

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

**Kyssia Karen de Paiva e Silva**

**ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS COMO BIOMARCADORES  
DE RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE**

**Dissertação**

Juiz de Fora  
2019

**KYSSIA KAREN DE PAIVA E SILVA**

**ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS COMO BIOMARCADORES  
DE RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira**

Juiz de Fora

2019

# FOLHA DE APROVAÇÃO

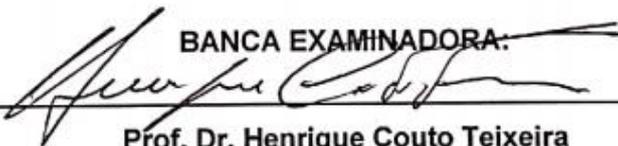
**KYSSIA KAREN DE PAIVA E SILVA**

**ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS COMO BIOMARCADORES DE  
RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 13/03/2019.

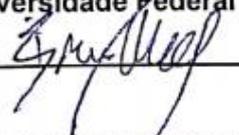
**BANCA EXAMINADORA:**



**Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira**

**Orientador**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



**Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



**Dr.ª Wanessa Araújo Carvalho**

**Embrapa – Juiz de Fora**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Suely e Carlinhos, que sempre estiveram ao meu lado e jamais mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos e sempre cuidar de tudo. Pelos momentos felizes desta caminhada e também pelas horas mais difíceis, que certamente foram fundamentais para meu crescimento e amadurecimento. Obrigada por toda força e proteção!

Aos meus pais, Suely e Carlinhos, que sempre se dedicaram à minha formação e de minha irmã, obrigada por todo amor, incentivo e confiança. Vocês são meus maiores exemplos de seres humanos e profissionais.

À minha irmã Kívea pelo amor, apoio e por dividir comigo todos os momentos, vibrando a cada conquista.

Ao meu noivo e grande companheiro João Paulo pelo amor, compreensão, força e, principalmente, por ser uma das pessoas que mais acreditou em mim. Obrigada por tudo que estamos construindo juntos.

Aos meus avós, tios(as) e primos(as) por sempre torcerem por mim, com carinho e alegrias constantes.

Ao meu orientador professor Dr. Henrique Couto Teixeira pela oportunidade, disponibilidade em me orientar e pelos ensinamentos ao longo desses dois anos.

De maneira especial, às minhas queridas amigas e grandes companheiras de experimentos, Ingrid e Laura. Não tenho palavras para agradecer toda paciência, ensinamentos e ajuda. Vocês tornaram meus dias mais leves e a pesquisa menos árdua. Obrigada!

Às alunas de iniciação científica, Leslie e Lavínia, pela contribuição nos experimentos.

Aos professores da Imuno, Ana Paula, Gilson, Jacy, Juciane e seus grupos de pesquisa. Particularmente à Flávia, Erick, Luan, Marina, Marcilene e Viviane, com os quais tive mais tempo de convivência, podendo compartilhar valiosas experiências e dar boas risadas.

Às funcionárias Leidiana e Sirlei, que sempre zelaram pela organização e bom funcionamento do nosso laboratório, cuidando de tudo com tanto carinho e dedicação.

A todos os colegas da pós-graduação, que dividiram comigo todas as angústias das disciplinas com seus incansáveis artigos, seminários e projetos.

A todos os meus amigos pelo carinho e por sempre torcerem por mim! De forma especial agradeço àquelas que, vivendo circunstâncias semelhantes às minhas, sempre estiveram dispostas a me ouvir e aconselhar: Rafa, Laís, Taís, Danily, Márcia, Bruna e Mari.

Ao Dr. Malcolm S. Duthie do Infectious Disease Research Institute (IDRI) por fornecer os antígenos utilizados neste estudo. Também às Dras. Euzenir Nunes Sarno e Roberta Olmo Pinheiro do Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ/RJ) pela concessão das amostras estudadas.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo ensino gratuito e de qualidade, além dos suportes físico e tecnológico necessários para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, indispensável para o desenvolvimento de qualquer pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão de mais esta importante etapa. Meu muito obrigada!

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja  
toda a escada. Apenas dê o  
primeiro passo.”*

*(Martin Luther King)*

## RESUMO

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica que, embora curável, ainda carrega grande preconceito e estigma. É causada pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae* e afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, resultando em comprometimento sensorial e motor, com deformidades características e incapacidades. Em 2017, o Brasil registrou 26.875 casos novos da doença (12,8% do total global), fato que o mantém como o segundo país em número absoluto de casos, perdendo apenas para a Índia. O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, mas testes sorológicos podem contribuir para sua detecção precoce e auxiliar na classificação das formas da doença. Neste trabalho avaliamos o perfil da resposta imune humoral de pacientes com as formas paucibacilar e multibacilar da hanseníase e seus contatos domiciliares, utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE, com reatividade frente aos antígenos recombinantes NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID. Adicionalmente, foi analisado o efeito da quimioprofilaxia com dose única de rifampicina sobre os níveis séricos de anticorpos IgA anti-NDO-HSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em contatos domiciliares de casos com hanseníase multibacilar. Os resultados mostram que pacientes com a forma multibacilar apresentam aumento dos níveis séricos de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA contra os três antígenos testados, quando comparados aos pacientes paucibacilares e aos controles sadios. Ao contrário, as respostas de IgE contra NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID foram bastante reduzidas mesmo utilizando menor diluição dos soros e maior concentração dos antígenos. A reatividade de anticorpos IgM foi maior frente aos antígenos NDO-HSA e NDO-LID, enquanto que a reatividade de anticorpos IgG foi maior frente aos antígenos LID-1 e NDO-LID. Níveis séricos elevados de anticorpos IgA contra os três antígenos testados foram detectados em cerca de 72 a 100% dos pacientes multibacilares, havendo também significativa reatividade dos pacientes paucibacilares (63%) frente ao antígeno NDO-HSA. A análise das curvas ROC confirmou o bom desempenho dos antígenos no diagnóstico da hanseníase multibacilar, havendo melhor performance dos testes IgG anti-NDO-LID e IgA anti-NDO-HSA. Os testes ELISA IgM, ELISA-IgG e ELISA-IgA utilizados não foram capazes de diferenciar contatos domiciliares de pacientes multibacilares em comparação aos contatos de casos paucibacilares ou em comparação aos controles sadios de área endêmica, apesar de ter sido notada uma tendência de aumento da reatividade de IgA anti-NDO-HSA no grupo CMB. A quimioprofilaxia com dose única de rifampicina reduziu de forma discreta os títulos de anticorpos IgA anti-NDO-HSA em contatos de pacientes multibacilares. Os resultados confirmam o bom desempenho dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID no sorodiagnóstico da hanseníase, e sugerem que a pesquisa de IgA frente ao análogo sintético NDO-HSA pode ser uma ferramenta adicional no diagnóstico de formas clínicas da doença. A aplicação de testes sorológicos envolvendo pesquisa de IgA anti-NDO-HSA no acompanhamento de contatos domiciliares com suspeita de infecção subclínica e que receberam tratamento profilático com rifampicina merece futuras investigações.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. Antígenos recombinantes. Sorodiagnóstico.

