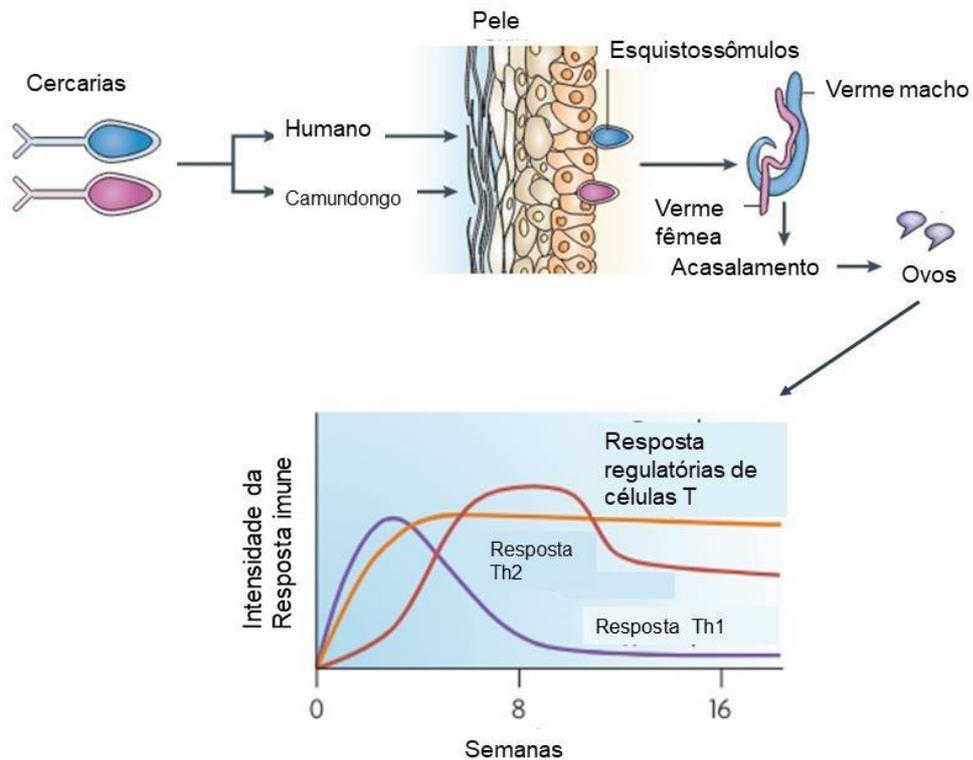


Figura 5 Cercarias masculinas e femininas penetram na pele do hospedeiro, as cercarias se desenvolvem em esquistossômulos e atravessam a vasculatura até que os parasitas masculinos e femininos, agora residentes na veia mesentérica, copulem para eliminar ovos. A intensidade da resposta imune durante o curso da infecção envolve uma resposta inicial Th1 que é substituída por resposta Th2 que é estimulada pelos antígenos de ovos ao mesmo tempo que ocorre o surgimento de um ambiente regulador de células T. Após 12-16 semanas, ocorre um estado crônico com respostas controladas de TH1 e TH2 e uma resposta sustentada de células T reguladoras. A infecção crônica pode durar 5-10 anos, modulando a resposta imunológica por todo esse período.

Fonte: Adaptado de FALLON; MANGAN, 2007

A resposta de anticorpos contra a esquistossomose humana varia de acordo com a fase clínica da doença. Pacientes na fase aguda produzem altos níveis de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e baixos níveis de anticorpos IgM e IgG4 contra antígenos do esquistossômulo, enquanto que indivíduos, na fase crônica exibem uma baixa resposta de IgG1, IgG2 e IgG3 e alta produção de IgG4 em resposta a antígenos do esquistossômulo e do verme adulto (DEMEURE et al., 1993; JASSIM; HASSAN; CATTY, 1987)

Vários estudos tem demonstrado que as primeiras respostas imunológicas às infecções helmínticas podem, ser pró-inflamatórias ou de natureza mista Th1/Th2 (PEARCE; MACDONALD, 2002). Em modelos animais e em humanos foi observado

que as infecções intestinais por helmintos são geralmente, associadas a uma forte resposta imune Th2, e a uma supressão significativa de respostas do tipo Th1 (RESENDE CO et al., 2007).

Na hanseníase as formas clínicas dependem da resposta imune do hospedeiro, assim, a hanseníase na forma paucibacilar (Tuberculóide) é caracterizada por uma forte resposta mediada por células (Th1) e, portanto, considerada muito menos infecciosa, enquanto a hanseníase multibacilar (MB), particularmente na forma virchowiana (LL), é caracterizada por uma resposta imune mediada por células (Th2) ineficaz e é portanto responsável pela maioria das transmissões (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014, SCOLLARD, D. M. et al., 2011, SCOLLARD, D. M.; JOYCE, M. P.; GILLIS, T. P., 2006, MODLIN, R. L., 2022).

As coinfeções ocorrem quando dois ou mais patógenos geneticamente distintos estão presentes no mesmo hospedeiro, o que pode afetar a carga de cada agente, podendo resultar em manifestações clínicas e resultados alterados em indivíduos co-infectados. Em pacientes com hanseníase, as coinfeções não virais mais comumente relatadas são Tuberculose, Leishmaniose, Cromoblastomicose e Helmintos (FRÓES et al., 2023).

Considerando que o *S. mansoni* parece induzir uma modulação negativa das respostas inflamatórias, a infecção pré-existente por esse helminto pode subverter a resposta imune do hospedeiro em direção a uma resposta do tipo Th2 ou a uma regulação positiva de células T reguladoras, o que pode afetar a capacidade do hospedeiro de montar uma resposta eficaz às micobactérias (RESENDE CO et al., 2007). Assim, isso pode ser um indicativo de que a infecção por helmintos facilitaria a infecção por *M. leprae* e a progressão para as formas clínicas mais infecciosas. Outro fator relevante é a sobreposição espacial e temporal que tem sido observada entre as duas infecções (PHILLIPS et al., 2017, DENNISON et al., 2021).

Um estudo de coorte realizado no Nepal examinou 145 pacientes com hanseníase para rastrear quatro tipos de helmintos. Através de baciloscopia fecal e PCR multiplex, observou-se infecção por: *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*. Os resultados mostraram que 55% dos pacientes com hanseníase apresentavam uma ou mais co-infecções por helmintos transmitidos pelo solo (HAGGE et al., 2017).

Em um estudo transversal retrospectivo, realizado no Brasil DINIZ e cols (2001) demonstraram uma associação entre infecção por helmintos transmitidas pelo solo e uma mudança para o polo lepromatoso do espectro da hanseníase. Ainda, o mesmo grupo realizou levantamento retrospectivo conduzido no Brasil ao longo de uma década que revelou uma forte ligação entre infecções intestinais causadas por helmintos e a forma virchowiana da hanseníase e correlação significativa entre helmintos intestinais e índice baciloscópico ($r = 0,982$, $p < 0,01$). Além disso, foi observado no estudo que pacientes com coinfeções apresentaram níveis diminuídos de IFN- γ , uma citocina Th1, e níveis aumentados de IL-4 e IL-10, citocinas Th2, sugerindo que a coinfeção pode facilitar o desenvolvimento de hanseníase disseminada (DINIZ et al., 2010).

A IL-10 tem papel importante na imunopatologia da esquistossomose, sendo produzida por células T reg, Linfócitos B reg e é capaz de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios, como interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e óxido nítrico (NO) (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). Funções específicas mediadas por esta citocina são a inibição de células T, inibição da diferenciação de células dendríticas (DC), inativação de macrófagos e regulação de citocinas do tipo Th1 e Th2 (OLIVEIRA et al., 2016).

Em um estudo caso-controle, uma prevalência de 7,1% de *Schistosoma mansoni* ou *A. lumbricoides* foi encontrada em pacientes com hanseníase. A análise multivariada indicou que os pacientes com hanseníase tinham maior probabilidade de serem infectados por helmintos do que os contatos domiciliares (DENNISON et al., 2021).

Assim, considerando que a hanseníase apresenta uma interação entre a imunidade celular e humoral e a esquistossomose envolve uma dinâmica entre as respostas Th1 e Th2 e uma regulação de células T, acredita-se que a coinfeção por helmintos, mais precisamente pelo *S. mansoni* pode desempenhar um papel importante no surgimento da hanseníase, visto que pode alterar a resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*.

2.2.2 Métodos para o diagnóstico da esquistossomose

O diagnóstico de esquistossomose envolve a identificação dos ovos do parasita *Schistosoma mansoni* nas fezes, por meio de exames parasitológicos ou em tecidos

através de biópsias retais ou de outros tecidos (FERREIRA, 2016). Nas campanhas de controle da esquistossomose, o método de diagnóstico mais utilizado é o Kato-Katz (KK). Reconhecido como padrão de referência pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o método de Kato-Katz permite identificar e quantificar os ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes (WHO, 1994).

O Kato-Katz é um método simples e de baixo custo, apresenta alta especificidade, porém baixa sensibilidade no diagnóstico do *S. mansoni* em regiões de baixa endemicidade. Esse método é muito eficiente em indivíduos com cargas parasitárias médias a altas, mas apresenta sensibilidade reduzida em indivíduos com baixas cargas parasitárias. Como consequência, a prevalência real num ambiente endêmico pode ser significativamente subestimada (OLIVEIRA et al., 2018).

Considerando que o aumento das intervenções e tratamento em massa com Praziquantel, permitiu uma diminuição significativa na carga parasitária da população, infecções leves podem ser subestimadas e assim esses indivíduos não recebem o devido tratamento medicamentoso podendo continuar a transmitir o parasita ao meio ambiente, colocando a comunidade em risco de infecção (FERREIRA, 2016).

Desse modo, as alternativas ao método parasitológico clássico são aquelas que envolvem o imunodiagnóstico, seja pela detecção de antígenos parasitários (método direto) ou pela detecção de anticorpos dirigidos contra esses antígenos (método indireto). Esses métodos tem sido muito empregados, dado que geralmente são mais sensíveis do que o exame de fezes, particularmente em áreas de baixa transmissão nas quais as intensidades de infecção são leves (SILVEIRA et al., 2016).

O teste imunocromatográfico POC-CCA (Antígeno catódico circulante) detecta o antígeno catódico circulante (CCA) na urina e é uma alternativa complementar para o diagnóstico da esquistossomose, uma vez que os antígenos são marcadores específicos e sensíveis para identificação de infecções por *S. mansoni*. O CCA é um polissacarídeo carregado positivamente pela imunoeletroforese, com pH de 8,2, estável ao calor e baixo peso molecular. Este antígeno foi demonstrado no soro e urina de camundongos infectados e produtos excretados e secretados pelo verme adulto (DE CARVALHO, Roberta Gomes et al., 2024; DEELDER et al, 1976).

A capacidade de resposta deste teste varia de acordo com a intensidade da infecção. Em pacientes com carga parasitária elevada (≥ 400 OPG), a sensibilidade é

de 100%. Porém, se a carga parasitária for baixa, pode diminuir para 70% (DE CARVALHO, Roberta Gomes et al., 2024).

Tem sido demonstrado de maneira consistente, níveis mais elevados de *S. mansoni* pelo teste POC-CCA em comparação àqueles que utilizaram esfregaços de Kato-Katz simples, duplos, quádruplos ou sêxtuplos (COELHO, et al., 2016).

Estudo realizado por Van Lieshout e colaboradores (1992) demonstrou que cerca de 90% dos indivíduos infectados por *S. mansoni* e *S. haematobium* apresentaram CCA no soro e urina. No entanto, observou-se que o CCA, embora presente no soro foi detectado mais facilmente na urina e que sua concentração reduz rapidamente (uma semana) após tratamento quimioterápico.

Um estudo conduzido por Bezerra e colaboradores (2021) avaliou o desempenho do teste de antígeno catódico circulante (POC-CCA) na comunidade de Sergipe, área altamente endêmica no Brasil para esquistossomose, comparando-o à técnica de Kato-Katz. Os pesquisadores observaram que O POC-CCA apresentou bom desempenho diagnóstico em indivíduos com carga parasitária média e alta, mas houve elevado número de falsos negativos em indivíduos com infecções de baixa intensidade.

Um estudo realizado no Kênia com 1.944 crianças foi conduzido para verificar a relação entre os resultados da técnica de Kato-katz e POC-CCA antes e após tratamento para esquistossomose. Foi observada concordância leve/fraca entre os dois métodos, visto que a prevalência da infecção por *S. mansoni* foi de 26,5 e 21,4% durante o pré e pós-tratamento, usando o teste POC-CCA, e 4,9 e 1,5% para pré e pós-tratamento, usando a técnica de Kato-Katz. Os autores observaram que o Kato-katz apresentou menos sensibilidade nos dois momentos (OKOYO et al., 2018).

Além disso, estudos tem demonstrado que outras vantagens ao se utilizar o POC-CCA baseia-se no fato de os resultados serem disponibilizados imediatamente e seu custo ser equivalente ou inferior ao KK (WORRELL et al., 2015).

Embora o CCA tenha sido avaliado em várias regiões do Brasil, ainda não foi implementado universalmente em todas as unidades de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS). Atualmente, seu uso é mais comum em pesquisas e levantamentos epidemiológicos específicos do que como uma ferramenta de diagnóstico padrão em todas as unidades do SUS. Estudos conduzidos em Minas Gerais e outras regiões destacaram a eficácia e o potencial do teste CCA em melhorar o diagnóstico da

esquistossomose em cenários de baixa prevalência, o que pode levar à sua adoção mais ampla no futuro (LINDHOLZ, Catieli Gobetti et al., 2018, DE FREITAS BEZERRA, Danielle et al., 2021, SILVEIRA, Alda Maria Soares et al., 2016).

A busca por um método confiável para o monitoramento e controle da esquistossomose levou à investigação de vários antígenos, entretanto a triagem dos antígenos adequados representa uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de testes de diagnóstico (CAVALCANTI et al., 2013). Diante disso, sabe-se que existem alguns fatores que podem influenciar na seleção de um antígeno apropriado, tais como: simplicidade de obtenção e produtividade, alta estabilidade em condições simples de estocagem e elevada antigenicidade e imunogenicidade (RABELLO et al., 2008).

Além do POC-CCA o antígeno solúvel de ovo (SEA) e o antígeno solúvel de vermes adultos (SWAP) tem sido também empregados no diagnóstico de esquistossomose. Os antígenos podem ser obtidos de diversos estágios evolutivos do parasito. Enquanto o SWAP é a fonte mais fácil e abundante do material antigênico, o SEA contém grande número de frações antigênicas (CARVALHO, et al., 2016).

O SEA é derivado dos ovos do parasita e contém proteínas e glicoproteínas liberadas durante a infecção, sendo utilizado principalmente em testes sorológicos para identificar a resposta imune do hospedeiro contra o parasita. Já o SWAP é extraído dos vermes adultos e contém uma mistura de proteínas solúveis que também são utilizadas em exames diagnósticos para detectar anticorpos específicos contra o *Schistosoma* no sangue do paciente. Esses antígenos são frequentemente empregados no teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), uma técnica que permite a detecção e quantificação precisa de anticorpos no soro dos pacientes. O ELISA baseia-se na ligação dos antígenos (SEA ou SWAP) a uma superfície sólida, seguida da exposição ao soro do paciente (JI et al., 2020).

Negrão-Corrêa e colaboradores destacam em seu estudo que o IgG anti-SWAP está positivamente associado à esquistossomose grave, independentemente da carga parasitária, enquanto a elevada produção de IgE específica do parasita está associada à manifestação clínica leve da doença na população humana. Ainda, os autores destacam em seu estudo que os perfis de anticorpos são bons correlatos da gravidade da esquistossomose e podem ser testados como biomarcadores da gravidade da doença.