## ABSTRACT

Leprosy is a chronic granulomatous disease that, although curable, still carries great prejudice and stigma. It's caused by the intracellular bacillus *Mycobacterium leprae* and mainly affects the skin and peripheral nerves, resulting in sensory and motor impairment, with characteristic deformities and disabilities. In 2017, Brazil registered 26,875 new cases of the disease (12.8% of the world total), a fact that keeps it as the second country in absolute numbers, losing only to India. The diagnosis of leprosy is essentially clinical, but serological tests can contribute to its early detection and help in the classification of the diseases forms. In this work we evaluated the humoral immune response profile of patients with paucibacillary and multibacillary leprosy forms and their household contacts, using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM, IgG, IgA and IgE antibodies, reactive against recombinant antigens NDO-HSA, LID-1 and NDO-LID. Additionally, the effect of single dose rifampicin chemoprophylaxis on serum levels of anti-NDO-HSA, anti-LID-1 and anti-NDO-LID IgA antibodies in domiciliary contacts of multibacillary leprosy cases was analyzed. The results show that patients with the multibacillary form present increased levels of IgM, IgG and IgA antibodies against the three antigens tested, when compared to paucibacillary patients and healthy controls. In contrast, IgE responses to NDO-HSA, LID-1 and NDO-LID were greatly reduced even with lower serum dilution and higher antigen concentration. The reactivity of IgM antibodies was higher against NDO-HSA and NDO-LID antigens, whereas reactivity of IgG antibodies was higher against LID-1 and NDO-LID antigens. Elevated serum levels of IgA antibodies against the three antigens tested were detected in about 72 to 100% of multibacillary patients. There was also a significant reactivity of paucibacillary patients (63%) to NDO-HSA antigen. Analysis of the ROC curves confirmed the good performance of the antigens in the diagnosis of multibacillary leprosy, with a better performance of anti-NDO-LID IgG and anti-NDO-HSA IgA. The ELISA-IgM, ELISA-IgG and ELISA-IgA ELISA tests weren't able to differentiate household contacts of multibacillary patients, compared to the contacts of paucibacillary cases or in comparison with the healthy controls of the endemic area, despite a tendency to increase of anti-NDO-HSA IgA reactivity in the CMB group. Single dose rifampicin chemoprophylaxis reduced discrete anti-NDO-HSA IgA antibody titers in multibacillary patient contacts. The results confirm the good performance of the NDO-HSA, LID-1 and NDO-LID antigens in leprosy serodiagnosis, and suggest that the search for IgA against the synthetic analogue NDO-HSA may be an additional tool in the diagnosis of clinical forms of the disease . The application of serological tests involving anti-NDO-HSA IgA screening in the follow-up of household contacts suspected of subclinical infection and who received prophylactic treatment with rifampicin deserves further investigation.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Recombinant antigens. Serodiagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Modelo esquemático da parede celular de <i>M. leprae</i> .....	19
<b>Figura 2</b> – Estruturas moleculares dos glicolipídeos fenólicos de <i>M. leprae</i> (PGL-1), <i>M. tuberculosis</i> (PGL-tb) e <i>M. bovis</i> (PGL-bovis).....	20
<b>Figura 3</b> – Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase em 2017.....	22
<b>Figura 4</b> – O espectro da hanseníase – classificação de Ridley & Jopling e sua relação com a imunidade do hospedeiro.....	25
<b>Figura 5</b> – Paradigma imune Th1/Th2 nas formas polares da hanseníase.....	32
<b>Figura 6</b> – Possíveis redes de integração e novos paradigmas imunes da resposta de linfócitos T na hanseníase.....	33
<b>Figura 7</b> – Fluxograma da avaliação dos efeitos da quimioprofilaxia com dose única de rifampicina sobre os níveis séricos de IgA em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar.....	49
<b>Figura 8</b> – Níveis séricos de anticorpos IgM contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em casos de hanseníase multibacilar (MB), casos de hanseníase paucibacilar (PB) e controles sadios (CT).....	54
<b>Figura 9</b> – Níveis séricos de anticorpos IgG contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em casos de hanseníase multibacilar (MB), casos de hanseníase paucibacilar (PB) e controles sadios (CT).....	55
<b>Figura 10</b> – Níveis séricos de anticorpos IgA contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em casos de hanseníase multibacilar (MB), casos de hanseníase paucibacilar (PB) e controles sadios (CT).....	56
<b>Figura 11</b> – Níveis séricos de anticorpos IgE contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em casos de hanseníase multibacilar (MB), casos de hanseníase paucibacilar (PB) e controles sadios (CT).....	57
<b>Figura 12</b> – Curvas ROC para as respostas de IgA sérica em pacientes multibacilares frente aos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID.....	59
<b>Figura 13</b> – Curvas ROC para as respostas de IgA sérica em pacientes paucibacilares frente aos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID.....	60
<b>Figura 14</b> – Níveis séricos de anticorpos IgM, IgG e IgA contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em contatos domiciliares de casos multibacilares (CMB),	

contatos domiciliares de casos paucibacilares (CPB), controles sadios endêmicos (CE) e controles sadios não endêmicos (CNE).....62

**Figura 15** – Níveis séricos de anticorpos IgA com reatividade específica para os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar, antes e após o tratamento quimioprolático com rifampicina em dose única ou placebo.....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificações adotadas para as formas clínicas da hanseníase.....	26
<b>Tabela 2</b> – Grupos envolvidos nas primeiras análises do estudo.....	47
<b>Tabela 3</b> – Forma clínica segundo classificação de Ridley & Jopling e índice baciloscópico dos casos com hanseníase multibacilar.....	48
<b>Tabela 4</b> – Sensibilidade e especificidade dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID no diagnóstico da hanseníase multibacilar, usando o método de ELISA isotipo-específico.....	59
<b>Tabela 5</b> – Sensibilidade e especificidade dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID na detecção de anticorpos IgA específicos na hanseníase paucibacilar.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área Sob a Curva
BAAR	Bacilo Álcool-ácido Resistente
BB	<i>Borderline-Borderline</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BL	<i>Borderline-Lepromatoso(a)</i>
Breg	Linfócito B Regulatório
BT	<i>Borderline-Tuberculoide</i>
CD	“Cluster of Differentiation” – Grupamento de Diferenciação
CD40-L	Ligante de CD40
CE	Controle Endêmico
CMB	Contato Domiciliar de Paciente Multibacilar
CNE	Controle Não Endêmico
COLEP	“ <i>Contact Leprosy Patient</i> ” – Contato de Paciente com Hanseníase
CPB	Contato Domiciliar de Paciente Paucibacilar
CR	“Complement Receptor” – Receptor de Complemento
CT	Grupo Controle
CTLA	“Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen” – Antígeno Citotóxico Associado ao Linfócito T
DC	“Dendritic Cell” – Célula Dendrítica
DO	Densidade Ótica
ELISA	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GM-CSF	“Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor” – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
IB	Índice Baciloscópico ou Índice Bacteriano
IC	Intervalo de Confiança

IDRI	“Infectious Disease Research Institute”
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Imunidade Mediada por Células
Kg	Quilograma
LAM	Lipoarabinomana
LID-1	“Leprosy IDRI Diagnostic-1” – Proteína de Diagnóstico da Hanseníase 1
LL	Lepromatoso(a)-Lepromatoso(a)
LM	Lipomanana
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. lepromatosis</i>	<i>Mycobacterium lepromatosis</i>
MB	Multibacilar
mg	Miligrama
MHC	“Major Histocompatibility Complex” – Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
NDO-HSA	“Natural disaccharide Octyl Linked to Human Serum Albumin” – Dissacarídeo Natural Ligado à Albumina Humana via Octil
NDO-LID	“Natural Disaccharide Octyl - Leprosy IDRI Diagnostic 1” – Dissacarídeo Natural Ligado à Proteína de Diagnóstico da Hanseníase 1 via Octil
NK	“Natural Killer Cell” – Célula Assassina Natural
NKT	“Natural Killer T Cell” – Célula T Assassina Natural
NLR	“NOD-Like Receptor” – Receptor Tipo NOD
NO	Óxido Nítrico
NOD	“Nucleotide-binding and Oligomerization Domain” – Domínio de Ligação e Oligomerização de Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenilenodiamina
PAMP	“Pathogen-associated Molecular Pattern” – Padrão Molecular Associado a Patógenos
PB	Paucibacilar

PBMC	“Peripheral Blood Mononuclear Cells” – Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PD-1	“Programmed Cell Death 1” – Receptor de Morte Celular Programada 1
PD-L1	“Programmed Death-ligand 1” – Ligante de Morte Celular Programada 1
PEP	Profilaxia Pós-Exposição
PGE2	Prostaglandina E2
PGL-1	Glicolípídeo Fenólico 1
PIMs	Manosídeos de fosfatidilinositol
PQT	Poliqumioterapia
PRR	“Pattern Recognition Receptor” – Receptor de Reconhecimento de Padrão
RNA	“Ribonucleic Acid” – Ácido Ribonucleico
ROC	“Receiver Operating Characteristic Curve” – Curva ROC
RR	Reação Reversa
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
TB	Tuberculose
TGF- $\beta$	“Transforming Growth Factor Beta” – Fator Transformador de Crescimento Beta
Th	Linfócito T <i>Helper</i>
TLR	“Toll-Like Receptor” – Receptor Tipo Toll
TNF- $\alpha$	“Tumor Necrosis Factor Alpha” – Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Linfócito T Regulatório
TT	Tuberculoide-Tuberculoide

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 HANSENÍASE E SEU AGENTE ETIOLÓGICO .....	18
1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO .....	21
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS .....	24
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO.....	29
1.4.1 Imunidade Inata na hanseníase .....	29
1.4.2 Imunidade celular na hanseníase .....	31
1.4.3 Células B e imunidade humoral na hanseníase .....	35
1.5 DIAGNÓSTICO .....	37
1.5.1 Antígenos aplicados no sorodiagnóstico da hanseníase .....	39
1.6 TRATAMENTO .....	41
2 OBJETIVOS.....	45
2.1 OBJETIVO GERAL .....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	46
3.1 AMOSTRAS .....	46
3.2 ASPECTOS ÉTICOS .....	49
3.3 ANTÍGENOS .....	50
3.4 DETECÇÃO DE ANTICORPOS .....	50
3.5 CURVA ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVE).....	51
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	52
4 RESULTADOS.....	53
4.1 ANTICORPOS IgM, IgG, IgA E IgE COM REATIVIDADE FRENTE A ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> SÃO DETECTADOS EM SOROS DE PACIENTES COM HANSENÍASE.....	53
4.1.1 Anticorpos IgM reagem preferencialmente contra os antígenos NDO-HSA e NDO-LID, estando aumentados em pacientes com hanseníase multibacilar.....	53
4.1.2 Anticorpos IgG reagem preferencialmente contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, estando aumentados em pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar.....	54

4.1.3 Elevada reatividade de anticorpos IgA contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID é detectada em pacientes com hanseníase multibacilar.....	55
4.1.4 Reduzidos níveis séricos de anticorpos IgE contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID são detectados em pacientes com hanseníase multibacilar. ....	56
4.2 PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS DOS TESTES ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA OS ANTÍGENOS NDO-HSA, LID-1 E NDO-LID DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> .....	57
4.2.1 Avaliação da sensibilidade, especificidade e ASC dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico da hanseníase multibacilar.....	58
4.2.2 Avaliação da sensibilidade, especificidade e ASC do teste ELISA-IgA envolvendo os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico da hanseníase paucibacilar. ....	60
4.3 REATIVIDADE SOROLÓGICA DE TESTES ELISA EMPREGANDO OS ANTÍGENOS NDO-HSA, LID-1 E NDO-LID PARA DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM CONTATOS DOMICILIARES DE PACIENTES E CONTROLES SADIOS. ....	61
4.4 A QUIMIOPROFILAXIA COM DOSE ÚNICA DE RIFAMPICINA LEVA À DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IgA ANTI-NDO-HSA EM CONTATOS DOMICILIARES DE PACIENTES COM HANSENÍASE MULTIBACILAR. ....	63
5 DISCUSSÃO .....	65
6. CONCLUSÕES .....	74
REFERÊNCIAS .....	75
ANEXO A – PARACER COMITÊ DE ÉTICA.....	87

# 1 INTRODUÇÃO

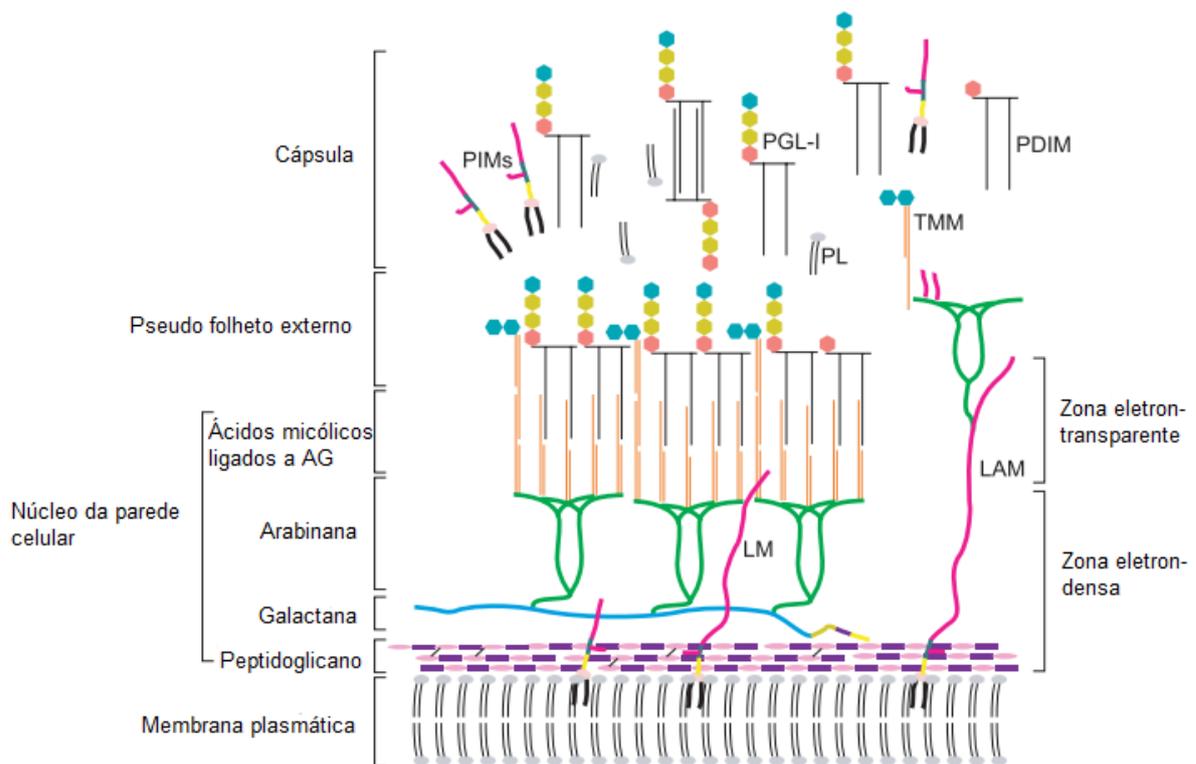
## 1.1 HANSENÍASE E SEU AGENTE ETIOLÓGICO

A hanseníase, ou Doença de Hansen, é uma infecção granulomatosa crônica causada pela bactéria intracelular obrigatória *Mycobacterium leprae* (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Apesar dos relatos milenares sobre a patologia, *M. leprae* só foi descoberto em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen, na Noruega, sendo o primeiro patógeno bacteriano associado a uma doença humana (MODLIN, 1994; SINGH e COLE, 2011). Em 2008 foi identificada uma nova espécie micobacteriana denominada *Mycobacterium lepromatosis*, causadora de uma forma específica da hanseníase conhecida como hanseníase lepromatosa difusa (HAN et al, 2008). Enquanto o *M. leprae* está relacionado à maioria dos casos de hanseníase e é prevalente em todo o mundo, *M. lepromatosis* ocorre principalmente no México e no Caribe (HAN et al 2008; HONAP et al, 2018).

*M. leprae* pertence à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, da qual o gênero *Mycobacterium* é o único representante (OPROMOLLA e BAPTISTA, 2000). Apresenta-se como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), reto ou levemente encurvado, com 2 a 8 µm de comprimento, não formador de esporos, imóvel, microaerófilo e que possui tropismo para macrófagos e células de Schwann dos nervos periféricos (OPROMOLLA e BAPTISTA, 2000; VISSA e BRENNAN, 2001; BRITTON e LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD et al, 2006). Por não ser cultivável em meios artificiais, as únicas fontes de *M. leprae* são lesões humanas com alta carga bacilar ou modelos experimentais de infecção no coxim plantar de camundongos atímicos e infecções subcutânea e/ou intravenosa em tatus (OPROMOLLA, ARRUDA e FLEURY, 1980; SCOLLARD et al, 2006).

A parede celular das micobactérias é peculiar, consistindo de uma matriz altamente complexa de lipídeos, glicolipídeos, proteínas e polissacarídeos (BRENNAN e NIKAIDO, 1995). Embora a composição possa variar entre as espécies micobacterianas, a arquitetura básica deste invólucro é a mesma para

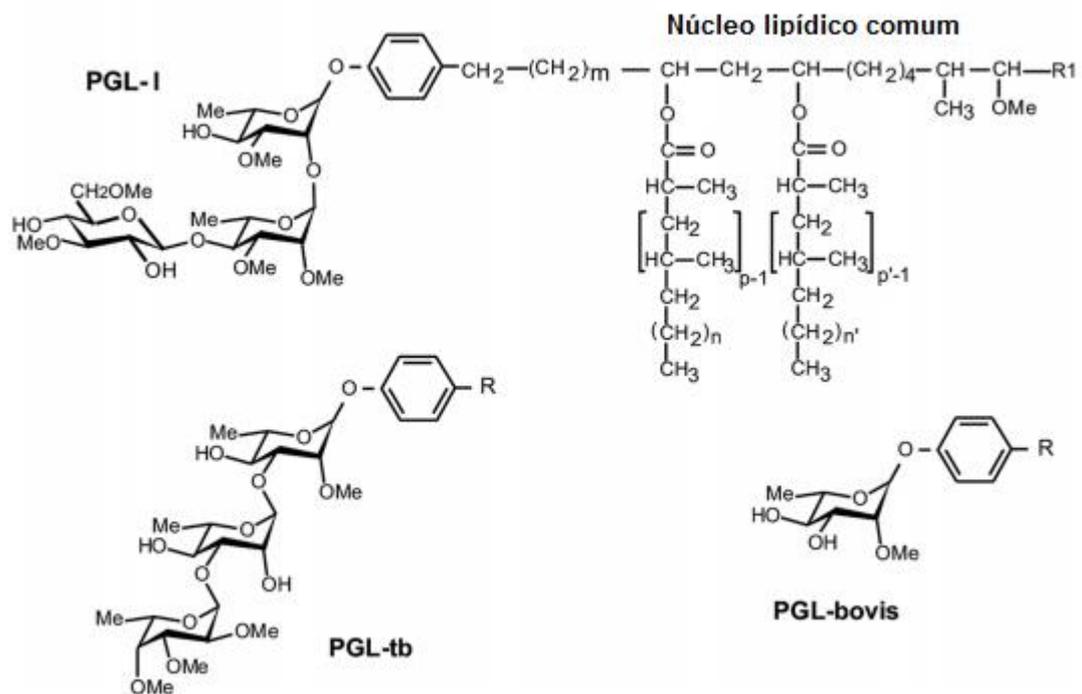
todas as representantes do gênero: uma camada interna rígida (logo após a membrana plasmática) formada de peptidoglicano e arabinogalactana, ligada a uma camada intermediária espessa de ácidos micólicos e uma camada externa composta por vários lipoglicanos, polissacarídeos livres, glicolipídeos e fosfolipídeos (VISSA e BRENNAN, 2001). Macromoléculas manosiladas como lipoarabinomana (LAM), lipomanana (LM) e manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs) também estão presentes em abundância, além do fator corda (dimicolato de trealose), sulfolipídeos e proteínas associadas a este arranjo físico típico (BRENNAN e NIKAIDO, 1995; VISSA e BRENNAN, 2001) (Figura 1).