O uso simultâneo de múltiplos métodos de diagnóstico de esquistossomose têm sido aplicado para monitorar a população humana, visando identificar o pequeno número de pessoas infectadas uma vez alcançado o controle da morbidade, buscando assim a maior sensibilidade e diagnóstico precoce da infecção (GRENFELL et al. 2013).

2.3 Vitamina A, D e Ferritina na hanseníase

Existem poucos estudos que avaliam o estado nutricional de pessoas acometidas por hanseníase e o papel exato da má nutrição na susceptibilidade da doença ainda permanece desconhecido (FARIAS et al., 2022). Apesar disso, sabe-se que a escassez de alimentos, a insegurança alimentar e a menor diversidade alimentar são aspectos comumente encontrados naqueles que lutam contra a hanseníase (OKTARIA et al., 2018a).

Um estado nutricional adequado é crucial para o desenvolvimento, manutenção e expressão da resposta imunológica. Os micronutrientes influenciam e dão suporte a cada estágio dessa resposta, sendo que a má nutrição aumenta a suscetibilidade e a gravidade de infecções (MAGGINI; PIERRE; CALDER, 2018).

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que indivíduos co-infectados com *M. leprae* e *S. mansoni* apresentaram deficiência de vitamina D, além disso, alguns estudos relacionam deficiências de micronutrientes, particularmente aqueles com potencial antioxidante, como retinol (Vitamina A), ácido ascórbico, 25-hidroxivitamina D, zinco, magnésio e selênio as diferentes formas clínicas da hanseníase (VÁZQUEZ et al., 2014)

2.3.1 Vitamina D

O papel extra esquelético da vitamina D tornou-se conhecido depois que o receptor dessa vitamina foi encontrado em quase todas as células e tecidos do corpo. Nesse sentido, tem sido destacado o impacto da hipovitaminose D na hanseníase, dado que essa condição tem demonstrado estar relacionada ao aumento da suscetibilidade a doença por comprometer a imunidade inata (GROSSI DE OLIVEIRA et al., 2020; JEON; SHIN, 2018; KEWCHAROENWONG et al., 2023).

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel tradicionalmente conhecida como pró-hormônio (secosteroide), que juntamente com o hormônio da paratireóide (PTH), atua como um importante regulador da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo (DOS SANTOS et al., 2020; JEON; SHIN, 2018).

Existem duas principais isoformas da vitamina D, a vitamina D2 (ergocalciferol) e a vitamina D3 (colecalfiferol). A vitamina D2 é produzida a partir do ergosterol por meio da exposição à radiação ultravioleta tipo B (UVB) em plantas, leveduras e fungos, e pode ser obtida através de uma dieta que inclui alimentos como cogumelos. Já a vitamina D3 é sintetizada a partir do 7-deidrocolesterol quando a pele é exposta à radiação UVB, e também pode ser adquirida através de alimentos de origem animal, como o óleo de fígado de bacalhau (JEON; SHIN, 2018). Apesar de ser possível obter a vitamina D de fontes alimentares, a síntese endógena desencadeada pela radiação UVB é a principal fonte (DOS SANTOS et al., 2020).

A vitamina D, seja ela na forma D2 ou D3, é lipossolúvel, por isso se liga à proteína de ligação à vitamina D (VDBP) na corrente sanguínea para ser inicialmente transportada para o fígado. No fígado, ocorre a metabolização dessa vitamina por pelo menos cinco enzimas (CYP2DII, CYP2D25, CYP3A4, CYP2R1 e CYP27A1) que a converte em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), também conhecida como calcidiol, sendo essa a principal forma circulante de vitamina D, também utilizada para a dosagem sérica (DOS SANTOS et al., 2020; JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2014; MARTENS et al., 2020).

A 25(OH)D passa por um processo de 1 α -hidroxilação adicional, realizado pela 25(OH)D1 α -hidroxilase (CYP27B1), enzima expressa por muitos tipos de células (pele, células do sistema imunológico, células ósseas, placenta), mas que está presente em maior concentração nas células do túbulo proximal do rim (MARTENS et al., 2020). Esse processo adicional resulta na formação da 1 α ,25-dihidroxivitamina D (1 α ,25(OH)2D), conhecida como calcitriol. Essa é a forma biologicamente mais ativa da vitamina D. Após ser sintetizado o calcitriol, entra na corrente sanguínea, e liga-se ao receptor de vitamina D (VDR) nos tecidos alvo, que é então ativado e regula a transcrição de diferentes classes de genes, inclusive aqueles envolvidos na reação imunológica (JEON; SHIN, 2018; JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2014; POP et al., 2022).

Sabe-se que a forma ativa da vitamina D, não apenas regula o metabolismo do cálcio e dos ossos, mas também desempenha um papel imunomodulador mediado pela ligação de seu receptor (VDR) em monócitos, macrófagos e linfócitos ativados (MANDAL et al., 2015). Descobriu-se que a maioria das células do sistema imune apresentam a expressão de VDR, sendo demonstrado também que células dendríticas, monócitos / macrófagos e células T e B expressam vitamina D e 25(OH)D1 α -hidroxilase (CYP27B1), a enzima ativadora da vitamina D (HART; GORMAN; FINLAY-JONES, 2011, PROVVEDINI, Diego M. et al., 1983).

A deficiência de vitamina D tem sido associada ao alto risco de desenvolvimento de doenças micobacterianas, como tuberculose e hanseníase (ZENG et al., 2015).

Grossi de Oliveira e colaboradores (2020) ao avaliarem os níveis séricos de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina em pacientes com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia (PQT) observaram hipovitaminose D em todos os grupos estudados, principalmente nos pacientes não tratados. Outros estudos também sugerem que a hanseníase está associada a níveis séricos de catelicidina acentuadamente diminuídos, especialmente quando diagnosticada recentemente e não tratada (MATZNER et al., 2011)

O peptídeo antimicrobiano, catelecidina, possui atividade anti-tuberculose e tem sido associado a outras doenças micobacterianas, como a hanseníase. Sabe-se que em monócitos e macrófagos, o IFN- γ pode induzir a enzima CYP27B1A converter a vitamina D em sua forma ativa. Essa por sua vez, se ligará ao seu receptor VDR promovendo assim a elevação de mRNAs de peptídeos microbianos, como a catelecidina(LIN; WHITE, 2004).

Fabri e cols, (2011) demonstraram em seu estudo que por meio da liberação de IFN- γ as células T induzem autofagia, maturação fagossômica, produção de peptídeos antimicrobianos, como a catelecidina e atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos humanos através de uma via dependente de vitamina D. Esses autores demonstraram que o IFN- γ induziu a via antimicrobiana em macrófagos humanos cultivados em soros suficiente em vitamina D, mas não deficiente na vitamina. A suplementação *in vitro* dos soros deficientes restaurou a expressão do peptídeo antimicrobiano, autofagia, fusão fagossomo-lisossomo e atividade antimicrobiana. Tais achados sugerem que a vitamina D é necessária para que a imunidade adquirida supere a capacidade dos patógenos intracelulares de

escapar das respostas antimicrobianas mediadas por macrófagos (FABRI et al., 2011).

Mandal e colaboradores (2015) ao estudarem o papel da vitamina D, na progressão da hanseníase, observaram que a maioria dos indivíduos com hanseníase de Calcutá e Índia, com reações hansênicas complexas apresentaram baixos níveis de vitamina D em amostras de soro.

Kim e colaboradores (2018) investigaram se o status de vitamina D durante a diferenciação do macrófago poderia influenciar em sua função e observaram que o macrófago induzido por IL-15 diferenciado na presença de vitamina D exibiu uma expressão robusta de catelecidina, em comparação aquele macrófago que foi diferenciado na ausência de vitamina D, demonstraram ainda que níveis adequados de vitamina D antes da infecção microbiana, poderia contribuir para a redução da viabilidade do patógeno em macrófagos (KIM et al., 2018).

2.3.2 Vitamina A

A vitamina A (VA) é uma vitamina lipossolúvel obtida principalmente da dieta, sendo crítica para muitos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, a produção e função hormonal, a manutenção e modulação da imunidade e a homeostase do epitélio e da mucosa (AMIMO et al., 2022).

O corpo humano não consegue produzir vitamina A por conta própria, por isso é preciso adquiri-la através da alimentação. Essa vitamina pode ser fornecida na dieta em sua forma pré-formada (retinol/ éster de retinil) advinda de produtos de origem animal ou como pró-vitamina A (carotenóides) derivada de vegetais (D'AMBROSIO; CLUGSTON; BLANER, 2011; HARRISON, 2012). Existem mais de 50 tipos de carotenóides que podem ser convertidos em vitamina A, mas apenas o β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina são encontrados em quantidades relevantes na dieta humana (KELLY et al., 2018a)

Os carotenóides são pigmentos orgânicos de cor amarela a laranja encontrados em diversas frutas e vegetais. Além de sua relação com a vitamina A, são conhecidos por suas atividades antioxidantes. O β -caroteno é o mais abundante na dieta. É ingerido principalmente através de vegetais vermelhos e laranja e parcialmente através de frutas da mesma cor e vegetais verdes. Em sua versão pré-formada a vitamina A pode ser encontrada em alimentos de origem animal. Leite e produtos

lácteos, bem como carne e seus produtos, são os maiores contribuintes, seguidos por ovos e peixes (CARAZO et al., 2021; HARRISON, 2012; KELLY et al., 2018a).

Como a maior parte da vitamina A de origem animal assume a forma de ésteres de retinil, esses ésteres chegam ao intestino. Antes de entrar nos enterócitos, eles são metabolizados em retinol por uma lipase triglicéridica ou fosfolipase B no lúmen do trato gastrointestinal (KELLY et al., 2018b; SCHWEIGERT et al., 1990)

Uma vez no intestino o retinol livre é absorvido pelos enterócitos, onde é complexado com a proteína celular de ligação ao retinol (CRBP-II) responsável por seu transporte intracelular depois é reesterificado pela lecitina: retinol aciltransferase (LRAT). É então incorporado aos quilomícrons e exportado para a linfa junto com outros componentes da gordura dietética. Na circulação humana, o vitamana A está associado quase exclusivamente à proteína de ligação ao retinol (RBP) e é fortemente regulado. No entanto, em muitas outras espécies, particularmente carnívoros, uma proporção significativa de vitamina A circulante está na forma de ésteres de retinil. O retinol circulante é absorvido no citosol por meio do receptor denominado estimulador de ácido retinóico 6 (STRA6). Nas células o retinol será metabolizado pelas enzimas álcool desidrogenase e retinaldeido desidrogenase em ácido retinóico. Após a metabolização o ácido retinóico poderá ligar-se as proteínas de ligação do ácido retinóico celular ou proteína de ligação à ácidos graxos, ambas encontradas no citosol. Em seguida o ácido retinóico será translocado ao núcleo para ligar-se ao seu receptor nuclear, onde atuará como um regulador da transcrição gênica (GREEN; FASCETTI, 2016; SCHWEIGERT et al., 1990).

A deficiência de vitamina A resulta em xeroftalmia, metaplasia, anorexia e função comprometida da imunidade inata e adaptativa, além disso, tem sido associada a funções prejudicadas de macrófagos, neutrófilos e células natural killer (NK) e à diminuição da função protetora nas superfícies mucosas (TIMONEDA et al., 2018). Os mecanismos pelos quais ocorre a deficiência de vitamina A foram investigados e a principal causa da deficiência é consumir uma dieta pobre em Vitamina A (AMIMO et al., 2022).

Estudos tem demonstrado que a deficiência de vitamina A está correlacionado a diminuição das respostas do tipo Th2, visto que essa vitamina pode promover a diferenciação de células Th2 ao induzir a expressão do gene IL4 (IWATA; ESHIMA; KAGECHIKA, 2003; LOVETT-RACKE; RACKE, 2002; NIKAWA et al., 1999).

Corroborando com isso, Dawson e colaboradores (2008) sugeriram que a estimulação do receptor RAR α e a presença de IL-4 resultam de um fenótipo Th2(DAWSON et al., 2008).(2003)

A maioria dos efeitos da vitamina A é exercida pelo seu metabólito, o ácido retinóico, que através da ligação de receptores nucleares controla a expressão transcricional de seus genes alvos. O ácido retinóico (AR) é produzido por vários tipos de células, incluindo macrófagos e células dendríticas, que expressam desidrogenases retinais que convertem a vitamina A em seu principal metabólito biologicamente ativo (RAO, K. N.; SAHA, KUNAL., 1988).

A gravidade da hanseníase foi positivamente associada a deficiência de vitamina A (SHER et al., 1981). Rao e colaboradores (1988) encontraram níveis diminuídos de vitamina A, vitamina E e zinco em pacientes com hanseníase virchowiana em comparação com controles saudáveis.

Um estudo na Indonésia mostrou que crianças deficientes em vitamina A produzem menos IFN- γ e tornam-se suscetíveis a doenças micobacterianas, já que células Th1 produtoras de IFN- γ fornecem proteção contra patógenos intracelulares(WINTERGERST; MAGGINI; HORNIG, 2007). A deficiência de vitamina A prejudica a imunidade e a resposta imune adaptativa à infecção, resultando em uma capacidade prejudicada de neutralizar patógenos extracelulares (DWIVEDI et al., 2019).

2.3.3 Ferritina e Ferro

Sendo a principal causa de anemia em todo o mundo a deficiência de ferro é a deficiência de micronutrientes mais comum e chega a afetar quase um terço da população (ELSTROTT et al., 2020; WEST; OATES, 2008). O ferro pode ser ingerido nas formas heme (derivado de carne) e não heme (derivado de vegetais), sendo que a forma heme é mais facilmente absorvida pelo organismo. Sua absorção ocorre no duodeno e é regulada pelo transportador de metal divalente (DMT1) nos enterócitos. O ferro entra na circulação através da ferroportina e liga-se à transferrina para ser transportado para a medula óssea e fígado para produção e armazenamento de glóbulos vermelhos (RBC)(ELSTROTT et al., 2020).

Os organismos dos animais adultos contêm entre 2,5 e 4,0 g de ferro, sendo cerca de 60-70% circulante como componente da hemoglobina, 10% como mioglobina, 20%

armazenado na forma de ferritina e hemossiderina e 1% em enzimas (ROSA et al., 2009)

Como não existem mecanismos para a excreção de ferro pelo organismo, a não ser através da perda de sangue ou da renovação celular, os níveis totais de ferro no corpo são estritamente regulados. O excesso de ferro e os estados inflamatórios estimulam a produção de hepcidina pelo fígado, que bloqueia a absorção de ferro na circulação através da degradação da ferroportina e inibe a liberação de ferro armazenado. Este processo do metabolismo do ferro desempenha um papel importante no desenvolvimento, diagnóstico e tratamento da anemia por deficiência de ferro (ELSTROTT et al., 2020).

O ferro intracelular armazenado está ligado à na ferritina (HASCHKA; HOFFMANN; WEISS, 2021). Muitos testes são propostos atualmente para o diagnóstico da deficiência de ferro, mas a ferritina sérica é atualmente o mais eficiente e custo-efetivo (DELOUGHERY, 2017).

Em 2018 Oktaria e colaboradores, avaliaram 100 casos e 200 controles, visando verificar possíveis associações da deficiência de micronutrientes, fatores demográficos e socioeconômicos com a hanseníase. Observaram que dentre os micronutrientes avaliados, os níveis séricos de ferro eram mais baixos nos pacientes do que nos controles, enquanto encontraram níveis mais altos de ferritina nos pacientes em relação aos controles.

A ferritina é uma grande proteína citosólica (intracelular) de aproximadamente 10-12 nm de diâmetro, composta por subunidades H e L codificadas pelos genes FTL e FTH, respectivamente. Estas subunidades ligam-se entre si para formar uma esfera oca de 24 unidades, denominada "invólucro de apoferritina", cuja função é armazenar ferro. Cada invólucro de apoferritina pode armazenar até 4.500 átomos de ferro (ROSÁRIO et al., 2013).