**Figura 1:** Modelo esquemático da parede celular de *M. leprae*. AG – arabinogalactana; LAM – lipoarabinomana; LM – lipomanana; PDIM – dimicocerosato de fitiocerol ; PGL-1 – glicolipídeo fenólico 1; PIM – manosídeo de fosfatidilinositol; TMM – monomicolato de trealose; PL – fosfolipídeo. Fonte: adaptado de VISSA e BRENNAN, 2001.

O envoltório micobacteriano contém alvos importantes da resposta imune do hospedeiro, incluindo o glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1), a lipoarabinomana (LAM) e algumas proteínas envolvidas em sua síntese (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). PGL-1 é o lipídeo dominante da parede celular de *M. leprae* e a composição

única de seu trissacarídeo confere imunogenicidade e patogenicidade ao bacilo (HUNTER e BRENNAN, 1981) (Figura 2). O PGL-1 também pode reagir com compostos de radicais livres, sugerindo que este lipídeo capsular pode proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a infecção, garantindo sua sobrevivência intracelular (OPROMOLLA e BAPTISTA, 2000).



**Figura 2:** Estruturas moleculares dos glicolipídeos fenólicos de *M. leprae* (PGL-1), *M. tuberculosis* (PGL-tb) e *M. bovis* (PGL-bovis). R = núcleo lipídico comum. Fonte: adaptado de DÍAZ ACOSTA et al, 2018.

O sequenciamento genômico do *M. leprae* revelou extensa redução evolutiva (COLE et al, 2001). Análises bioinformáticas mostraram que apenas 49,5% do seu genoma é composto por genes funcionais, dos quais 1614 codificam proteínas e outros 50 codificam RNAs estáveis. O restante é ocupado por sequências regulatórias ou pseudogenes, que são quadros de leitura inativos com homólogos funcionais em outras micobactérias (SINGH e COLE, 2011). Todas as categorias funcionais do genoma de *M. leprae* são consideravelmente menores do que seus equivalentes no bacilo da tuberculose e em outras micobactérias, e algumas quase desaparecem completamente (COLE et al, 2001; SINGH e COLE,

2011). Esta drástica redução no número de genes funcionais do patógeno afetou quase todos os aspectos de seu metabolismo (VISSA e BRENNAN, 2001). Sendo assim, grande parte de suas vias metabólicas são bastante limitadas, o que justifica o fato ser uma bactéria não cultivável *in vitro*, embora tenha havido preservação de genes necessários para sua transmissão, estabelecimento e sobrevivência no hospedeiro (SCOLLARD et al, 2006).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

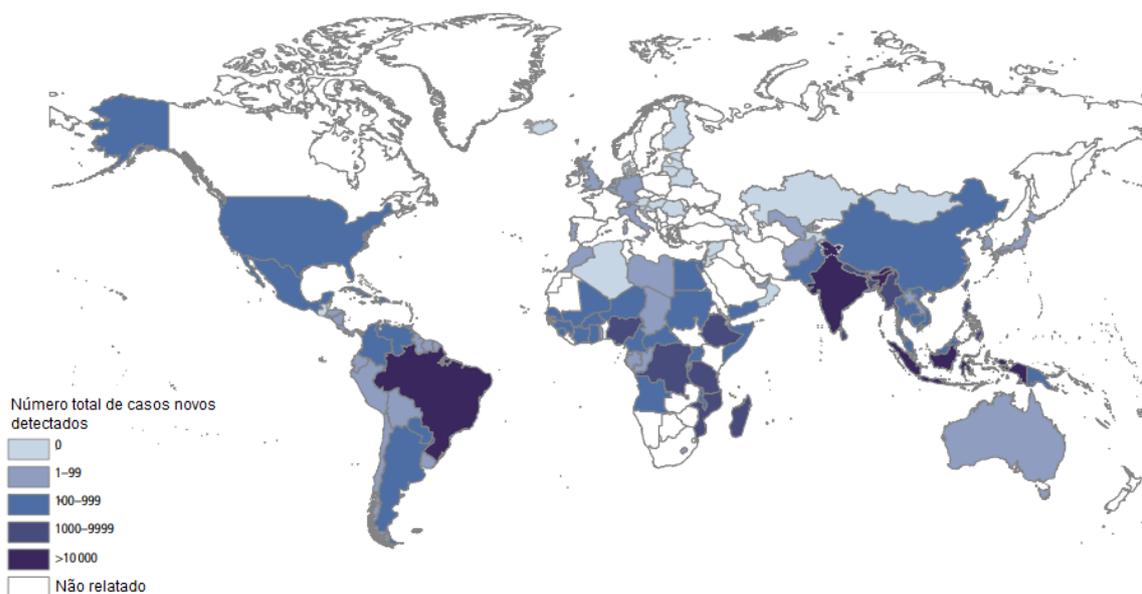
Embora curável, a hanseníase ainda é uma doença estigmatizada e representa um significativo problema de saúde pública em muitas partes do mundo, principalmente devido ao seu alto poder incapacitante (WHITE e FRANCO-PAREDES, 2015; BRASIL, 2018; SADHU e MITRA, 2018). É considerada a segunda doença micobacteriana infecciosa mais patogênica, precedida apenas pela tuberculose (TB) e, apesar de já ter sido amplamente distribuída na Europa, nas últimas décadas tem ocorrido de maneira prioritária em países pobres de regiões tropicais e temperadas (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; GELUK, 2013). Em estudo recente envolvendo georreferenciamento de casos de hanseníase em um município brasileiro durante 20 anos, Matos e colaboradores (2018) reforçaram a associação da doença com fatores socioeconômicos, sendo que as maiores taxas de detecção foram relacionadas com altos índices de vulnerabilidade social e não somente à pobreza.

Segundo estatísticas mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017 foram notificados 210.671 casos novos em 150 países, o que perfaz uma taxa de detecção global de 2,77 casos por 100 mil habitantes (WHO, 2018). Destes 150 países, apenas três relataram mais de 10 mil casos novos em números absolutos – Índia, Brasil e Indonésia – sendo responsáveis por 80,2% do somatório mundial (Figura 3). A Índia ocupa a primeira posição no ranking geral, totalizando 59,9% dos casos diagnosticados em 2017 (126.164 em números absolutos). O Brasil está em segundo lugar com 26.875 casos novos os quais perfazem aproximadamente 12,8% do total global, 92,3% dos casos notificados nas

Américas e uma taxa de detecção de 12,85/100 mil habitantes, classificando o país como de alta carga para a doença (WHO, 2018; BRASIL, 2018).

Em 2017, o panorama mundial de casos novos de hanseníase mostrou uma redução geral em relação a 2016. Apesar disto, no Brasil houve aumento de aproximadamente 6,6% nas notificações, o que equivale a um total de 1.657 casos (WHO, 2018). De acordo com os dados do SINAN – Sistema de Informações de Agravos de Notificação – as regiões brasileiras que exibiram maiores taxas médias de detecção em 2017 foram a Centro-Oeste (33,86 casos novos por 100 mil habitantes), seguida das regiões Norte (28,39/100 mil) e Nordeste (20,42/100 mil). As menores taxas foram registradas nas regiões Sul (2,60/100 mil) e Sudeste (4,33/100 mil). Nesta última região, o Espírito Santo foi classificado como sendo de alta taxa de detecção (12,18 casos novos/100 mil habitantes) enquanto os estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo mostraram-se com médios coeficientes de detecção, correspondendo a taxas de 5,61; 5,23 e 2,73 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2019).

Dentre todos os casos novos detectados no Brasil em 2017, 1.706 ocorreram entre crianças (BRASIL, 2019). A detecção de casos entre crianças menores de 15 anos de idade é um parâmetro importante na epidemiologia da Doença de Hansen, pois indica infecção recente e foco de transmissão ativo naquela comunidade (BARRETO et al, 2017).



**Figura 3:** Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase em 2017. Fonte: adaptado de WHO, 2018.

O mecanismo preciso de transmissão do *M. leprae* é desconhecido, porém acredita-se que a principal forma de contágio seja através da absorção de aerossóis pelas vias aéreas superiores (SCOLLARD et al, 2006). A transmissão se dá por meio de contato próximo e prolongado de uma pessoa suscetível com um doente com alta carga bacilar, que não tenha iniciado o tratamento (BRASIL, 2017). Por esta razão, em áreas endêmicas, a distância física de um caso índice pode definir grupos de risco associados à ocorrência da doença (HOEVEN et al, 2008).

O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão e existe uma grande preocupação com os indivíduos chamados de contatos domiciliares (SAMPAIO et al, 2011; BRASIL, 2016). Contato domiciliar é toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido, conviva ou tenha convivido com o doente, no âmbito domiciliar, nos últimos cinco anos anteriores ao diagnóstico, podendo ser familiar ou não (BRASIL, 2017). Além do domicílio, há que se considerar ainda um elevado risco de transmissão entre os contatos sociais, particularmente em áreas hiperendêmicas com alta densidade populacional (HOEVEN et al, 2008). Contato social é toda e qualquer pessoa que conviva ou tenha convivido em relações sociais (familiares ou não), de forma próxima e prolongada com o caso notificado, incluindo vizinhança, ambiente de trabalho, escola, dentre outros (BRASIL, 2017).

Embora o advento da poliquimioterapia (PQT) tenha resultado em uma queda significativa da prevalência global da hanseníase, notificações de casos novos a cada ano indicam que sua transmissão continua ocorrendo, principalmente entre os contatos que, portanto, apresentam maior risco de desenvolver a doença. O reservatório de contatos infectados pelo *M. leprae*, com potencial hanseníase subclínica, representa uma importante fonte de transmissão continuada e futura (GELUK, 2013). Torna-se claro então que a investigação de contatos é uma ação de extrema relevância para o controle da hanseníase, visando quebrar a cadeia de transmissão e evitar sequelas resultantes do diagnóstico tardio e da falta de acompanhamento adequado (BRASIL, 2017).

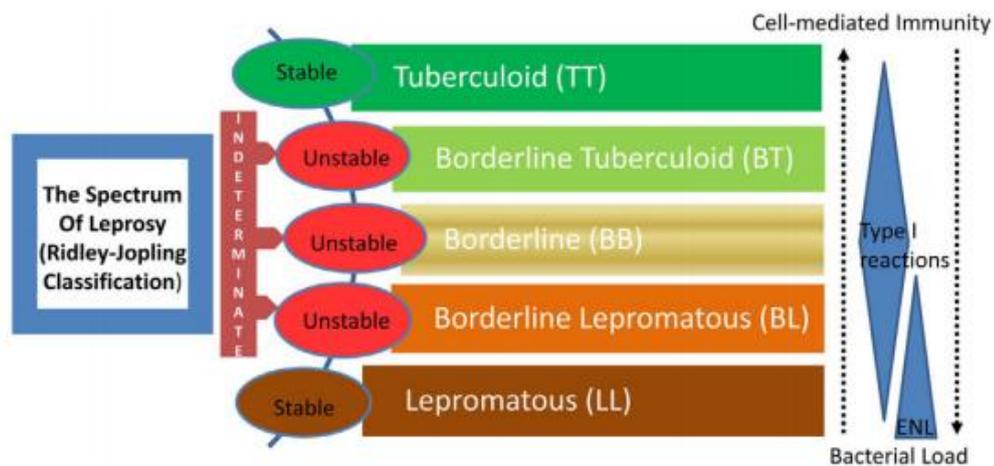
### 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A maioria dos indivíduos é naturalmente resistente à hanseníase, porém, apesar da mínima variação genética entre os isolados de *M. leprae*, as pessoas suscetíveis podem apresentar formas completamente diferentes da doença (GELUK, 2013). Isto se deve ao fato de que as manifestações clínicas estão diretamente relacionadas com as respostas imunes do hospedeiro. Considera-se a existência de um espectro de características clínico-patológicas que, baseado nas respostas imunes específicas, varia desde uma forte imunidade celular em um dos extremos até respostas predominantemente humorais no outro, com estados indeterminados imunologicamente instáveis entre eles (GELUK, 2013; NATH, SAINI e VALLURI, 2015).

Baseado na relação patógeno-hospedeiro foram definidos critérios para orientar a classificação clínica espectral, cruciais para o diagnóstico e tratamento corretos (SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017). São aceitas três classificações: classificação de Madri (1953), classificação de Ridley & Jopling (1966) e classificação operacional proposta pela OMS (1982).

A classificação de Madri baseia-se nas características clínicas e baciloscópicas, dividindo a hanseníase em dois grupos polares estáveis, tuberculoide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L), e outros dois grupos instáveis, indeterminado (I) e dimorfo (D) ou borderline (B). Esta é a classificação adotada atualmente pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017).

A classificação de Ridley & Jopling, empregada em pesquisas, utiliza o conceito espectral e divide os pacientes em 5 categorias como demonstrado na Figura 4. Baseia-se em critérios clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos. Considera as formas polares tuberculoide-tuberculoide (TT) e lepromatosa-lepromatosa (LL), e subdivide a forma borderline em borderline-tuberculoide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL) (RIDLEY e JOPLING, 1966).



**Figura 4:** O espectro da hanseníase – classificação de Ridley & Jopling e sua relação com a imunidade do hospedeiro. Fonte: adaptado de SADHU e MITRA, 2018. ENL – Eritema Nodoso Leproso (ou Hansênico).

Para fins terapêuticos, em 1982 a OMS classificou a hanseníase conforme o índice baciloscópico em paucibacilar (PB, IB < 2+) e multibacilar (MB, IB > ou igual a 2+). O IB baseia-se em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6 e corresponde ao método de avaliação quantitativo mais correto e utilizado na leitura da baciloscopia em hanseníase (WHO, 1982).

Em 1988, foram estabelecidos critérios clínicos para esta classificação, considerando hanseníase PB os casos com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido e hanseníase MB casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido. Onde o exame baciloscópico é disponível, pacientes com resultado positivo são considerados multibacilares, independentemente do número de lesões (WHO, 1988). Portanto, pacientes indeterminados, TT e BT são incluídos entre paucibacilares e pacientes BB, BL e LL compreendem os multibacilares. As três formas de classificação adotadas para a hanseníase são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Classificações adotadas para as formas clínicas da hanseníase

Classificação	Formas clínicas	Formas clínicas
Madri (1953)	T	B ou D
	I	L ou V
Ridley & Jopling (1966)	TT	BB
	BT	BL
		LL
OMS (1982)	PAUCIBACILAR	MULTIBACILAR

Formas clínicas – T: tuberculoide; I: indeterminada; B: borderline; D: dimorfa; L: lepromatosa; V: virchowiana; TT: tuberculoide-tuberculoide; BT: borderline-tuberculoide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa-lepromatosa. Fonte: Adaptado de SOUZA, 1997.

Na hanseníase, o período de incubação entre a infecção e a manifestação da doença é longo e varia amplamente, de meses a 30 anos, com média estimada de 4 e 10 anos para as formas tuberculoide e lepromatosa, respectivamente (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). A infecção desencadeia uma patologia que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, podendo acometer também outros sítios como olhos, mucosas, ossos e testículos (WHITE e FRANCO-PAREDES, 2015).

Entre as doenças infecciosas, a hanseníase é considerada uma das principais causas de incapacidades físicas, em razão do seu potencial de causar lesões neurais, as quais estão diretamente relacionadas ao poder imunogênico do *M. leprae* (BRASIL, 2018). A presença do bacilo nas células de Schwann dos nervos periféricos produz disfunção axonal e desmielinização. Esta neuropatia é iniciada pela infecção e seus eventos imunológicos associados, mas seu curso e sequelas muitas vezes se estendem por muitos anos além da cura da infecção e podem ter consequências físicas, sociais e psicológicas gravemente debilitantes (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD et al, 2006).