Cerca de dois terços do ferro armazenado no corpo humano estão sob a forma de ferritina. Embora a maior parte da ferritina seja intracelular, uma pequena quantidade pode ser encontrada no soro, correlacionando-se as reservas totais de ferro (COAD; PEDLEY, 2014)

Inicialmente a ferritina era considerada apenas um marcador substitutivo para o estado de armazenamento de ferro no corpo humano, sendo diretamente relacionada aos níveis de ferro. Níveis baixos de ferritina indicavam uma redução nos estoques de

ferro corporal, enquanto níveis elevados sugeriam níveis normais ou aumentados de ferro (MAHROUM et al., 2022). Entretanto estudos tem demonstrado que, por se tratar de uma proteína de fase aguda, a síntese de ferritina está aumentada em condições inflamatórias, infecciosas e malignidade (GROTTO, 2010; ORINO; WATANABE, 2008).

A ferritina inespecificamente elevada nestes estados reflete o aumento do armazenamento total de ferro no corpo, mas paradoxalmente, estas reservas são sequestradas e não estão disponíveis para a hematopoiese, um processo que contribui para a anemia de inflamação amplamente reconhecida (WANG et al., 2010).

Desse modo, diagnosticar anemia por deficiência de ferro (IDA) em áreas específicas onde doenças infecciosas são prevalentes pode ser muito desafiador, pois os níveis de ferritina sérica podem aumentar devido a respostas imunológicas ao agente infeccioso, mascarando um diagnóstico de deficiência de ferro pura (OKTARIA et al., 2018a)

Tem sido descrito na literatura que níveis intracelulares de Fe podem contribuir para a capacidade defeituosa de macrófagos infectados por *M. leprae* de responder a sinais de ativação, como a sinalização de IFN- γ . Em comparação com lesões tuberculóides, macrófagos infectados por *M. leprae* em lesões lepromatosas apresentam depósitos abundantes de Fe na forma de ferritina, sugerindo que este nutriente essencial está totalmente disponível para o crescimento intracelular bacteriano (DE MACEDO et al., 2020)

Os macrófagos exibem uma plasticidade notável, polarizando-se em dois extremos: M1 e M2. Os M1, induzidos por lipopolissacarídeos e IFN- γ , são pró-inflamatórios, com altos níveis de citocinas inflamatórias, atividade microbicida e sequestro de ferro, expressando altos níveis de ferritina e baixos de ferroportina, o que favorece a retenção de ferro e propriedades bacteriostáticas, além de participar de respostas Th1 e resistência a patógenos, podendo causar danos teciduais e anemia crônica. Já os M2, induzidos por citocinas como IL-4, são anti-inflamatórios e promovem reparo tecidual, com alta atividade fagocítica, baixos níveis de ferritina e altos de ferroportina, facilitando a liberação de ferro, essencial para reparo tecidual (GAETANO; MASSIMO; ALBERTO, 2010).

Ainda, evidências apoiam o papel da ferritina na modulação da resposta imunitária, através da sua indução de citocinas anti-inflamatórias e da limitação dos danos dos

radicais livres (KERNAN; CARCILLO, 2017). Foi comprovado que a inflamação e o estresse oxidativo regulam positivamente a síntese de ferritina em múltiplas células, incluindo macrófagos (SHARIF et al., 2018). Outros autores sugerem que a ferritina H pode suprimir as respostas imunes por sua capacidade de induzir a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 nos linfócitos (GRAY et al., 2001; ROSÁRIO et al., 2013; WANG et al., 2010).

Assim, na hanseníase, avaliar a presença de altos níveis de ferritina e baixos níveis de ferro pode refletir a ativação de macrófagos M1 em resposta à infecção, contribuindo para a resposta imunológica do hospedeiro contra o patógeno. Essa dinâmica pode ser um marcador da atividade da doença e da intensidade da resposta inflamatória, embora outros fatores também possam influenciar esses marcadores bioquímicos. Os estudos que relacionam o papel do ferro/ferritina na progressão da hanseníase ainda são escassos na literatura.

2.4 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o município de Governador Valadares e entorno apresentam alta prevalência para hanseníase e esquistossomose (DENNISON et al., 2021). Baixos níveis socioeconômicos se associam à infecção que leva a hanseníase, mas a forma como ocorre a transmissão não é completamente compreendida. Outras infecções que se associam a esses fatores, são aquelas causadas por helmintos, especialmente a esquistossomose (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A morbidade durante a esquistossomose está relacionada ao equilíbrio entre as respostas imunes Th1-Th2 e isso tem levantado questões intrigantes sobre como a coinfeção pode influenciar o desfecho das alterações patológicas associadas à infecção por esquistossomose. Dado o impacto dos efeitos contra-reguladores exercidos pelas células Th1 e Th2 no desenvolvimento mútuo em casos de coinfeções, surge um interesse crescente em investigar se a presença de uma infecção por esquistossomos influencia a resposta imunológica e a suscetibilidade a patógenos diversos.

Tem sido demonstrado que coinfeções helmínticas estão associadas à a hanseníase, com a hipótese de que a ativação imunológica crônica da resposta Th2 pelos helmintos torna o indivíduo mais propenso a ter hanseníase na forma multibacilar (MB) que é a forma a qual o indivíduo é fonte de infecções para outros

suscetíveis. Portanto, estudar a sobreposição espacial de infecções helmínticas e hanseníase, associada a expansão das estratégias de controle da transmissão dessas doenças por meio de um diagnóstico precoce, são medidas essenciais e urgentes.

Sabe-se que infecções por helmintos e deficiências nutricionais podem coexistir com a hanseníase. Os micronutrientes influenciam cada estágio da resposta imunológica, sendo essenciais no combate a patógenos intracelulares. Além disso, tem sido observado que a má nutrição aumenta a suscetibilidade e a gravidade de infecções por contribuir para a supressão da resposta imunológica (MAGGINI; PIERRE; CALDER, 2018).

Assim, compreendendo a necessidade de se identificar biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico, nesse estudo serão avaliados níveis de anticorpos anti LID-1 para caracterizar os diferentes grupos em relação a especificidade aos antígenos do *M. leprae* e níveis de anticorpos anti antígenos de *S. mansoni*, tais como: SEA (Soluble egg antigen - Antígeno solúvel de ovo), SWAP (Soluble adult worm antigen preparation – Antígeno solúvel de verme adulto) e CCA (Antígeno Catódico Circulante). Nesse contexto, o estudo propõe avaliar os níveis de vitaminas A e D e de ferritina em soros/plasma dos participantes do estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar biomarcadores relacionados ao desenvolvimento de hanseníase em associação com a coinfeção pelo *S. mansoni*

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Realizar a dosagem de anticorpos contra a proteína recombinante LID-1, indicativo da contaminação pelo *M. leprae*, no soro dos voluntários, e agrupá-los em dois grupos LID+ e LID-.
- 2- Identificar a infecção por *S. mansoni* através da dosagem de anticorpos contra antígenos solúveis de ovo (SEA), antígenos solúveis para verme adulto (SWAP) no soro e do antígeno CCA na urina dos voluntários.
- 3- Acompanhar os indivíduos que apresentaram positividade para LID+ para a confirmação do diagnóstico clínico de hanseníase

- 4- Associar os níveis de Vitamina A, D e ferritina no soro dos indivíduos, como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico precoce da hanseníase, em indivíduos co-infectados ou não com o *S. Mansoni*.

4 METODOLOGIA

4.1 População e desenho de estudo

A população desse estudo é composta por indivíduos residentes nos municípios de Governador Valadares, Teófilo Otoni, Inhapim, Mantena e no distrito de Limeira de Mantena, Minas Gerais. Estas regiões foram descritas como endêmicas para hanseníase e infecções parasitárias, além de apresentar uma população de baixa renda, portanto regiões provavelmente endêmicas para deficiências de micronutrientes e desnutrição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Os participantes foram selecionados através de uma estratégia de amostragem aleatória, constando de 1200 indivíduos residentes em áreas hiperendêmicas (incidência > 40 casos / 100.000 anualmente) e em municípios de alta endemia (incidência 20-39,9 casos / 100.000 anualmente) no leste de Minas Gerais. Dessa forma, foram identificados indivíduos que apresentaram anticorpos sorológicos anti LID e foram denominados LID (+) e aqueles que não apresentaram anticorpos anti LID foram denominados LID (-).

Dentre os 1200 participantes, 81 apresentaram resultado positivo para o teste LID (LID (+)) e foram selecionados para o presente estudo. Após a seleção, os indivíduos foram acompanhados pelo grupo de pesquisa semestralmente, sendo realizados exames dermatoneurológicos. Aqueles que apresentaram manchas ou lesões sugestivas para hanseníase foram encaminhados ao Centro de Referência de Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES) para diagnóstico clínico por um especialista. Os indivíduos com diagnóstico confirmado de hanseníase foram classificados como “doentes” (D) nesta pesquisa.

Indivíduos com indicativo de infecção por esquistossomose foram aqueles que apresentaram reatividade em pelo menos um dos ensaios (SEA, SWAP ou CCA).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionadas pessoas de ambos os sexos que viviam em áreas com alta prevalência de hanseníase no município de Governador Valadares e arredores. Para garantir uma amostra diversificada, optou-se por escolher no máximo dois participantes por família. Desse modo o convite para participar do estudo foi feito por meio da Estratégia de Saúde da Família (ESF) nas comunidades avaliadas. As atividades seguiram as seguintes etapas:

Primeiro momento:

Inicialmente, foi realizado o convite aos participantes, seguido do agendamento para comparecimento. Os atendimentos ocorreram nas Estratégias de Saúde da Família (ESF) nos locais de residência dos participantes, onde inicialmente houve a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a aplicação de um questionário sociodemográfico. Em seguida, foi realizado um exame dermatoneurológico e, por fim, a coleta de sangue subcutâneo para o ensaio de multiplex.

Segundo momento:

Após a realização do ensaio Multiplex e identificação de anticorpos contra a proteína recombinante do *M. leprae* os indivíduos foram divididos em dois grupos: aqueles considerados LID (+) e os LID (-). Para a realização desse estudo, selecionou-se o grupo de indivíduos LID+ que era composto por 81 indivíduos. Foram excluídos desse estudo os indivíduos que não apresentaram positividade para LID-1.

As atividades subsequentes incluíram:

I – Coleta de sangue venoso para a quantificação de vitamina A, D e ferritina bem como identificação de biomarcadores imunológicos.

II- Coleta de Urina para o ensaio de CCA

4.3 Considerações éticas

A coleta de dados dessa pesquisa foi incorporada ao estudo caso-controle em andamento (CAAE: 56863016.6.1001.5147.) na UFJF/GV em parceria com o CREDEN-PES (Centro de Referência em doenças endêmicas e Programas Especiais), Governador Valadares.

Para coleta de dados, os voluntários receberam explicação sobre os objetivos e caracterização de todo o estudo, sendo enfatizado que esse tinha finalidade de

pesquisa, sem envolvimento financeiro ou terapêutico. O voluntário foi orientado e esclarecido de que poderia a qualquer momento e sem justificativas prévias, se retirar da pesquisa, não sendo obrigado a permanecer até o fim e isso não o causaria nenhum tipo de prejuízo. A solicitação da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido ficou sob responsabilidade da equipe de pesquisadores.

Os dados coletados e todas as informações obtidas de cada participante, bem como, testes laboratoriais, estarão sob posse dos investigadores, os quais são obrigados a mantê-los sob sigilo. Foram fornecidos aos participantes, cópias dos testes laboratoriais. Orientações sobre a relevância dos achados dessa pesquisa foram também fornecidas aos participantes.

4.4 Ensaio Multiplex bead Assay (MBA) para análise da reatividade de anticorpos ao antígeno Leprosy IDRI diagnostic 1 (LID-1)

Esse ensaio foi realizado para todos os participantes desse estudo, com o objetivo de avaliar os níveis de anticorpos anti-LID-1 (*ML*) no soro dos indivíduos. Assim, coletou-se amostra de sangue por meio de punção digital, sendo essa adicionada em papel de filtro especial (*whatman*). Após secagem do sangue este material foi adequadamente acondicionado para envio ao Centro de Controle de Doenças (CDC) nos EUA cujo estudo está vinculado à Emory University sob a responsabilidade da Dra Jessica Fairley, colaboradora deste Projeto (NIH/CNPq/Processo (CAAE: 56863016.6.1001.5147).

No laboratório do CDC o sangue foi apropriadamente removido do papel de filtro e após centrifugação o soro foi utilizado para realização do ensaio Multiplex. Este ensaio foi realizado no laboratório de Imunologia de parasitas coordenado pelo Dr. Evan Secor no Centro de Controle de Doença (CDC) em Atlanta nos Estados Unidos.

O ensaio Multiplex foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido (Multiplex Bead Assay) utilizando o equipamento MAGPIX BioPLEX Manager MP. Esferas de poliacrilamida foram acopladas ao antígeno LID-1, uma proteína recombinante do *M. leprae*, produzida pelo Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington juntamente com outros 3 antígenos, já incorporados na plataforma Multiplex. Reatividade total de IgG para LID-1 foi avaliada através de análises na respectiva plataforma.

Este ensaio foi realizado conforme descrito em Luminex Corporation (2012). Inicialmente, foi realizada a diluição de 2µL dos soros em 800µL do tampão B (PBS contendo PVA a 0,5%; PVP a 0,8%; Tween-20 a 0,03%; Caseína a 0,5% e NaN₃ a 0,02%), em uma microplaca de 96 poços de poliestireno (*Thermo Scientific*, Rockford, IL, EUA). Após a adição desses dois componentes, a placa foi selada com selante próprio, revestida com papel alumínio e incubada durante a noite a temperatura de 4°C -10°C.

No dia seguinte, foram adicionados 50µL de esferas magnéticas (50 esferas/mL) juntamente com 50µL de soro dos participantes do estudo diluídos em tampão PBS (1:400) e transferidos para os poços da placa. Após 1h 30 min de incubação em um agitador mecânico (700RPM), a placa foi cuidadosamente lavada 3 vezes com tampão PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBST).

Em seguida, foram diluídos os anticorpos secundários/anti-IgG e anti-IgM (biotinilados) na seguinte proporção: 50ng/poço de IgG; 40ng/poço de IgG4 em Tampão A (PBS contendo BSA a 0,5%; Tween-20 a 0,05% e NaN₃ a 0,02%). Após a diluição, foram adicionados em cada poço da placa, 50µL dos anticorpos anti-IgG e anti-IgM por 45 minutos, temperatura ambiente, no agitador com velocidade de 700 RPM. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente por 3 vezes com PBST. Para completar a reação, 50µL de estreptavidina conjugada à ficoeritrina (SA-PE) foram adicionados e a placa incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação (700RPM).

Em seguida, a placa foi lavada novamente, três vezes com PBST e adicionado 50µL de tampão A em cada poço, e incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, no agitador com velocidade de 700RPM e posteriormente lavada mais uma vez com PBST. Foram adicionados 100µL de tampão PBS em cada poço, e a placa foi agitada por aproximadamente 10 segundos e depois analisada usando o software Bio-Plex, leitor MAGPIX-Luminex de acordo com o protocolo do fabricante. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente, com pouca luminosidade e todas as amostras foram testadas em triplicata. Os resultados foram expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MFI). E os valores de corte (*cut-off*), foram utilizados para determinação de amostras positivas e negativas.

4.5 Coleta de sangue para ensaios imunológicos

Após o resultado do teste sorológico para ensaio de *Multiplex Bead Assay* (MBA) para anti-LID1, foi realizada a coleta de amostras de sangue venoso dos participantes do estudo. Sendo esta conduzida por profissionais qualificados da área da saúde, respeitando as normas de biossegurança, uso de luvas, materiais estéreis e descartáveis, oferecendo assim, risco mínimo para os pacientes. Todas as coletas foram realizadas no CREDEN-PES e nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) dos municípios de Governador Valadares e entornos.