Assume-se que os sinais cardinais dermatoneurológicos da hanseníase são lesões cutâneas com sensibilidade (térmica, dolorosa e tátil) alterada e espessamento dos nervos periféricos (FONSECA et al, 2017). Na maioria dos pacientes a hanseníase precoce, indeterminada, manifesta-se como lesões

maculares hipopigmentadas, únicas ou múltiplas, e ocorre quando a imunidade celular contra o *M. leprae* ainda não se desenvolveu. As lesões são não pruriginosas, com perda da sensação térmica e podem apresentar-se com coloração avermelhada em pacientes de pele clara ou amarronzadas naqueles de pele escura. Não há acometimento de troncos nervosos periféricos (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; TALHARI, TALHARI e PENNA, 2015).

Na forma tuberculoide, a doença é limitada, havendo resposta imune celular do hospedeiro. Esta forma clínica pode ser caracterizada pela presença de poucas e pequenas lesões hipopigmentadas ou eritematosas, com bordas bem definidas, pápulas (placas) elevadas e diminuição da sensibilidade térmica e tátil. As lesões de pele se apresentam com superfície seca e áspera ao toque (TALHARI, TALHARI e PENNA, 2015). O comprometimento nervoso ocorre, geralmente, de forma assimétrica, sendo, algumas vezes, a única manifestação clínica (CRUZ et al, 2017).

As formas *borderlines* são as apresentações mais comuns da doença (mais de 70% dos casos) e ocorrem, normalmente, após um longo período de incubação (BRASIL, 2017). Caracterizam-se, geralmente, por várias manchas de pele avermelhadas ou esbranquiçadas, com bordas elevadas, mal delimitadas na periferia, ou por múltiplas lesões bem delimitadas semelhantes à lesão tuberculoide, porém a borda externa é pouco definida. A perda de sensibilidade varia de parcial a total, com diminuição de funções autonômicas e comprometimento assimétrico de nervos periféricos (TALHARI, TALHARI e PENNA, 2015; CRUZ et al, 2017).

A forma lepromatosa é considerada a mais grave devido à incapacidade do hospedeiro em montar uma resposta imune eficaz (TALHARI, TALHARI e PENNA, 2015). Em sua fase inicial, é caracterizada por máculas eritemato-hipopigmentadas, levemente edematosas, que podem progressivamente aumentar de tamanho e coalescer, formando extensas áreas edematosas disseminadas ou generalizadas. Pápulas e nódulos (hansenomas) podem aparecer nestas áreas. Em estágio mais avançado, pode haver perda parcial a total das sobrancelhas (madarose) e dos cílios e desenvolvimento da chamada fácies leonina. Espessamento dos nervos periféricos com perda bilateral de sensibilidade e anormalidades oculares também são comuns (BRASIL, 2017; CRUZ et al, 2017).

No curso da doença, ou até mesmo anos após o tratamento específico, podem ocorrer as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais,

fenômenos inflamatórios agudos secundários à liberação de antígenos do *M. leprae* e reações de hipersensibilidade (MENDONÇA et al, 2008). Existem dois principais tipos clínicos: a reação reversa (RR) ou reação tipo 1, mais frequente em pacientes *borderlines* instáveis, ou seja, BT, BB e BL da classificação de Ridley & Joplin; e o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação tipo 2, predominante na forma LL (NATH, SAINI e VALLURI, 2015). Em aproximadamente 50% dos pacientes, reações hansênicas ocorrem pelo menos uma vez ao longo da vida, principalmente entre os multibacilares, causando fortes dores, grave morbidade e necessidade de atenção clínica imediata (SAINI et al, 2016). Os eventos reacionais imunomediados constituem a maior causa de lesão irreversível no nervo periférico e aumento das incapacidades na hanseníase (BRASIL, 2017).

A reação do tipo 1 ou reação reversa (RR) representa fenômenos de hipersensibilidade tardia localizados em áreas da pele e nervos vizinhos, gerando um infiltrado inflamatório de células T CD4<sup>+</sup>. As lesões preexistentes tornam-se mais definidas e eritematosas, podendo aparecer também novas lesões nas áreas adjacentes (NATH, SAINI e VALLURI, 2015; BRASIL, 2017; GELUK, 2018). Geralmente se desenvolvem de maneira gradual e seu curso natural pode durar várias semanas (SCOLLARD et al, 2006).

O eritema nodoso hansênico (ENH), por sua vez, está associado à circulação e depósito de imunocomplexos nos tecidos de pacientes com história de resposta do tipo Th2 (pacientes lepromatosos) (GELUK, 2018). Os pacientes experimentam um início abrupto de nódulos eritematosos, muito sensíveis, que podem se desenvolver na face, extremidades ou no tronco, sem predileção por lesões existentes. Frequentemente também apresentam febre, mal-estar e algum grau de neurite com neuropatia sensorial e motora. Alterações oculares, artrite, miosite e glomerulonefrite também podem ocorrer. Em reações graves, algumas das lesões cutâneas podem ulcerar (SCOLLARD et al, 2006; NATH, SAINI e VALLURI, 2015). O curso natural das reações do tipo 2 é de 1 a 2 semanas, mas muitos pacientes experimentam múltiplas recorrências com caráter crônico, o que leva ao tratamento prolongado com corticosteroides e/ou talidomida e traz efeitos colaterais adicionais significativos (NATH, SAINI e VALLURI, 2015; BRASIL, 2017). A talidomida é o medicamento de escolha para o tratamento do ENH uma vez que inibe a produção de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória presente em altos níveis nesse estado reacional (MAZZOCCOLI et al, 2012).

## 1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

### 1.4.1 Imunidade Inata na hanseníase

A resposta imune inata parece ser crítica na definição do curso da infecção pelo *M. leprae* e, em última instância, em seu desfecho clínico (FONSECA et al, 2017). Uma resposta imune inata efetiva em combinação com a baixa virulência do bacilo está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase (SCOLLARD et al, 2006).

O bacilo de Hansen utiliza vários mecanismos para se internalizar e residir em macrófagos, células dendríticas e células de Schwann do hospedeiro (NATH, SAINI e VALLURI, 2015). Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores *Toll-like* (TLRs) e NLRs (receptores tipo NOD – domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo contendo proteína), além de receptores do complemento presentes nestas células são cruciais para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) durante a resposta da imunidade inata contra o *M. leprae* (MENDONÇA et al, 2008; MODLIN, 2010; NATH, SAINI e VALLURI, 2015). Após a interação de PAMPs com PRRs, a liberação de sinais intracelulares leva à transcrição de genes importantes para ativação de células T ou indução de fagocitose pelos macrófagos (PINHEIRO et al, 2018).

Diferentes moléculas que constituem o *M. leprae* foram caracterizadas como ligantes e potentes estimuladores de TLRs, principalmente TLR2 (PINHEIRO et al, 2018). *M. leprae* é capaz de mediar a ativação celular dos heterodímeros TLR2/1 e homodímeros de TLR2 em macrófagos da pele, indicando, desta forma, a presença de lipoproteínas triaciladas no bacilo (KRUTZIK et al, 2003; FONSECA et al, 2017; PINHEIRO et al, 2018). Krutzik et al (2003) mostraram que TLR2 e TLR1 são mais fortemente expressos em lesões da forma localizada TT quando comparados com a forma LL disseminada, indicando o envolvimento destes receptores na defesa do hospedeiro. Em adição, foi demonstrado que a ativação do TLR2/1 por lipopeptídeos sintéticos do *M. leprae* desencadeia a produção de TNF- $\alpha$ , como parte da resposta inflamatória aguda, e IL-12, que induz à polarização da resposta adaptativa Th1 protetora (KRUTZIK et al, 2003). Além do TLR2, outros

receptores do tipo Toll parecem estar envolvidos em alguma etapa do desenvolvimento da resposta imune inata contra *M. leprae*, dentre eles TLR4, TLR6 e TLR9 (MATTOS et al, 2010; POLYCARPOU et al, 2016; DIAS et al, 2016).

Os receptores intracelulares tipo NOD2 também podem mediar o reconhecimento inato de *M. leprae*. A ativação de monócitos via NOD2 desencadeia sua diferenciação em células dendríticas (DCs), mediada pela IL-32. Estas DCs são mais eficientes em apresentar antígenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> via MHC-I do que as DCs derivadas de GM-CSF, o que pode ser relevante no desfecho da hanseníase. Em pacientes com as formas tuberculoides, houve uma maior expressão de NOD2 e IL-32, bem como alta frequência de DCs nos sítios de infecção quando comparados com pacientes lepromatosos (SCHENK et al, 2012).

Os macrófagos desempenham um papel primário e central na interação entre o bacilo de Hansen e o hospedeiro, sendo a principal população celular que exerce atividade microbicida na hanseníase (SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017). Tais células apresentam características histológicas e imunológicas variadas nas diferentes formas clínicas da doença. Nas lesões TT estão ativados, com volume aumentado, núcleo alongado e presos uns aos outros, sendo chamados de células epitelioides. Já nas lesões LL, apresentam-se com numerosos bacilos e uma aparência espumosa, ricos em fosfolídeos e ácidos graxos (MODLIN, 2010). Inicialmente acreditou-se que estes lipídeos fossem apenas de origem micobacteriana, porém estudos posteriores revelaram também a presença de fosfolídeos oxidados derivados do hospedeiro e acúmulo de corpúsculos lipídicos produtores de prostaglandina E2 (PGE2), favorecendo assim a inibição de atividades bactericidas dos macrófagos e a regulação negativa da resposta imune nas formas LL (CRUZ et al, 2008; MATTOS et al, 2010; MODLIN, 2010).

Além dos macrófagos, as DCs também são importantes no desfecho da infecção por *M. leprae*. A presença destas células na epiderme ou áreas próximas ao infiltrado inflamatório leva ao desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa efetiva contra o bacilo (PINHEIRO et al, 2018). Pesquisas mostram uma clara predominância de DCs em lesões tuberculoides ao passo que as lesões LL são caracterizadas por um déficit acentuado nas DCs, tanto na derme quanto na epiderme, sendo isto relacionado a falhas na resposta imune mediada por células em pacientes multibacilares (MIRANDA et al 2007; SIMÕES QUARESMA et al, 2009).

Para sobreviverem dentro da célula hospedeira, as micobactérias precisam escapar dos mecanismos micobactericidas intracelulares modulando alguns processos inatos como ativação do complemento, apoptose e autofagia (PINHEIRO et al, 2018). A internalização por receptores do complemento impede que haja uma explosão respiratória, sendo um mecanismo pelo qual as micobactérias patogênicas podem eliminar os radicais tóxicos de oxigênio que são gerados durante a fagocitose via TLRs (SCOLLARD et al, 2006). Os receptores de complemento CR1, CR3 e CR4 em monócitos e macrófagos são mediadores chave da fagocitose do *M. leprae* (SCHLESINGER e HORWITZ, 1990). Além disso, a captação de PGL-1 é facilitada pelo componente C3 do complemento (SCHLESINGER e HORWITZ, 1991).

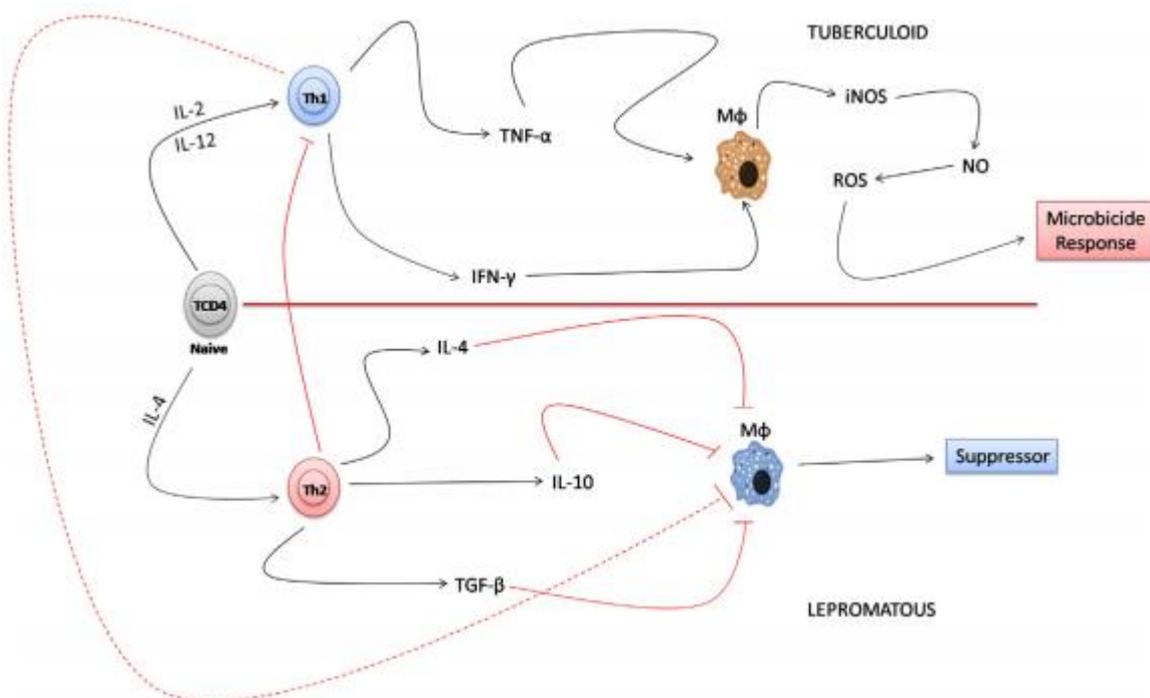
Caso a imunidade inata seja insuficiente para evitar a progressão da doença, antígenos micobacterianos são apresentados às células T CD4<sup>+</sup> iniciando a imunidade mediada por células (IMC) (SCOLLARD, DACSO e ABAD-VENIDA, 2015).

#### **1.4.2 Imunidade celular na hanseníase**

A IMC adquirida é um determinante crucial na susceptibilidade individual às infecções causadas por micobactérias (SCOLLARD, DACSO e ABAD-VENIDA, 2015). As manifestações clínicas da hanseníase são correlacionadas com a capacidade ou não do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune celular adequada, capaz de limitar o crescimento do patógeno (MODLIN, 1994). A polarização da resposta imune específica ao *M. leprae* é, portanto, um elemento essencial na patogênese da doença (FONSECA et al, 2017).

Tanto os linfócitos T quanto os linfócitos B exercem ações fundamentais no desenvolvimento da resposta imune ao longo do espectro da hanseníase (SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017). A imunidade de pacientes com as formas tuberculoides (BT / TT) é caracterizada por uma forte resposta de células Th1 e suas citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-15 e TNF- $\alpha$ ), respostas vigorosas de células T aos antígenos do *M. leprae* e contenção dos bacilos em granulomas bem organizados, limitando sua proliferação (SALGAME et al, 1992; SCOLLARD, DACSO e ABAD-

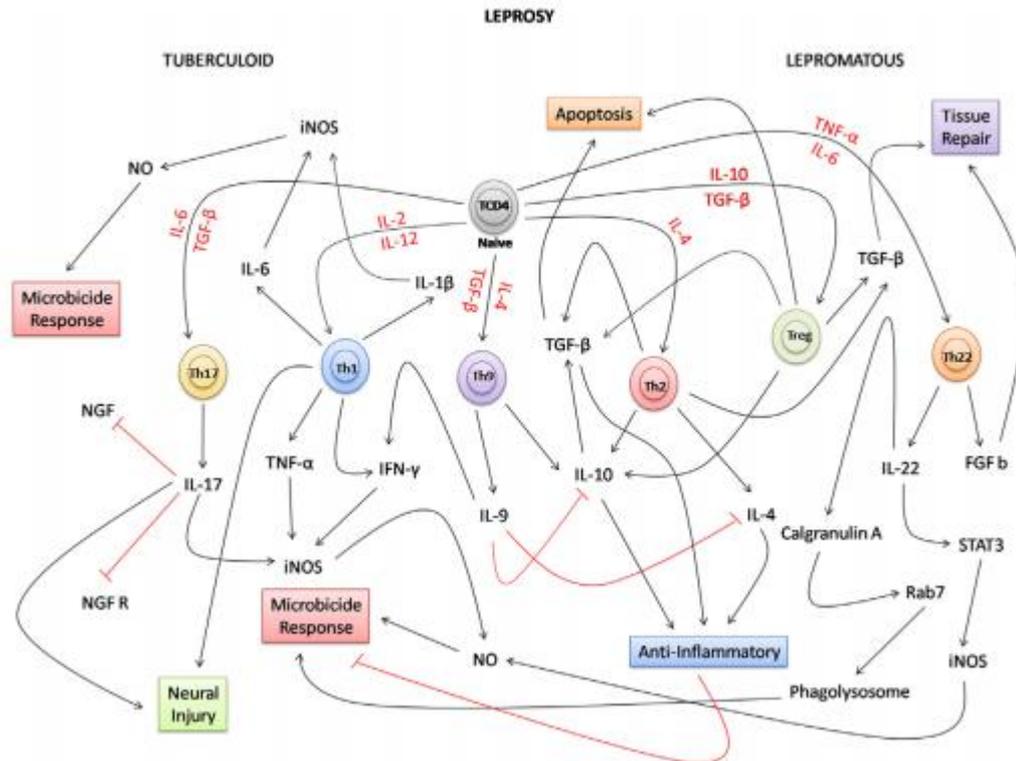
VENIDA, 2015). Há pouca evidência de imunidade humoral específica ao *M. leprae* neste pólo da infecção (SALGAME et al, 1992). Em contraste, a resposta imune adquirida de pacientes lepromatosos (BL / LL) é caracterizada por um perfil imune Th2 com produção de IL-4 e IL-10 e ativação de células T regulatórias (Tregs), produção robusta de anticorpos, mas não protetora, incluindo formação de complexos imunes e falha em restringir o crescimento do bacilo (Figura 5) (SALGAME et al, 1992; FONSECA et al, 2017).