Foram coletados cerca de 30ml de sangue em tubos estéreis a vácuo e descartáveis com heparina, com EDTA e com ativador de coágulo estéreis a vácuo e descartáveis (VACUTAINER, Grand Island, NY, USA).

4.6 Ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos anti-SEA (antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni*) e anti-SWAP (antígeno solúvel de verme adulto de *S. mansoni*)

O diagnóstico de infecções por *S. mansoni* foi realizado por meio dos ensaios de ELISA que avaliaram os níveis de IgG4 específica para o antígeno de ovo (Antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni* - SEA) e verme adulto (Antígeno solúvel de verme adulto de *S. mansoni* - SWAP) no soro dos participantes. Esse ensaio foi conduzido em parceria com o Instituto René Rachou, unidade da Fiocruz em Minas Gerais (Fiocruz Minas)/BH.

Inicialmente placas de 96 poços (Nunc-Maxisorb Nalgel Nunc International, Rochester, Nova Iorque, EUA) foram sensibilizadas durante a noite em geladeira (4°C) com 100µL da solução antigênica (SEA ou SWAP) em concentração 5µL/ml diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6), sendo posteriormente bloqueada com PBST (0,05%, pH 7,2-7,4) e levadas em estufa a 37°C por 1 hora. As amostras de soros dos pacientes foram diluídas 1:100 sendo testadas em duplicata (2µL de soro + 198µL de PBST₂₀). O anticorpo ligado aos antígenos foi detectado pelo anticorpo secundário anti IgG4 humano marcado pela enzima peroxidase em concentração de 1:40.000 (Diluída em PBST₂₀-BSA). Para revelar a reação, foram pipetados 100µL da substância reveladora ao abrigo da luz (Tetrametil Bensidina - TMB) e após 20 minutos parou-se a reação com 50µL de ácido sulfúrico (2N). A leitura foi efetuada em leitor de ELISA na faixa de luz de 450nm. O limiar de reatividade (*cut off*) foi determinado

pela média de absorvância mais 3 desvios padrão obtidos de amostras de soro de controles negativos.

4.7 Teste para a detecção presuntiva de esquistossomose - Urine CCA (Schisto)

Para a determinação da infecção de esquistossomose ativa, utilizou-se o teste Urine CCA (Schisto) ECO Teste - TR.0301C da empresa ECO – Diagnostica, sendo esse realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Esse ensaio é destinado para a triagem no auxílio do diagnóstico da esquistossomose ativa, mais especificamente causada por *S. mansoni* e tem como princípio a detecção do antígeno CCA que poderá estar presente nas amostras de urina, dado que a maior parte da CCA liberado pelo parasita adulto passa por ela.

Um resultado positivo numa amostra aleatória de urina (que deve ser coletada pela técnica do jato médio) indica uma infecção ativa de esquistossomose.

Para a realização do teste solicitamos aos pacientes que coletassem a primeira urina do dia em frasco próprio para coleta de urina e estéril. Reforçamos a importância de se descartar o primeiro jato de urina e coletar o restante. Até o momento da realização dos testes a urina era mantida refrigerada ou acondicionada em gelo. O procedimento consistia em homogeneizar a urina, e adicionar 100 µL dela na cavidade do Cassete fornecido no KIT. A leitura do teste era realizada em 20 minutos.

Após a aplicação da urina, o antígeno CCA, que poderá estar presente na urina, se combina com os anticorpos monoclonais imobilizados na tira teste. A solução corre sobre a tira e os complexos antígeno/anticorpo combinam com outro anticorpo imobilizado na linha teste. O resultado é considerado positivo quando na linha teste se desenvolve uma cor rosa. Uma segunda linha rosa deve aparecer sempre, como garantia de funcionalidade correta do teste. Se a linha do controle permanecer azul o teste deve ser considerado inválido.

4.8 Determinação quantitativa de vitamina A, D (25-OH vitamina D) e Ferritina

Para a avaliação dos níveis de Vitamina D e ferritina amostras de soro/plasma de cada participante foram utilizadas. Essas foram processadas e analisadas por um laboratório de análises clínicas de Governador Valadares, por meio de um contrato de prestação de serviço de exames laboratoriais.

A principal forma de armazenamento de vitamina D é a 25-hidroxitamina D (25(OH)D), que possui meia-vida de 2 a 3 semanas e está presente no sangue em uma concentração até 1.000 vezes maior que a 1 α ,25-dihidroxitamina D que também possui menor meia-vida (4 horas).

Os níveis de vitamina A (retinol) no soro refletem a quantidade de vitamina A e caroteno ingeridos e absorvidos. E a ferritina oferece uma medida mais sensível, específica e confiável para determinar a deficiência de ferro em estágio precoce.

4.9 Análise estatística dos dados

O banco de dados foi organizado em uma planilha de Excel. Após a coleta os dados foram exportados e analisados com auxílio dos softwares R[®] e Prisma. Considerou-se as diferenças estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

Nesse estudo foram utilizados como estratégias de análise de dados: Análise univariada, análise de assinatura de vitaminas, confecção de diagrama de Venn, gráfico Volcano, gráfico de barras circular, análise de correlação, gráfico de cor e curva ROC.

4.10 Análise da assinatura das vitaminas A e D e da ferritina

Essa análise foi utilizada para detectar pequenas alterações dos níveis de vitaminas e ferritina que em geral não são evidenciadas por abordagens estatísticas convencionais.

A metodologia consiste em converter valores quantitativos em dados categóricos. Os participantes do estudo foram “categorizados” como tendo ALTOS e BAIXOS níveis de vitaminas e Ferritina, utilizando o valor da mediana global como ponto de corte (*cut-off*) específico para cada Vitamina e para ferritina. A mediana utilizada foi denominada global, pois os valores foram obtidos dos níveis de vitaminas e ferritina para todos os participantes do estudo.

Para se encontrar a mediana global, inicialmente, organizou-se os dados em ordem crescente, sendo que o valor da mediana, foi considerado aquele de posição central, na distribuição. Com base nesses valores, foi estabelecido o ponto de corte para cada um dos três parâmetros. Os indivíduos que possuíam níveis de vitaminas e ferritina maiores ou iguais à mediana global foram categorizados como tendo altos

níveis (*HIGH*) daquele marcador específico. Os indivíduos que possuíam níveis menores do que a mediana global foram considerados tendo baixos níveis (*LOW*).

Além disso, realizou-se a montagem de curvas ascendentes da assinatura das vitaminas e ferritina para identificar mudanças no perfil global das mesmas. Essa análise permitiu observar o comportamento e a hierarquia dos níveis de vitaminas e ferritina, e dessa forma, contribuiu para o entendimento do perfil nutricional dos participantes desse grupo. Níveis relevantes foram considerados quando a porcentagem de indivíduos com altos níveis de vitaminas e ferritina foi maior que 50%.

4.11 Diagrama de Venn

Os Diagramas de Venn são ferramentas muito utilizadas na bioinformática e tem como objetivo ilustrar as interações entre conjuntos de dados compartilhados. São comumente representados como círculos que se cruzam parcialmente para descrever conjunto de interseções (\cap) (LAM et al., 2016). Para a confecção dos diagramas de Venn neste estudo utilizou-se o software Bioinformatics & Evolutionary Genomics, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

4.12 Gráfico Volcano plot

O gráfico volcano é uma ferramenta visual amplamente utilizada em estudos biológicos para analisar e interpretar variações nos níveis de diferentes moléculas, como genes, proteínas ou, neste caso, vitaminas e ferritina, entre dois grupos experimentais. Esse tipo de gráfico combina a magnitude das mudanças com a significância estatística dessas mudanças em uma única representação gráfica, facilitando a identificação de alterações relevantes.

Para a criação do gráfico volcano, inicialmente, foram realizados os testes para verificar os níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina nos grupos de estudo. Em seguida, procedeu-se com a análise estatística dos dados. Para cada vitamina e ferritina, calculou-se a razão entre os níveis no grupo, seguida da aplicação da transformação logarítmica de base 2, resultando no valor de Log₂ Fold Change (log₂ FC). Paralelamente, realizou-se um teste t de Student, para comparar os níveis entre os grupos, obtendo-se o valor-p para cada vitamina e ferritina. Este valor-p foi

transformado pela aplicação do logaritmo negativo de base 10, resultando no $-\log_{10}(p)$, que indica a significância estatística das mudanças observadas.

Posteriormente, os dados foram organizados em uma tabela contendo as seguintes colunas: Nome da Vitamina/Ferritina, \log_2 FC e $-\log_{10}(p)$. Adicionalmente, foram incluídas colunas para a significância ($p < 0.05$) e para a magnitude da mudança (\log_2 FC < -1.3 ou \log_2 FC > 1.3), permitindo a categorização dos pontos a serem plotados.

Na etapa de criação do gráfico vulcano, os dados foram representados em um gráfico de dispersão, onde o eixo X corresponde ao Log₂ Fold Change (\log_2 FC) e o eixo Y ao $-\log_{10}$ dos valores-p. Cada ponto no gráfico representa uma vitamina (A ou D) ou ferritina. A posição horizontal de cada ponto indica a magnitude da mudança nos níveis, com valores positivos à direita indicando um aumento nos níveis na condição experimental e valores negativos à esquerda indicando uma diminuição. A posição vertical de cada ponto reflete a significância estatística das mudanças, com valores mais altos indicando uma maior significância.

Para diferenciar visualmente as vitaminas e ferritina com mudanças significativas, foram aplicadas cores específicas: pontos em azul representam aquelas com diminuição significativa nos níveis ($p < 0.05$ e \log_2 FC < -1.3), enquanto pontos em vermelho indicam um aumento significativo ($p < 0.05$ e \log_2 FC > 1.3). O gráfico foi dividido em duas partes para facilitar a visualização e interpretação dos resultados: o gráfico A exibe a diferença relativa (Fold Change) nos níveis de vitamina A, D e ferritina entre os grupos comparados, enquanto o gráfico B apresenta a diferença absoluta (Delta) nos níveis das mesmas vitaminas e ferritina entre os grupos comparados.

A aplicação do gráfico vulcano neste estudo permitiu a visualização clara das variações nos níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina entre os grupos de estudo, destacando as mudanças mais significativas e relevantes. Dessa maneira, o gráfico vulcano foi uma ferramenta crucial para a interpretação dos resultados experimentais, proporcionando uma visão abrangente das diferenças entre as condições estudadas.

4.13 Gráfico de barras circular

Para representar visualmente a distribuição dos níveis de vitaminas A, D e ferritina entre os participantes do estudo, foi utilizado um gráfico de barras circular. Este gráfico fornece uma maneira intuitiva de visualizar as proporções de indivíduos categorizados com altos e baixos níveis de cada marcador nutricional. Diferente do gráfico de barras convencional, onde as barras são dispostas horizontal ou verticalmente ao longo de um eixo linear, nesse gráfico as barras são dispostas radialmente ao redor de um ponto central. O comprimento de cada barra representa o valor da variável correspondente, sendo que as barras se estendem do centro para a periferia do círculo.

4.14 Análise de correlação e Mapa de cor (Heatmap)

O mapa de cor (heatmap) representa os níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina para diferentes indivíduos dentro de cada grupo do estudo. Para gerar esse heatmap, inicialmente foram medidos os níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina em amostras de sangue de cada indivíduo pertencente aos grupos estudados. Em seguida, os valores obtidos foram normalizados a fim de assegurar a comparabilidade entre os indivíduos e as variáveis analisadas. Os dados normalizados foram organizados em uma matriz, na qual as linhas representam os indivíduos e as colunas representam as variáveis (vitamina A, vitamina D e ferritina). A matriz foi então visualizada como um mapa de cor, onde cada célula é colorida conforme a magnitude do valor correspondente. No heatmap, cores verdes representam valores mais baixos, enquanto cores vermelhas indicam valores mais altos, estando esses relacionados também a intensidade da cor. O heatmap permite uma visualização clara das variações nos níveis de vitaminas e ferritina entre os indivíduos e os grupos, facilitando a identificação de padrões relevantes para a análise epidemiológica e clínica.

Na análise de correlação foram calculadas as correlações de Pearson, visando avaliar a relação linear entre as variáveis dentro de cada grupo. Os coeficientes de correlação obtidos foram visualizados por meio de gráficos de bolhas (bubble plots), nos quais o tamanho da bolha representa a magnitude da correlação, e a cor indica a direção da correlação. Bolhas azuis representam correlações positivas, enquanto bolhas vermelhas indicam correlações negativas. A intensidade das cores (mais forte ou mais clara) também sinaliza a força da correlação, sendo que cores mais intensas

representam correlações mais fortes. A análise de correlação é essencial para compreender as inter-relações entre as variáveis dentro de cada grupo de estudo, fornecendo insights sobre possíveis mecanismos biológicos e influências ambientais que afetam os níveis de vitaminas e ferritina em diferentes populações.

4.15 Curva ROC

O desempenho dos biomarcadores para identificação de indivíduos portadores de hanseníase e co-infectado por esquistossomose foi avaliada pela curva ROC, (Receiver Operating Characteristic) (MARTINEZ et al., 2003). Para construir a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) os dados sobre os níveis dos biomarcadores (vitamina A, vitamina D e ferritina) foram inicialmente incluídos. Esses subgrupos foram categorizados como LID(+)*Schisto*(+)ND, LID(+)*Schisto*(-)D e LID(+)*Schisto*(-)ND conforme necessário para a análise.

Primeiramente, os valores de corte (*cut-off*) para cada biomarcador foram determinados. Esses valores de corte foram escolhidos de forma a maximizar a discriminação entre os subgrupos de estudo. Em seguida, foram realizados testes estatísticos para calcular os p-valores. Um p-valor menor que 0.05 foi considerado indicativo de significância estatística.

Para cada biomarcador, foi calculada a Área Sob a Curva ROC (AUC). A AUC é uma medida da capacidade do biomarcador de discriminar entre os subgrupos, variando de 0.5 (nenhuma discriminação) até 1.0 (excelente discriminação). Valores de AUC entre 0.7 e 0.8 são considerados aceitáveis ou moderados.

Além disso, foram calculadas a sensibilidade e a especificidade para cada biomarcador, utilizando os valores de corte determinados. A sensibilidade e a especificidade foram categorizadas como muito alta (acima de 90%), alta (entre 75% e 90%), moderada (entre 50% e 75%) e baixa (abaixo de 50%).

A razão de verossimilhança positiva (LR+) foi também calculada, como uma medida adicional da eficácia dos biomarcadores. LR+ é considerada sem discriminação se igual a 1, moderada entre 2 e 5, moderada a significativa entre 5 e 10, e muito significativa acima de 10.

Com esses parâmetros calculados, foi possível plotar as curvas ROC para os biomarcadores que apresentaram diferença estatisticamente significativa. Nos gráficos da curva ROC, a sensibilidade (eixo Y) é plotada contra 1-especificidade

(eixo X), permitindo a visualização da capacidade dos biomarcadores em discriminar entre os subgrupos

5 RESULTADOS

Entre os 1200 indivíduos voluntários, residentes de áreas endêmicas para hanseníase, 81 apresentaram resultado positivo para LID-1 e foram selecionados para o estudo. Para diagnóstico de coinfeção pelo *S. mansoni*, esses indivíduos foram submetidos a um teste de ELISA para detecção de anticorpos contra SEA e SWAP no soro, e um teste imunocromatográfico comercial CCA para detecção de antígeno na urina. A partir desses resultados, os 81 indivíduos foram então segregados em três subgrupos.

A caracterização destes subgrupos se baseou na confirmação da infecção pela hanseníase através de manifestações clínicas e foram classificados como doentes (D), os que não tiveram o diagnóstico confirmado por outros métodos foram considerados não doentes (ND), e pela positividade para ao menos um dos três parâmetros que investigaram a infecção pelo *S. mansoni*, SEA, SWAP e CCA e foram denominados SCHISTO +. Quando os três parâmetros eram negativos, os indivíduos foram denominados SCHISTO (-).

O primeiro grupo foi denominado LID(+)*Schisto*(-) ND (N=33), sendo composto pelos indivíduos LID+, sem coinfeção pelo *S. mansoni*, e sem manifestação de sintomas clínicos da hanseníase. O segundo grupo denominado LID(+)*Schisto*(+) ND (N=26), agrupou os indivíduos LID+, que apresentaram coinfeção pelo *S. mansoni* e não manifestaram os sintomas clínicos da hanseníase. O terceiro grupo foi denominado LID(+)*Schisto*(-) D (N=19), formado pelos indivíduos LID+, sem coinfeção pelo *Schistosoma*, mas com sintomas clínicos para hanseníase. Todas as demais análises foram realizadas comparando-se a resposta desses três grupos.

As características sociodemográficas da amostra são apresentadas na tabela 1. Observa-se que a maioria dos participantes são do gênero feminino (67,91%), possui mais de 30 anos de idade (80,24%) e reside no município de Governador Valadares (58,02%).

É importante destacarmos que, das 81 pessoas que apresentaram resultado positivo para LID-1, 22 (27,16%) receberam o diagnóstico de hanseníase. Destacamos, que essas pessoas não tinham nenhum tipo de sinal ou sintoma

sugestivo para a doença, sendo diagnosticadas devido ao acompanhamento proposto pelo grupo.

Tabela 1 Características sociodemográficas dos indivíduos do estudo

Variável	Participantes (n=81)*		Participantes com diagnóstico de hanseníase (n=22)	
	N	% total		
Gênero				
Masculino	26	32,09	7	31,81
Feminino	55	67,91	15	68,18
Idade (Anos)				
<15	8	9,88	1	4,54
15-30	8	9,88	2	9,09
>30	65	80,24	19	86,37
Localidade				
Governador Valadares	47	58,02	22	100
Inhapi	8	9,88	-	-
Teófilo Otoni	9	11,11	-	-
Limeira de Mantena	12	14,81	-	-
Mantena	5	6,17	-	-

* Total de participantes da pesquisa

Utilizando a análise univariada para avaliar os níveis de vitamina A, D e ferritina nos diferentes grupos, observa-se que os níveis de Vitamina A e Vitamina D são significativamente menores no grupo LID(+)/Schisto(-) D em comparação com os outros grupos, evidenciando uma possível influência da hanseníase na biodisponibilidade dessas vitaminas. Em contrapartida, os níveis de Ferritina não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Figura 6A).

O gráfico de barras circular (Figura 6B) corrobora com os resultados anteriores que demonstram que o grupo com indivíduos doentes LID(+)/Schisto(-) D apresenta menores níveis de vitaminas quando comparado aos grupos não doentes, LID(+)/Schisto(-)ND e LID(+)/Schisto(+)/ND.

Figura 6 Níveis de Vitaminas A, D e Ferritina no soro dos grupos de indivíduos participantes do estudo

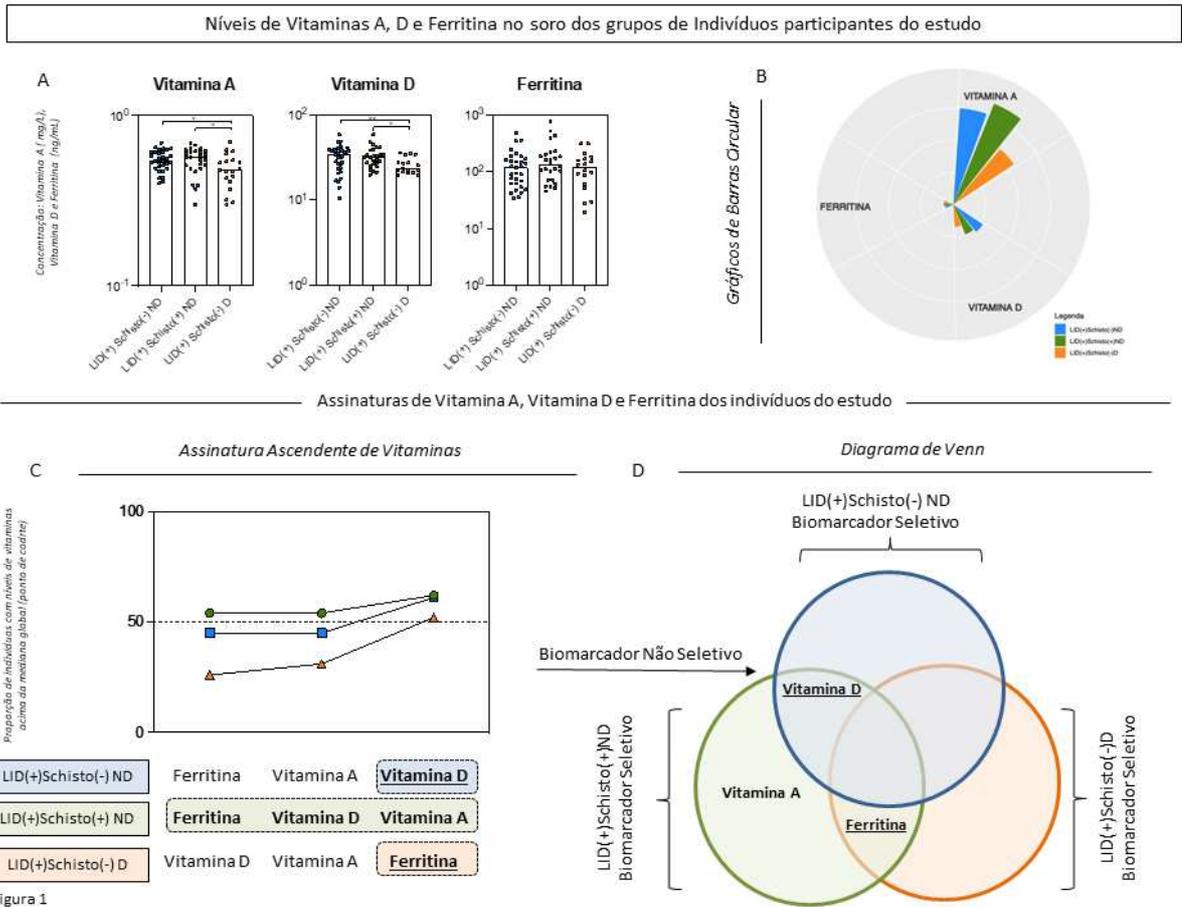


Figura 1

Figura 6. O painel A apresenta as concentrações de Vitamina A (µg/dL), Vitamina D (ng/mL) e Ferritina (ng/mL) em três grupos distintos de indivíduos: LID(+)-Schisto(-) ND, LID(+)-Schisto(+)-ND, LID(+)-Schisto(-) D. As barras mostram as médias das concentrações, enquanto os pontos indicam os valores individuais dos participantes. As escalas são logarítmicas para melhor visualização das diferenças entre os grupos. O gráfico de barras circulares (painel B) ilustra os níveis de Vitamina A, Vitamina D e Ferritina nos três grupos de estudo. Cada segmento de barra representa um dos grupos experimentais e as barras indicam a magnitude dos níveis das vitaminas e da ferritina em cada grupo. O painel C, intitulado "Assinatura Ascendente de Vitaminas", exibe a proporção de indivíduos em cada grupo com níveis de vitaminas acima da mediana global, utilizando pontos de corte específicos. Os grupos são: LID(+)-Schisto(-) ND (quadrado azul), LID(+)-Schisto(+)-ND (círculo verde) e LID(+)-Schisto(-) D (triângulo laranja). As linhas conectam os pontos que representam as proporções de indivíduos com níveis elevados de Ferritina, Vitamina D e Vitamina A, permitindo a comparação entre os grupos. O painel D, representado por um diagrama de Venn, ilustra a sobreposição de biomarcadores entre os diferentes grupos de estudo. A categorização dos biomarcadores é feita em seletivos e não seletivos: Biomarcador Seletivo para LID(+)-Schisto(-) ND (área azul), Biomarcador Seletivo para LID(+)-Schisto(+)-ND (área verde) e Biomarcador Seletivo para LID(+)-Schisto(-) D (área laranja). O diagrama evidencia quais biomarcadores são exclusivos ou comuns entre os diferentes grupos, auxiliando na identificação de padrões de seletividade.

As figuras 6C e 6D apresentam a avaliação dos níveis de vitamina A, D e ferritina utilizando como estratégia de análise a assinatura de biomarcadores. Foram considerados participantes com níveis elevados aqueles que apresentaram valores

acima da mediana global (*Cut-off*) para cada uma das vitaminas e ferritina. A figura 6C demonstra como as proporções de indivíduos com níveis elevados de vitaminas mudam entre os grupos. Nota-se uma variação nos níveis de Ferritina, Vitamina A e Vitamina D entre os diferentes grupos. É interessante notar que a ferritina destacou-se tanto no grupo com coinfeção pelo *S. mansoni* quanto naquele com pessoas diagnosticadas com hanseníase (LID(+)*Schisto*(-) ND e LID(+)*Schisto*(-) D). Essa distribuição sugere a existência de interações complexas entre a infecção por esquistossomose, hanseníase e os níveis de micronutrientes.

O diagrama de Venn (Figura 6D) foi utilizado para mostrar possíveis combinações de intersecções entre os parâmetros avaliados. Desse modo, verificamos que a vitamina A se apresentou como um biomarcador seletivo (LID(+)*Schisto*(+)ND). É interessante notar que a ferritina apresentou intersecção entre dois grupos que se relacionam ao aumento da gravidade do estado de saúde, LID(+)*Schisto*(+)ND e LID(+)*Schisto*(-)D.

Para avaliar as alterações nos níveis de vitaminas entre os grupos, utilizamos um gráfico volcano (Figura 7). O objetivo desta análise é identificar biomarcadores que apresentam mudanças significativas em seus níveis entre os diferentes grupos estudados. O gráfico volcano combina a magnitude da mudança (fold change) com a significância estatística (valor-p), permitindo uma visualização clara e intuitiva das variáveis que estão diferencialmente expressas. No contexto deste estudo, o gráfico volcano nos ajuda a destacar quais vitaminas e biomarcadores são regulados positiva ou negativamente em relação aos diferentes grupos de interesse.

Figura 7 Análise comparativa dos níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina entre os grupos de estudo

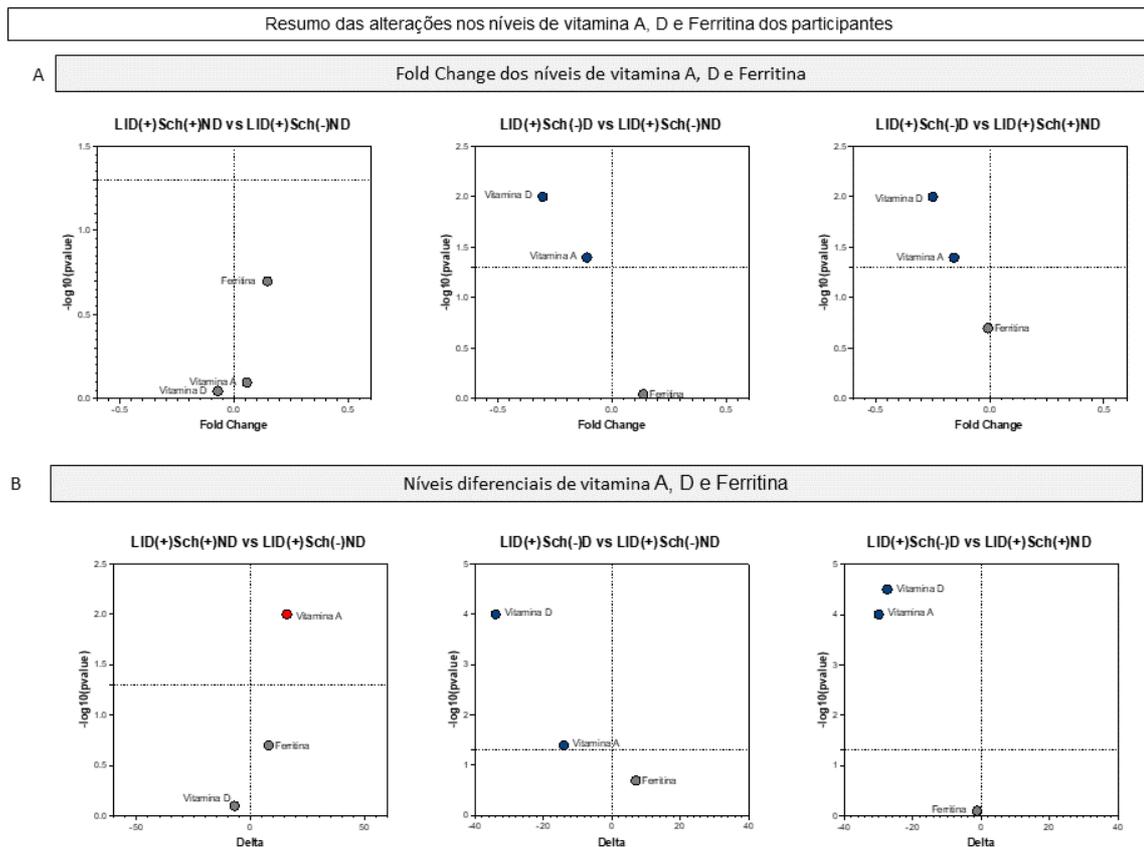


Figura 7: Gráfico volcano representando a variação nos níveis de vitaminas entre os grupos de estudo. Cada ponto representa uma vitamina (A e D) ou ferritina. No eixo X, está representado o log2 das mudanças nos níveis das vitaminas (Log2 Fold Change), enquanto o eixo Y exibe o $-\log_{10}$ dos valores p, que indicam a significância estatística das mudanças observadas. No gráfico volcano, a posição horizontal (eixo X) de cada ponto indica a magnitude da mudança nos níveis de vitaminas, com pontos à direita do eixo Y representando um aumento nos níveis na condição experimental, e pontos à esquerda indicando uma diminuição. A posição vertical (eixo Y) indica a significância estatística dessas mudanças, com pontos mais altos sugerindo uma maior significância. Pontos em azul indicam vitaminas com diminuição significativa nos níveis ($p < 0.05$ e $\text{Log}_2 \text{Fold Change} < -1.3$), enquanto pontos em vermelho indicam vitaminas com aumento significativo nos níveis ($p < 0.05$ e $\text{Log}_2 \text{Fold Change} > 1.3$). Em A observa-se a diferença relativa (Fold Change) nos níveis de vitamina A, D e ferritina entre os grupos comparados e em B a diferença absoluta (Delta) nos níveis de vitamina A, D e ferritina entre os mesmos grupos de comparação.

Observamos que as vitaminas A e D estão reguladas negativamente no grupo LID(+)/Schisto(-)/D quando comparada aos dois grupos sadios (Figura 7A). Notavelmente, na análise de assinaturas de biomarcadores que se vê na Figura 7B, a comparação entre os grupos LID(+)/Schisto(-)/ND e LID(+)/Schisto(-)/D reforça que, em indivíduos com hanseníase, as vitaminas A e D estão reguladas negativamente. Além disso, observa-se que no grupo coinfectado não doente LID(+)/Schisto(+)/ND a

vitamina A está regulada positivamente quando comparado ao grupo LID(+)-Schisto(-)-ND.

A figura 8 apresenta a performance do desempenho de biomarcadores na identificação de subgrupos específicos de indivíduos com diferentes condições. A tabela na parte superior da figura mostra que a vitamina A apresenta um p-valor de 0.04, indicando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos LID(+)-Schisto(-)-ND e LID(+)-Schisto(-)-D. A AUC de 0.67 sugere uma capacidade moderada de discriminação. A sensibilidade é de 52.63%, enquanto a especificidade é alta (80.65%). A razão de verossimilhança de 2.71 indica uma discriminação moderada entre os grupos. Além disso, ao se avaliar o desempenho da vitamina D nos mesmos grupos, observamos um valor de p de 0,01 com AUC de 0.70 sugerindo uma capacidade moderada de discriminação, com sensibilidade alta (100%) especificidade moderada (45.45%), com uma razão de verossimilhança de 1.83.

Figura 8 Análise da performance dos biomarcadores selecionados para identificar indivíduos dos subgrupos estudados

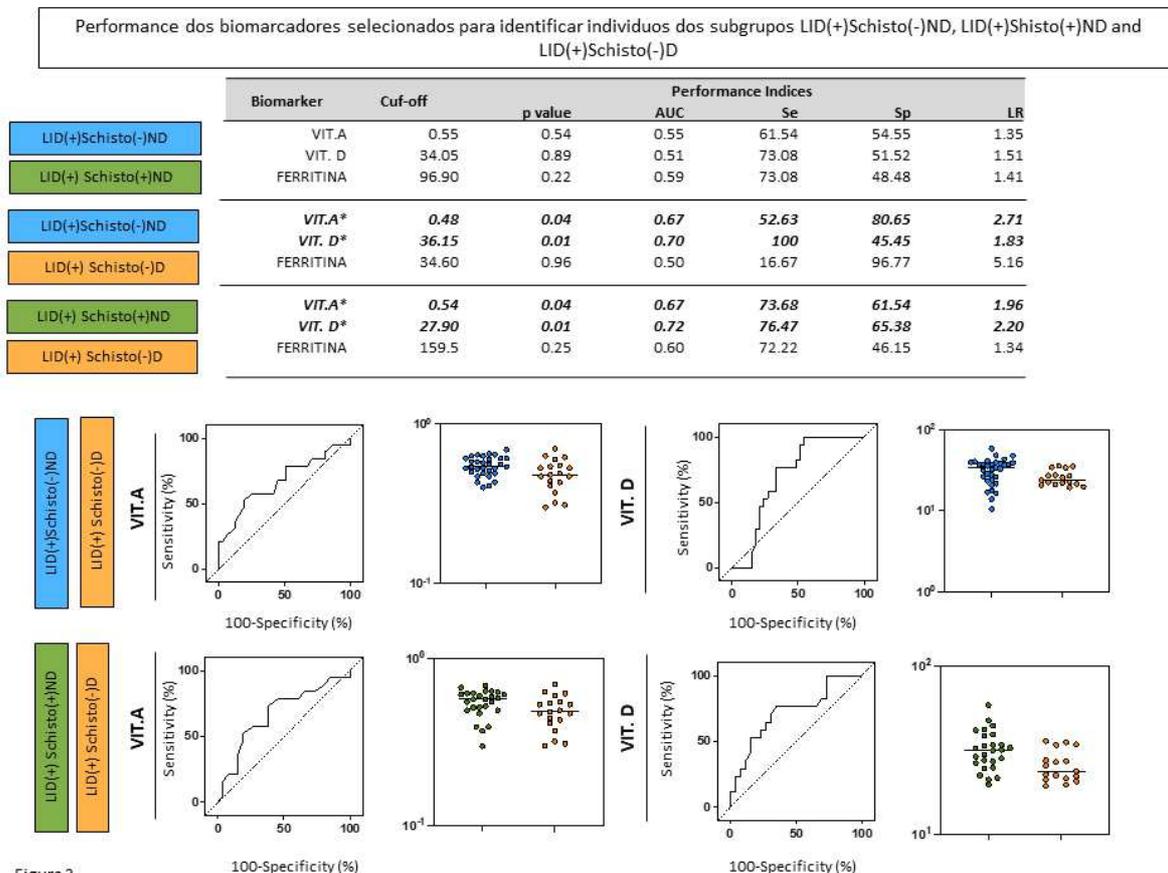


Figura 3

Figura 8 - A figura apresenta a avaliação do desempenho de biomarcadores na identificação de subgrupos específicos de indivíduos com diferentes condições. A tabela no topo da figura resume os valores de corte (Cut-off), os p-valores, a área sob a curva ROC (AUC), a sensibilidade (Se), a especificidade (Sp) e a razão de verossimilhança (LR) para os biomarcadores vitamina A, vitamina D e ferritina. Os p-valores são indicadores de significância estatística, onde valores menores que 0.05 indicam significância. A AUC, que mede a capacidade de discriminação do biomarcador, varia de 0.5 (sem capacidade de discriminação) até 1.0 (excelente discriminação), sendo valores entre 0.7 e 0.8 considerados aceitáveis/moderados. A sensibilidade é considerada muito alta acima de 90%, alta entre 75% e 90%, moderada entre 50% e 75% e baixa abaixo de 50%. A especificidade segue a mesma categorização. A razão de verossimilhança positiva (LR+), que mede a eficácia do biomarcador, é considerada sem discriminação se igual a 1, moderada entre 2 e 5, moderada a significativa entre 5 e 10, e muito significativa acima de 10. Os gráficos ROC (Receiver Operating Characteristic) na parte inferior da figura mostram a sensibilidade versus a especificidade para os biomarcadores de vitamina D e vitamina A, indicando o desempenho na discriminação entre os diferentes subgrupos. O gráfico ROC da vitamina D à esquerda avalia a discriminação entre LID(+)*Schisto*(+)ND e LID(+)*Schisto*(-)D, enquanto o gráfico ROC da vitamina A à esquerda avalia a discriminação entre LID(+)*Schisto*(+)ND e LID(+)*Schisto*(-)D. O gráfico ROC da vitamina D à direita avalia a discriminação entre LID(+)*Schisto*(-)ND e LID(+)*Schisto*(-)D. Os gráficos de dispersão comparam a distribuição dos níveis dos biomarcadores para os mesmos subgrupos. As barras coloridas na figura representam os diferentes subgrupos de indivíduos: verde para LID(+)*Schisto*(-)ND, azul para LID(+)*Schisto*(+)ND e vermelho para LID(+)*Schisto*(-)D. Os asteriscos (*) indicam biomarcadores com significância estatística.

Na comparação entre os grupos LID(+)*Schisto*(+)ND e LID(+)*Schisto*(-)D, a vitamina A apresenta um p-valor de 0.04, indicando uma diferença estatisticamente significativa. A AUC de 0.67 sugere uma capacidade moderada de discriminação. A sensibilidade é de 73.68% e a especificidade é de 61.54%, com uma razão de verossimilhança de 1.96. Adicionalmente, a vitamina D apresenta um p-valor de 0.01 na análise entre os grupos LID(+)*Schisto*(+)ND e LID(+)*Schisto*(-)D. A AUC de 0.72 sugere uma capacidade moderada de discriminação. A sensibilidade é de 76.47% e a especificidade é de 65.38%, com uma razão de verossimilhança de 2.20.

Isso sugere que tanto a vitamina A quanto a vitamina D são biomarcadores eficazes para distinguir entre os grupos LID(+)*Schisto*(-)ND e LID(+)*Schisto*(-)D, assim como entre os grupos LID(+)*Schisto*(+)ND e LID(+)*Schisto*(-)D. Esses resultados destacam a importância das vitaminas A e D como biomarcadores na identificação de subgrupos específicos de indivíduos com diferentes condições. A presença de diferenças estatisticamente significativas e a capacidade moderada de discriminação sugerem que esses biomarcadores podem contribuir para diagnósticos mais precisos e direcionados, auxiliando na melhor gestão e tratamento das condições avaliadas.

A Figura 9 apresenta a avaliação dos níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina, juntamente com a análise de correlação. A parte A da figura mostra um mapa de cor

dos níveis de biomarcadores nos diferentes subgrupos. No grupo LID(+)*Schisto*(+)ND, observa-se uma variação considerável nos níveis de vitamina A, predominando níveis baixos a moderados (verde escuro a verde claro), com alguns indivíduos apresentando níveis mais altos (vermelho). A maioria dos indivíduos desse grupo apresenta níveis moderados de vitamina D (verde), com algumas variações para níveis mais altos (vermelho). Os níveis de ferritina variam, mas há uma leve tendência para valores elevados (vermelho), apesar de vários indivíduos terem níveis moderados a baixos (verde).

No grupo LID(+)*Schisto*(-)ND, os níveis de vitamina A variam significativamente entre os indivíduos, com muitos apresentando níveis baixos (verde escuro) e alguns níveis mais elevados (vermelho). A vitamina D também apresenta uma variação significativa, com predomínio de níveis moderados a altos (verde a vermelho). Os níveis de ferritina no mesmo grupo mostram uma tendência a valores mais elevados (vermelho), embora exista uma distribuição considerável entre níveis baixos e altos.

No grupo LID(+)*Schisto*(-)D, há uma ampla variação nos níveis de vitamina A, com alguns indivíduos apresentando níveis altos (vermelho) e outros níveis muito baixos (verde escuro). Os níveis de vitamina D variam de baixos a moderados (verde a verde claro), com menos indivíduos apresentando níveis muito altos. A ferritina também mostra uma variação, com algumas amostras indicando níveis muito altos (vermelho escuro), mas sobretudo com níveis mais baixos (verde escuro).

Figura 9 Níveis de vitamina A, D e Ferritina e análise de correlação nos grupos de estudo

Níveis de Vitaminas A, D and Ferritina e análise de correlação nos grupos LID(+)/Schisto(-)/ND, LID(+)/Shisto(+)/ND and LID(+)/Schisto(-)/D

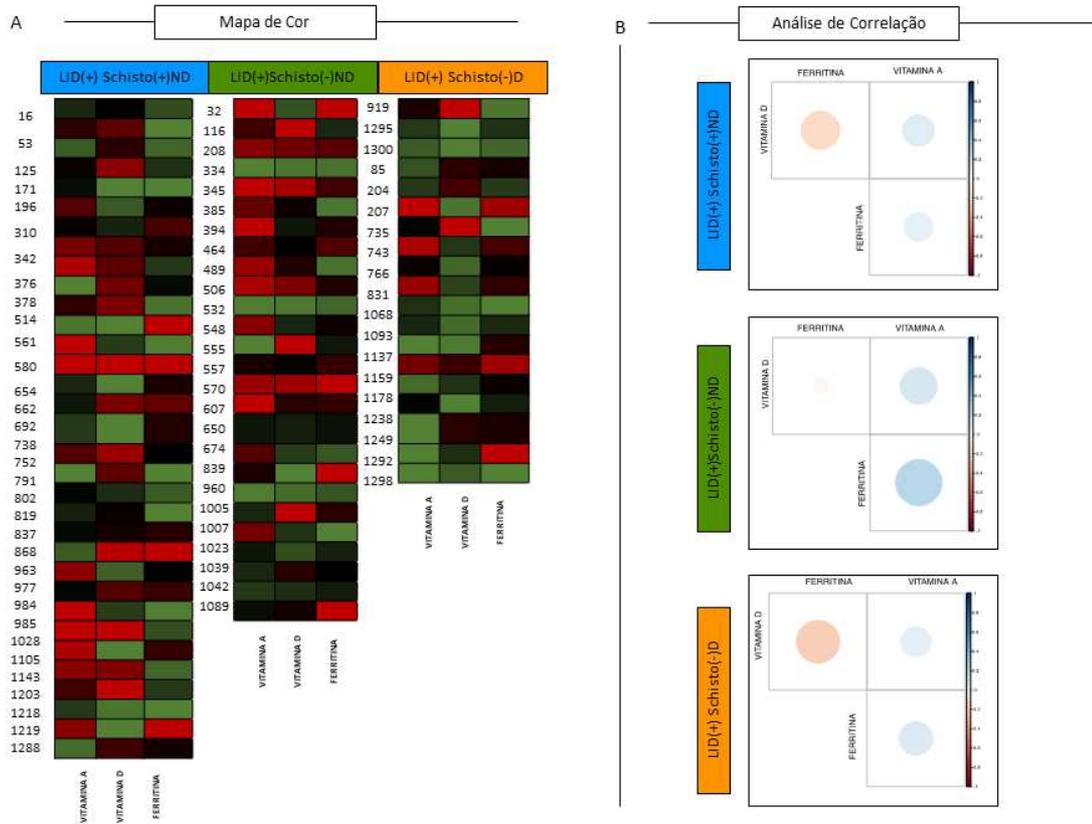


Figura 9. A: Mapa de cor dos níveis de biomarcadores nos três grupos. Cada linha representa um indivíduo, e cada coluna representa um biomarcador específico (vitamina A, vitamina D ou ferritina). A coloração varia do verde escuro ao vermelho escuro, onde: Verde escuro indica níveis baixos do biomarcador. Verde claro indica níveis moderadamente baixos. Vermelho claro indica níveis moderadamente altos. Vermelho escuro indica níveis altos do biomarcador. B: Os gráficos de correlação mostram as relações entre Vitamina D, Ferritina e Vitamina A nos três grupos de estudo. Círculos azuis indicam correlações positivas, enquanto círculos vermelhos indicam correlações negativas. O tamanho dos círculos representa a força da correlação, com círculos maiores indicando correlações mais fortes. A intensidade da cor também indica a força da correlação, com cores mais saturadas representando correlações mais fortes.

A análise de correlação (Figura 9B) é representada por matrizes de correlação para cada um dos três grupos. Cada matriz exibe correlações entre os níveis de Vitamina A, Vitamina D e Ferritina. A intensidade e a direção das correlações são indicadas por círculos coloridos, onde a cor e o tamanho dos círculos representam a força da correlação.

No grupo LID(+)/Schisto(+)/ND, observa-se uma correlação negativa entre Vitamina D e Ferritina, uma correlação positiva entre Vitamina A e Ferritina, e uma correlação positiva entre as vitaminas A e D. Para o grupo LID(+)/Schisto(-)/ND, as

correlações seguem um padrão semelhante, com uma correlação fracamente negativa entre Vitamina D e Ferritina e uma correlação positiva entre as vitaminas A e D e entre Vitamina A e Ferritina. Já no grupo LID(+)/Schisto(-)/D, há uma correlação positiva entre as vitaminas A e D e entre Vitamina A e Ferritina e uma forte correlação negativa entre Vitamina D e Ferritina. Isso sugere que, neste grupo, níveis mais altos de Vitamina A estão associados a níveis mais altos de Ferritina, enquanto níveis mais baixos de Vitamina D estão associados a níveis mais altos de Ferritina.

Em resumo, os dados indicam que, em todos os grupos, níveis mais altos de Vitamina A estão associados a níveis mais altos de Ferritina, enquanto níveis mais baixos de Vitamina D estão associados a níveis mais altos de Ferritina.

6 DISCUSSÃO

Evidências sugerem que os mecanismos envolvidos em infecções por helmintos e deficiências de micronutrientes aumentam a suscetibilidade a outras doenças. Nossa pesquisa avaliou indivíduos monoinfectados por *M. leprae* e coinfectados por *M. leprae* e *S. mansoni*, observando como os níveis de Vitaminas A e D e de Ferritina variam conforme o estado de saúde. Foi possível identificar que esses elementos são regulados de maneiras distintas dependendo da presença de uma ou ambas as infecções e frente ao adoecimento por hanseníase. O entendimento dessas inter-relações é crucial para o desenvolvimento de estratégias de saúde pública que visem reduzir a incidência e controlar a disseminação tanto da hanseníase quanto da esquistossomose em populações mais vulneráveis.

Os resultados desse estudo indicam que os níveis de Vitamina A e Vitamina D são significativamente mais baixos no grupo de indivíduos com diagnóstico de hanseníase (LID+)/Schisto(-)D. Por meio do gráfico de barras circular foi possível verificar que esse mesmo grupo apresenta menores níveis de vitaminas quando comparado aos grupos não doentes, LID(+)/Schisto(-)ND e LID(+)/Schisto(+)/ND.

Lima, Emerson S. et al (2007) estudaram as alterações nos níveis séricos de peroxidação lipídica (LPO) e vitamina A em pacientes com diferentes formas de hanseníase. Os autores observaram que os níveis de vitamina A no soro dos pacientes com hanseníase, principalmente na forma lepromatosa, diminuíram em relação ao controle. Ao avaliarem 67 pacientes com hanseníase, Rao e Saha (1988) também observaram reduções significativas nos níveis séricos médios

de vitaminas 'A' e 'E' nos grupos com hanseníase em comparação com os controles normais.

A Vitamina A é conhecida como uma vitamina anti-inflamatória devido ao seu papel crítico no aumento da função imunológica. Tem sido observado que, a vitamina A desempenha funções cruciais na imunidade, tendo papel no desenvolvimento e maturação de macrófagos (HIEMSTRA, Ida H. et al., 2014), regulação e diferenciação de precursores de células dendríticas (ZENG, Ruizhu et al., 2016, KLEBANOFF, Christopher A. et al., 2013 e BEIJER, Marieke R. et al., 2013) e na expansão e sobrevivência de células TCD8+ (GUO, Yanxia et al., 2012.).

Estudos mostraram que a vitamina A desempenha um papel crucial na formação, queratinização, estratificação, diferenciação e maturação das células epiteliais, que sabidamente estão envolvidas na "linha de frente" de defesa contra patógenos. Essa vitamina é essencial para a camada de muco do trato respiratório e intestinal, promovendo a secreção de mucina e melhorando a imunidade não específica desses tecidos (WANG, Joseph L. et al., 1997, MCCULLOUGH, F. S. W.; NORTHROP-CLEWES, C. A.; THURNHAM., 1999 e AMIT-ROMACH, Einat et al., 2009).

Um estudo piloto de caso-controle que foi conduzido em 73 pacientes com hanseníase multibacilar em Belo Horizonte/ Brasil, demonstrou que 11 (15%) indivíduos da amostra apresentaram infecção por helmintos, mais da metade (52%) tinham deficiência de vitamina D e oito (11%) tinham insuficiência de vitamina A, demonstrando que deficiência de vitaminas e infecções por helmintos eram prevalentes nesses pacientes (FAIRLEY, Jessica K. et al., 2019).

Dennison, Cori L. et al. (2021), destacam que as coinfeções por helmintos e as deficiências de micronutrientes podem estar associadas à hanseníase devido aos seus efeitos no sistema imunológico.

KIM, Elliot W e outros pesquisadores (2018) revelaram em seu estudo que níveis adequados de vitamina D antes da infecção microbiana contribuem para reduzir a viabilidade do patógeno no macrófago. Ainda, os mesmos autores, relataram que, o status de vitamina D durante a diferenciação do macrófago permite a indução de uma resposta antimicrobiana contra o *M. leprae* intracelular.

A capacidade do macrófago humano em montar uma resposta eficaz contra micobactérias intracelulares, depende de sua capacidade de induzir a produção do peptídeo antimicrobiano Catelecidina, por meio da via antimicrobiana dependente de

vitamina D (LIU, Philip T. et al., 2007). Os mecanismos efetores antimicrobianos são centrais para a função da resposta imune inata na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos e a elaboração da resposta antimicrobiana contra micobactérias intracelulares antes que as bactérias empreguem mecanismos de evasão é fundamental.

Diante disso, entendemos que a avaliação dos níveis das vitaminas A e D pode ser empregada como uma estratégia terapêutica para intervir na hanseníase, visto que a suplementação é um adjuvante terapêutico atuando para impedir uma resposta imune desregulada (LIU, Philip T. et al., 2012.)

Nesse estudo, observamos também, que níveis mais elevados de ferritina estão associados ao agravamento do estado de saúde, visto que maiores níveis dessa proteína foram observados no grupo coinfectado e no grupo com diagnóstico de hanseníase (LID(+)/Schisto(+)/ND e LID(+)/Schisto(-)/D). Isso também foi observado quando utilizamos a estratégia de análise de assinatura de biomarcadores, onde foi possível observar que a ferritina destacou-se tanto no grupo com coinfeção pelo *S. mansoni* quanto naquele com pessoas diagnosticadas com hanseníase (LID(+)/Schisto(-) ND e LID(+)/Schisto(-) D) (N=3). Ainda, quando verificada a análise de correlação (Figura 8C) observou-se que níveis mais altos de Vitamina A estão associados a níveis mais altos de Ferritina, enquanto níveis mais baixos de Vitamina D estão associados a níveis mais altos de Ferritina.

Oktaria e colaboradores conduziram em 2018 um estudo de caso-controle na Indonésia com o objetivo de investigar a associação entre dieta e nutrição e sua relação com a pobreza. Os autores observaram que níveis altos de ferritina foram duas vezes mais comuns naqueles com hanseníase do que nos controles. Ainda, Souza, Vânia Nieto Brito et al. (2012) ao investigarem mudanças em parâmetros relacionados à homeostase do ferro em pacientes com hanseníase observaram níveis aumentados de ferritina sérica nos participantes MB.

Foi descrito na literatura o quadro “anemia de inflamação” (AI) que é caracterizado por níveis reduzidos de ferro no soro e aumento das reservas de ferro, evidenciado pela ferritina elevada (SOUZA, Vânia Nieto Brito de et al., 2012). Lapinsky et al. (1992) relataram em seu estudo a ocorrência de anemia em pacientes com hanseníase multibacilar e classificaram essa anemia como AI, pois observaram

diminuição nos níveis séricos de ferro e leves aumentos nas concentrações séricas de ferritina.

Inicialmente, a ferritina era vista apenas como um marcador dos níveis de ferro no corpo, com níveis baixos indicando estoques reduzidos de ferro e níveis altos sugerindo estoques normais ou aumentados. No entanto, estudos revelam que, como proteína de fase aguda, a síntese de ferritina aumenta em condições inflamatórias, infecciosas e malignas (MAHROUM et al., 2022; GROTTTO, 2010; ORINO; WATANABE, 2008).

A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia. No entanto, diagnosticar anemia por deficiência de ferro em áreas específicas onde doenças infecciosas são prevalentes pode ser muito desafiador, pois os níveis de ferritina sérica podem aumentar devido a respostas imunológicas ao agente infeccioso, mascarando um diagnóstico de deficiência de ferro puro (OKTARIA, S. et al., 2018).

Os resultados deste estudo destacam a importância da avaliação dos níveis de ferro e ferritina no diagnóstico e tratamento da hanseníase. Observamos que níveis elevados de ferritina estão associados ao agravamento do estado de saúde, especialmente em pacientes coinfectados e diagnosticados com hanseníase. A ferritina se destacou como um biomarcador significativo nos grupos coinfectados por *S. mansoni* e nos diagnosticados com hanseníase, corroborando com a literatura que indica sua elevação em condições inflamatórias e infecciosas. Estudos anteriores também relataram a alta prevalência de ferritina elevada em pacientes com hanseníase, associando-a à anemia de inflamação (AI), onde há níveis reduzidos de ferro no soro e aumento das reservas de ferro.

Quanto ao uso desses elementos como biomarcadores, foi possível observar que os os níveis de vitamina A e D podem ser avaliados para subsidiar o diagnóstico precoce da hanseníase, visto que essas vitaminas demonstraram boa performance como biomarcadores, visto que demonstraram capacidade moderada de discriminação entre os grupos de indivíduos que são LID-1 (+) que já têm o diagnóstico de hanseníase, daqueles que ainda não apresentam sinais e sintomas sugestivos da doença. Além disso, a ferritina se mostrou como um biomarcador crucial que deve ser considerado para um diagnóstico preciso e para o manejo adequado da hanseníase, especialmente em regiões endêmicas onde a presença de doenças infecciosas pode complicar a interpretação dos níveis de ferro.

Embora não tenhamos conseguido estabelecer uma correlação estatística, devido ao menor número de participantes desse grupo, uma análise descritiva revelou que o grupo coinfestado e doente (LID+)/Schisto(+D) apresenta medianas de vitamina D (23,9 ng/mL) e vitamina A (0,50mg/L) menores que as medianas globais de vitamina D (31,45 ng/mL) e vitamina A (0,54mg/L) observadas nos grupos avaliados. Além disso, foi observado que, nesse grupo, a mediana dos níveis de ferritina (202,8 ng/mL) é mais elevada do que os níveis globais (123,25 ng/mL). Vale ressaltar que esse é um estudo longitudinal e os participantes estão sendo acompanhados para possíveis diagnósticos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo ressaltam a importância da avaliação dos níveis de vitamina A, vitamina D e ferritina para auxiliar no diagnóstico e tratamento da hanseníase. Ficou claro que níveis reduzidos de vitamina A e D são comuns em indivíduos com hanseníase, indicando sua utilidade no momento do diagnóstico. Além disso, observamos que níveis elevados de ferritina estão associados ao agravamento do estado de saúde, especialmente em pacientes coinfestados e diagnosticados com hanseníase, sublinhando sua relevância como biomarcador significativo.

A ferritina, em particular, destaca-se como um marcador crucial que deve ser considerado para o manejo adequado da hanseníase, especialmente em regiões endêmicas onde doenças infecciosas podem complicar a interpretação dos níveis de ferro. Portanto, a avaliação desses biomarcadores pode melhorar as estratégias terapêuticas para controlar a doença e as coinfeções associadas.

É fundamental que estudos adicionais continuem a explorar essas inter-relações para aprofundar o entendimento dos mecanismos envolvidos visando desenvolver intervenções mais eficazes. A continuidade da pesquisa nessa área é essencial para aprimorar as abordagens terapêuticas, contribuindo para a redução da prevalência da hanseníase e esquistossomose em populações vulneráveis.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, Elioenai Dornelles; FERREIRA, Telma Leonel; FERREIRA, Isaias Nery. Hanseníase avanços e desafios. In: **Hanseníase avanços e desafios**. 2014. p. 492-492.

AMIMO, J. O. et al. **Immune Impairment Associated with Vitamin A Deficiency: Insights from Clinical Studies and Animal Model Research**. **Nutrients**MDPI, , 1 dez. 2022.

AMIT-ROMACH, Einat et al. Bacterial population and innate immunity-related genes in rat gastrointestinal tract are altered by vitamin A-deficient diet. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 70-77, 2009.

AMORIM, Francianne M. et al. Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004934, 2016.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. **Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review**. **Journal of Advanced Research**, set. 2013.

BEIJER, Marieke R. et al. A crucial role for retinoic acid in the development of N otch-dependent murine splenic CD 8⁻ CD 4⁻ and CD 4⁺ dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 43, n. 6, p. 1608-1616, 2013.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352–358, 16 jul. 2009.

BEZERRA, D. D. F. et al. Diagnostic comparison of stool exam and point-of-care circulating cathodic antigen (POC-CCA) test for schistosomiasis mansoni diagnosis in a high endemicity area in northeastern Brazil. **Parasitology**, v. 148, n. 4, p. 420–426, 1 abr. 2021.

BOVOLINI, Giovana M.; SILVA, Eliane A.; DE SOUZA, Vânia Nieto Brito. Desempenho dos antígenos PGL-1, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico sorológico de hanseníase em pacientes e contatos domiciliares: revisão de literatura. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 44, p. 1-14, 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia para o controle da hanseníase. 2002.

Disponível

em: chromeextension://efaidnbmninnibpcajpcglclefindmkaj/https://bvmsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseníase.pdf. Acesso em: 27 fev 2023

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. Estratégia Nacional para Enfrentamento à Hanseníase 2024-2030 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Departamento de Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2024.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia Prático sobre a hanseníase. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017. 70 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf) > Acesso em: 03 Dez 2023

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii : diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. 2010. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniaese.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniaese.pdf) Acesso em: 08 abril 2023

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, v.1, 2022. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeuticas_hanseniose.pdf. Acesso em: 23 de agosto de 2023

BRUNS, David E. et al. **Tietz textbook of clinical chemistry and Molecular diagnostics**. Elsevier, 2012.

BUDDENBORG, S. K. et al. The stage- and sex-specific transcriptome of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Scientific Data**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2023.

BURKE, M. L. et al. **Immunopathogenesis of human schistosomiasis**. **Parasite Immunology**, abr. 2009.

CARAZO, A. et al. **Vitamin a update: Forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity**. **Nutrients** MDPI AG, , 1 maio 2021.

CARVALHO, Ana Paula Mendes et al. Testes sorológicos de antígenos específicos em hanseníase: implicações para a vigilância epidemiológica de casos de hanseníase e contatos domiciliares. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v. 112, p. 609-616, 2017.

CARVALHO, Gardênia Braz Figueiredo de et al. **Novos antígenos de *Schistosoma mansoni* para o diagnóstico sorológico da infecção ativa e controle de cura**. 2016. Tese de Doutorado.

CAVALCANTI, Ana Amélia Lucena et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 616-619, 2012.

COAD, J.; PEDLEY, K. **Iron deficiency and iron deficiency anemia in women**. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. **Anais...Informa Healthcare**, 2014.

COELHO, Paulo Marcos Zech et al. Improvement of POC-CCA interpretation by using lyophilization of urine from patients with *Schistosoma mansoni* low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004778, 2016.

CRESPO, Maria Júlia; GONÇALVES, Aguinaldo. Avaliação das possibilidades de controle da hanseníase a partir da poliquimioterapia. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 32, n. 1, p. 80-88, 2014.

D'AMBROSIO, D. N.; CLUGSTON, R. D.; BLANER, W. S. **Vitamin A metabolism: An update.** *Nutrients* MDPI AG, 2011.

DAVEY, TF A Organização Mundial da Saúde e a hanseníase. *Leprosy Review* , v. 48, n. 4, pág. 217-221, 1977.

DE CARVALHO, Roberta Gomes et al. Immunochromatographic POC-CCA Test for the diagnosis of intestinal schistosomiasis in a high endemic region in Brazil: Differences in the interpretation of results. *Acta Tropica*, v. 254, p. 107181, 2024.

DE FREITAS BEZERRA, Danielle et al. Diagnostic comparison of stool exam and point-of-care circulating cathodic antigen (POC-CCA) test for schistosomiasis mansoni diagnosis in a high endemicity area in northeastern Brazil. *Parasitology*, v. 148, n. 4, p. 420-426, 2021.

DE MACEDO, C. S. et al. **New insights into the pathogenesis of leprosy: Contribution of subversion of host cell metabolism to bacterial persistence, disease progression, and transmission.** *F1000Research* F1000 Research Ltd, 2020.

DE MORAIS SOUZA, Thais Daiane et al. Genogramas em comunidades afetadas pela hanseníase: Explorando aspectos sociais e fatores de risco em limeira de mantena-mg. *Revista Científica FACS*, v. 23, n. 2, p. 10-24, 2023.

DELOUGHERY, T. G. **Iron Deficiency Anemia.** *Medical Clinics of North America* W.B. Saunders, 1 mar. 2017.

DEMEURE, C. E. et al. **Resistance to Schistosoma mansoni in Humans: Influence of the IgE/IgG4 Balance and IgG2 in Immunity to Reinfection after Chemotherapy.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/>>.

DENNISON, C. L. et al. Mycobacterium leprae–helminth co-infections and vitamin D deficiency as potential risk factors for leprosy: A case–control study in south-eastern Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 105, p. 261–266, 1 abr. 2021.

DINIZ, L. M. et al. Presence of intestinal helminths decreases T helper type 1 responses in tuberculoid leprosy patients and may increase the risk for multi-bacillary leprosy. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 161, n. 1, p. 142–150, jul. 2010.

DINIZ, L. M. et al. Short report: Do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary leprosy? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 6, p. 852–854, 2001.

DINIZ, Lucia M. et al. Presence of intestinal helminths decreases T helper type 1 responses in tuberculoid leprosy patients and may increase the risk for multi-bacillary leprosy. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 161, n. 1, p. 142-150, 2010..

Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase. Nova Deli: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional do Sudeste Asiático; 2017.

DOS SANTOS, E. E. S. et al. Food and nutritional insecurity of families using the family health strategy in two municipalities in Paraíba, Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 25, n. 5, p. 1607–1617, 2020.

DUTHIE, Malcolm S. et al. Uso de antígenos proteicos para diagnóstico sorológico precoce da hanseníase. **Imunologia Clínica e Vacinal**, v. 14, n. 11, pág. 1400-1408, 2007.

DWIVEDI, V. P. et al. **Diet and nutrition: An important risk factor in leprosy. Microbial Pathogenesis** Academic Press, 1 dez. 2019.

ELSTROTT, B. et al. **The role of iron repletion in adult iron deficiency anemia and other diseases. European Journal of Haematology** Blackwell Publishing Ltd, 1 mar. 2020.

Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization; 2020.

FABRI, M. et al. Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 104, 12 out. 2011.

FAIRLEY, Jessica K. et al. The burden of helminth coinfections and micronutrient deficiencies in patients with and without leprosy reactions: a pilot study in Minas Gerais, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 5, p. 1058, 2019.

FALLON, P. G.; MANGAN, N. E. **Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. Nature Reviews Immunology**, mar. 2007.

FARIAS, M. N. et al. Estado nutricional de um paciente com hanseníase em um hospital de referência: relato de caso / Nutritional status of a leprosy patient in a referral hospital: case report. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 2007–2017, 31 jan. 2022.

FERREIRA, C. E. S. et al. Consensus – reference ranges of vitamin D [25(OH)D] from the Brazilian medical societies. Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC/ML) and Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM).

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 53, n. 6, p. 377–381, 1 nov. 2017.

FERREIRA, Fernanda Tavares. Sensibilidade e especificidade do teste rápido na urina (POC-CCA) e avaliação da morbidade da esquistossomose mansônica em região de baixa prevalência. 2016.

FOSS, Norma Tiraboschi. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 30, n. 3, p. 335-339, 1997.

FREITAS, Aline Araújo et al. Application of Mycobacterium Leprae-specific cellular and serological tests for the differential diagnosis of leprosy from confounding dermatoses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 163-168, 2016.

FROES JUNIOR, Luis Alberto Ribeiro; SOTTO, Mirian Nacagami; TRINDADE, Maria Angela Bianconcini. Hanseníase: características clínicas e imunopatológicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 3, p. 338-347, 2022.

GAETANO, C.; MASSIMO, L.; ALBERTO, M. **Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. Haematologica**, nov. 2010.

GAMBLE, Mary V. et al. Retinol binding protein as a surrogate measure for serum retinol: studies in vitamin A-deficient children from the Republic of the Marshall Islands. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 3, p. 594-601, 2001.

GOBBO, Angélica Rita et al. NDO-BSA, LID-1, and NDO-LID antibody responses for infection and RLEP by quantitative PCR as a confirmatory test for early leprosy diagnosis. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, p. 850886, 2022.

GOMBART, A. F.; PIERRE, A.; MAGGINI, S. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2020.

GOULART, Isabela Maria Bernardes; PENNA, Gerson Oliveira; CUNHA, Gabriel. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 363-375, 2002.

GRANT, Frederick KE et al. Correcting for inflammation changes estimates of iron deficiency among rural Kenyan preschool children. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 1, p. 105-111, 2012.

GRAY, Christian P. et al. Immunosuppressive effects of melanoma-derived heavy-chain ferritin are dependent on stimulation of IL-10 production. **International journal of cancer**, v. 92, n. 6, p. 843-850, 2001.

GREEN, A. S.; FASCETTI, A. J. Meeting the Vitamin A Requirement: The Efficacy and Importance of β -Carotene in Animal Species. **Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

GROSSI DE OLIVEIRA, A. L. et al. Hypovitaminosis D and reduced cathelicidin are strongly correlated during the multidrug therapy against leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, 1 out. 2020.

GROTTO, H. Z. W. **Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2010.

GUO, Yanxia et al. A retinoic acid—rich tumor microenvironment provides clonal survival cues for tumor-specific CD8+ T cells. **Cancer research**, v. 72, n. 20, p. 5230-5239, 2012.

HAGGE, D. A. et al. Opening a Can of Worms: Leprosy Reactions and Complicit Soil-Transmitted Helminths. **EBioMedicine**, v. 23, p. 119–124, 1 set. 2017.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The Schistosoma granuloma: Friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. APR, 2013.

HARGRAVE, J.; WALLACE, T.; LUSH, D. Guidelines for the Control of Leprosy in the Northern Territory. 2010.

HARRISON, E. H. **Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, jan. 2012.

HART, P. H.; GORMAN, S.; FINLAY-JONES, J. J. **Modulation of the immune system by UV radiation: More than just the effects of vitamin D? Nature Reviews Immunology**, set. 2011.

HASCHKA, D.; HOFFMANN, A.; WEISS, G. **Iron in immune cell function and host defense. Seminars in Cell and Developmental Biology** Elsevier Ltd, , 1 jul. 2021.

HIEMSTRA, Ida H. et al. The identification and developmental requirements of colonic CD 169+ macrophages. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 269-278, 2014.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. **IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis**The

Journal of Immunology. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/164/12/6406/1114041/6406.pdf>>.

HUNTER, Shirley W.; BRENNAN, Patrick J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728-735, 1981.

IDOS SANTOS, R. N. et al. Reasons to avoid vitamin D deficiency during COVID-19 pandemic. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 5, p. 498–506, 1 set. 2020.

IWATA, M.; ESHIMA, Y.; KAGECHIKA, H. **Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors**. **International Immunology**, 1 ago. 2003.

JASSIM, A.; HASSAN, K.; CATTY, D. **Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni** **Parasite Immunology**. [s.l: s.n.].

JEON, S. M.; SHIN, E. A. **Exploring vitamin D metabolism and function in cancer**. **Experimental and Molecular Medicine** Nature Publishing Group, , 1 abr. 2018.

JI, R. et al. An ELISA based on soluble egg antigens for the serodiagnosis of animal schistosomiasis turkestanica. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2020.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. **Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D**. **Journal of Lipid Research** American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2014.

KELLY, M. E. et al. The Biochemical Basis of Vitamin A Production from the Asymmetric Carotenoid β -Cryptoxanthin. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 8, p. 2121–2129, 17 ago. 2018b.

KERNAN, K. F.; CARCILLO, J. A. Hyperferritinemia and inflammation. **International Immunology**, v. 29, n. 9, p. 401–409, 1 nov. 2017.

KEWCHAROENWONG, C. et al. Vitamin D3 regulates PM-driven primary human neutrophil inflammatory responses. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 15850, 22 set. 2023.

KIM, E. W. et al. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, 2 jul. 2018.

KIM, Elliot W. et al. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. **PLOS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006608, 2018.

KLEBANOFF, Christopher A. et al. Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC–derived splenic and intestinal dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 10, p. 1961-1976, 2013.

LAPINSKY, S. E. et al. Anaemia, iron-related measurements and erythropoietin levels in untreated patients with active leprosy. **Journal of internal medicine**, v. 232, n. 3, p. 273-278, 1992.

LASTÓRIA, J. C.; DE ABREU, M. A. M. M. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.

LEVANTEZI, M.; SHIMIZU, H. E.; GARRAFA, V. Princípio da não discriminação e não estigmatização: reflexões sobre hanseníase. **Revista Bioética**, v. 28, n. 1, p. 17–23, mar. 2020.

LIMA, Emerson S. et al. Vitamin A and lipid peroxidation in patients with different forms of leprosy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 211-214, 2007.

LIN, R.; WHITE, J. H. **The pleiotropic actions of vitamin D**. **BioEssays**, jan. 2004.

LINDHOLZ, Catieli Gobetti et al. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006274, 2018.

LIU, Philip T. et al. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. **The journal of immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060-2063, 2007.

LIU, Philip T. et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D–dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nature medicine**, v. 18, n. 2, p. 267-273, 2012.

LOVETT-RACKE, A. E.; RACKE, M. K. **Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.academicpress.com>.

MAGGINI, S.; PIERRE, A.; CALDER, P. C. **Immune function and micronutrient requirements change over the life course**. **Nutrients**MDPI AG, , 17 out. 2018.

MAHROUM, N. et al. **Ferritin – from iron, through inflammation and autoimmunity, to COVID-19.** *Journal of Autoimmunity* Academic Press, , 1 jan. 2022.

MANDAL, D. et al. Vitamin D receptor expression levels determine the severity and complexity of disease progression among leprosy reaction patients. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 35–39, 1 jul. 2015.

MARTENS, P. J. et al. **Vitamin d's effect on immune function.** *Nutrients* MDPI AG, , 1 maio 2020.

MARTINEZ, Edson Zangiacomi; LOUZADA-NETO, Francisco; PEREIRA, Basílio de Bragança. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cad. saúde coletiva.** Rio de Janeiro, p. 7-31, 2003.

MATZNER, M. et al. Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 56–59, jan. 2011.

MAYMONE, Mayra BC et al. Leprosy: Treatment and management of complications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 83, n. 1, p. 17-30, 2020.

MCCULLOUGH, F. S. W.; NORTHROP-CLEWES, C. A.; THURNHAM, David I. The effect of vitamin A on epithelial integrity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 2, p. 289-293, 1999.

MENDONÇA, Vanessa Amaral et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 343-350, 2008.

MISCH, E. A., et. al.; Leprosy and the Human Genome; **Microbiology and Molecular Biology**; v. 74, n. 4, p. 589-620; 2010.

MODLIN, R. L. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2002.

MONTEIRO, L. D. et al. Social Determinants Of Leprosy In A Hyperendemic State In North Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 51, 2017.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Association of Schistosoma mansoni-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 4 fev. 2014.

NIKAWA, T. et al. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients Vitamin A Prevents the Decline in Immunoglobulin A and Th2 Cytokine Levels in Small Intestinal Mucosa of Protein-Malnourished Mice 1.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/129/5/934/4721906>>.

OKOYO, C. et al. Comparing the performance of circulating cathodic antigen and Kato-Katz techniques in evaluating *Schistosoma mansoni* infection in areas with low prevalence in selected counties of Kenya: A cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, 11 abr. 2018.

OKTARIA, S. et al. Dietary diversity and poverty as risk factors for leprosy in Indonesia: A case-control study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, 13 mar. 2018

OLIVEIRA, S. C. et al. **A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases.** **Mucosal Immunology**Nature Publishing Group, , 1 nov. 2016.

OLIVEIRA, W. J. et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, 22 fev. 2018.

ORINO, K.; WATANABE, K. **Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin.** **Veterinary Journal**, nov. 2008.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. **The immunobiology of schistosomiasis.** **Nature Reviews Immunology**European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2002.

PHILLIPS, D. A. et al. A tale of two neglected tropical infections: Using GIS to assess the spatial and temporal overlap of schistosomiasis and leprosy in a region of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 275–280, 1 abr. 2017.

PHILLIPS, David Alexander et al. A tale of two neglected tropical infections: using GIS to assess the spatial and temporal overlap of schistosomiasis and leprosy in a region of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 275-280, 2017.

PLUDOWSKI, Pawel et al. Clinical practice in the prevention, diagnosis and treatment of vitamin D deficiency: a central and eastern European expert consensus statement. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1483, 2022.

POP, T. L. et al. **The Role of Vitamin D and Vitamin D Binding Protein in Chronic Liver Diseases.** **International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 set. 2022.

RAO, K. N.; SAHA, KUNAL. Undernutrition and lepromatous leprosy. Serum vitamin A and E levels in leprosy spectrum. **Indian journal of leprosy**, v. 60, n. 1, p. 66-70, 1988.

RAO, K. N.; SAHA, KUNAL. Undernutrition and lepromatous leprosy. Serum vitamin A and E levels in leprosy spectrum. **Indian journal of leprosy**, v. 60, n. 1, p. 66-70, 1988.

REECE, Stephen T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 3, p. 333-340, 2006.

RESENDE CO, T. et al. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, n. 1, p. 45–52, jan. 2007.

Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.* 1962;33:119-128.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. **Int j lepr other mycobact dis**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

ROSA, P. S. et al. **The effect of iron supplementation in the diet of *Dasypus novemcinctus* (Linnaeus, 1758) armadillos in captivity***Braz. J. Biol.* [s.l: s.n.].

ROSÁRIO, C. et al. The Hyperferritinemic Syndrome: Macrophage activation syndrome, Still's disease, septic shock and catastrophic antiphospholipid syndrome. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, 22 ago. 2013.

SALAROLI, Robson et al. Incidência de novos casos de hanseníase na região Sudeste (2018-2023): Um estudo ecológico. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 4, p. 1752-1765, 2024.

SCHWEIGERT, F. et al. **THE MAJORITY OF VITAMIN A IS TRANSPORTED AS RETINYL ESTERS IN THE BLOOD OF MOST CARNIVORES***Biochem. Phy~iol.* [s.l: s.n.].

SCOLLARD, D. M. et al. Increased CXC ligand 10 levels and gene expression in type 1 leprosy reactions. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 18, n. 6, p. 947–953, 2011.

SCOLLARD, D. M.; JOYCE, M. P.; GILLIS, T. P. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 43, n. 2, p. e19-22, 15 jul. 2006.

SHARIF, K. et al. Eppur Si Muove: ferritin is essential in modulating inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 191, n. 2, p. 149-150, 2018.

SHER, Ruben et al. Serum trace elements and vitamin A in leprosy subtypes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 9, p. 1918-1924, 1981.

SILVEIRA, A. M. S. et al. Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose Schistosoma mansoni in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, 11 jan. 2016.

SILVEIRA, Alda Maria Soares et al. Evaluation of the CCA immuno-chromatographic test to diagnose Schistosoma mansoni in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004357, 2016.

SOUZA, Cacilda Silva. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 30, n. 3, p. 325-334, 1997.

SOUZA, Carlos Dornels Freire de et al. Modelagem espacial da hanseníase no estado da Bahia, Brasil,(2001-2015) e determinantes sociais da saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 8, p. 2915-2926, 2020.

SOUZA, Vânia Nieto Brito de et al. Increased hepcidin expression in multibacillary leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 183-189, 2012.

TELES, Stéfanie Ferreira et al. Association between NDO-LID and PGL-1 for leprosy and class I and II human leukocyte antigen alleles in an indigenous community in Southwest Amazon. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 296-303, 2020.

TIMONEDA, J. et al. **Vitamin A deficiency and the lung**. **Nutrients**MDPI AG, , 1 set. 2018.

VÁZQUEZ, C. M. P. et al. **Micronutrientes que influyen en la respuesta inmune en la lepra**. **Nutricion Hospitalaria**, 2014.

WANG, Joseph L. et al. Retinoic acid stimulates early cellular proliferation in the adapting remnant rat small intestine after partial resection. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 7, p. 1297-1303, 1997.

WANG, W. et al. **Serum ferritin: Past, present and future**. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, ago. 2010.

WEST, A. R.; OATES, P. S. **Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies**. **World Journal of Gastroenterology**Baishideng Publishing Group Co, , 2008.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. **Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function.** *Annals of Nutrition and Metabolism*, set. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030: Rumo à zero hanseníase; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290228509>. Acesso em: 15 fev 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Expert Committee on Leprosy. Sixth Report.** WHO Technical Report Series; 1988. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37409/1/WHO_TRS_768.pdf. Acesso em: 23 de outubro 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274127> . Acesso em: 24 fev 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bench Aids for Diagnosis of intestinal parasites. 1994. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37323/1/9789241544764_eng.pdf?ua=1. Acesso em 05 de abril 2024

ZENG, J. et al. A serum Vitamin D level <25nmol/L pose high tuberculosis risk:A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 4 maio 2015.

ZENG, Ruizhu et al. Generation and transcriptional programming of intestinal dendritic cells: essential role of retinoic acid. **Mucosal immunology**, v. 9, n. 1, p. 183-193, 2016.