**Figura 5:** Paradigma imune Th1/Th2 nas formas polares da hanseníase. Na forma tuberculóide, linfócitos Th1 produtores de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  induzem a ativação de macrófagos que produzem óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e NO, os quais destroem *M. leprae*. Na forma lepromatosa, a predominância de linfócitos Th2 resulta na inativação da resposta microbicida de macrófagos principalmente pela produção de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  que favorecem a sobrevivência de *M. leprae*. Fonte: adaptado de SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017.

Apesar da clássica abordagem dicotômica Th1/Th2 na hanseníase, limitar as defesas do hospedeiro apenas a este paradigma não explica totalmente o desenvolvimento da doença. A resposta imune ao *M. leprae* é um processo extremamente complexo envolvendo outros mecanismos e subgrupos heterogêneos de células T que atuam, via de regra, de forma integrada (Figura 6). Como em outras infecções granulomatosas crônicas, células NKT e Tregs juntamente com Th17 e a

via PD-1 / PD-L1 desempenham papéis cruciais no resultado das interações parasito-hospedeiro nesta doença (SADHU e MITRA, 2018). Adicionalmente, linfócitos Th9 e Th22 podem também ajudar na compreensão da imunopatogênese da hanseníase (SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017).



**Figura 6:** Possíveis redes de integração e novos paradigmas imunes da resposta de linfócitos T na hanseníase. Devido à complexidade da resposta imune, nas formas polares da hanseníase os linfócitos T CD4 naïve, sob a ação de várias citocinas (vermelho) podem se diferenciar em várias subpopulações de linfócitos T (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Treg) que influenciam diretamente o desfecho clínico da doença. Fonte: adaptado de SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017.

Dentre os subconjuntos de linfócitos T, Tregs e Th17 têm sido os mais explorados na hanseníase por apresentarem efeitos contrabalançados entre si, sendo que alterações nesta via podem contribuir para a fisiopatologia de quadros infecciosos, inclinando o equilíbrio para a supressão da imunidade do hospedeiro e subsequente disseminação de doenças (SADHU et al, 2016).

Os linfócitos Tregs positivos para FoxP3 têm sido caracterizados como um dos mais potentes tipos de células supressoras com eventual regulação da resposta imune do hospedeiro durante infecções intracelulares (SADHU et al, 2016). São reconhecidos por sua habilidade de inibir outras células por meio de citocinas

como TGF- $\beta$  e IL-10, moléculas inibitórias como CTLA-4 (do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) ou através do contato célula-célula de maneira independente de citocinas (SAINI, RAMESH e NATH, 2014; AZEVEDO et al, 2017). Desempenham, desta forma, um importante papel na indução e manutenção da resposta imunossupressora na hanseníase, contribuindo para a sobrevivência do bacilo nas lesões lepromatosas (SOUSA, SOTTO e QUARESMA, 2017).

Palermo e colaboradores (2012) foram um dos primeiros a investigarem a função das células Tregs na hanseníase e mostraram aumento na expressão desta população em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes lepromatosos (BL e LL) estimuladas por antígeno de *M. leprae* quando comparados com pacientes tuberculoides (BT e TT) e contatos. Tregs e IL-10 também foram significativamente mais expressas em lesões cutâneas lepromatosas do que nas tuberculoides (PALERMO et al 2012). Saini, Ramesh e Nath (2014) confirmaram a maior expressão de Tregs em PBMCs estimuladas por antígeno e biópsias de pele na forma anérgica lepromatosa, além de evidenciarem estas células como T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> secretoras de TGF- $\beta$  e não produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-17.

Em paralelo com as Tregs, células Th17, caracterizadas pela produção de IL-21, IL-22 e, sobretudo, IL-17 vem sendo associadas com a patogênese da hanseníase no polo tuberculoide e em eventos reacionais (AZEVEDO et al, 2017). A análise de PBMCs de pacientes com hanseníase e contatos estimuladas por antígeno de *M. leprae* mostrou que pacientes paucibacilares apresentaram aumento significativo na expressão de genes relacionados às isoformas de IL-17 (IL-17A, IL-17C, IL-17D e IL-17F) em comparação com as de pacientes multibacilares. Interessantemente, contatos saudáveis também mostraram aumento na expressão geral de IL-17 quando comparados com os grupos de pacientes, indicando que a exposição de longo prazo à infecção estimulou tal citocina, podendo estar relacionada com a resistência ao patógeno (SAINI, RAMESH e NATH, 2013). Estudando subpopulações de células Tregs e Th17, Sadhu e colaboradores (2016) mostraram que, na presença de citocinas indutoras de Th17 (TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23) ou produzidas por este perfil de células (IL-17 e IL-22), há redução na frequência de células FoxP3<sup>+</sup> e aumento de células CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> em pacientes BL/LL.

Tomados em conjunto, os pontos abordados reforçam o interesse dos pesquisadores em avaliar o papel dos linfócitos T e seus produtos como biomarcadores na hanseníase e comprovam o envolvimento de diversos subtipos

destas células na modulação da resposta imune ao bacilo. No entanto, comparado às demais células imunes, as células B são estudadas com menor frequência na hanseníase, e, por isso, sua contribuição na patogênese não é totalmente compreendida (NEGERA et al, 2017).

### 1.4.3 Células B e imunidade humoral na hanseníase

As células B e as imunoglobulinas por elas produzidas são elementos centrais da imunidade humoral e protegem, como parte do sistema imune adaptativo, contra uma grande variedade de patógenos (PIEPER, GRIMBACHER e EIBEL, 2013). A troca de classe de anticorpos pelas células B, também chamada de *switching* (ou *switch*) imunológico é um mecanismo indispensável para manutenção do equilíbrio e da eficiência da imunidade humoral, fornecendo versatilidade na função e distribuição das imunoglobulinas, sem alterar a especificidade antigênica, já que a região variável VDJ e as cadeias leves permanecem inalteradas durante o processo (AVERY et al, 2008).

Através desta troca, células B, que inicialmente expressam IgM e/ou IgD, passam a expressar IgA, IgE ou uma das quatro subclasses de IgG em sua superfície (SNAPPER e MOND, 1993). Este mecanismo ocorre após o reconhecimento de dois sinais pela célula B: CD40L e uma citocina específica (COFFMAN, LEBMAN e ROTHMAN, 1993; AVERSA et al, 1994). As citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-21 e TGF- $\beta$  já foram relatadas como promotores do *switch* pela produção, *in vitro*, dos diferentes isotipos de anticorpos por células B naïve humanas ativadas (COFFMAN, LEBMAN e ROTHMAN, 1993; AVERY et al, 2008).

Apesar dos anticorpos não conferirem proteção efetiva contra o bacilo de Hansen, desempenham importante papel no espectro da doença (NEGERA et al, 2017). Diversos trabalhos têm evidenciado aumento dos níveis séricos de diferentes classes e subclasses de anticorpos contra variados antígenos específicos de *M. leprae* em pacientes com hanseníase multibacilar.

Os primeiros trabalhos relacionados à sororeatividade específica na hanseníase mostraram que os pacientes no polo lepromatoso apresentam níveis significativamente mais elevados de anticorpos IgM anti-PGL-1 quando comparados

aos níveis de IgG e IgA (CHO et al, 1983; YOUNG et al, 1984). Desde então vários estudos confirmaram, através de diferentes metodologias, que a maioria dos pacientes com alta carga bacilar produz anticorpos IgM anti-PGL-1 específicos para *M. leprae*, que dificilmente são detectados em pacientes PB (LYON et al, 2008; LOBATO et al, 2011; SPENCER et al, 2011; FABRI et al, 2015).

Além da resposta de IgM frente ao PGL-1 ou seus análogos sintéticos, a soropositividade de IgG nas formas multibacilares também se faz relevante. A presença de IgG e algumas de suas subclasses reativas aos antígenos proteicos de *M. leprae* também reflete o espectro da hanseníase e a carga bacilar: a maioria dos pacientes MB possui elevados títulos da imunoglobulina, mas poucos pacientes PB são responsivos (HUNGRIA et al, 2012; FABRI et al 2015; MARÇAL et al, 2018).

Pesquisas envolvendo anticorpos das classes IgA e IgE na hanseníase são menos frequentes. Trabalhos comprovam que, semelhante ao que ocorre para IgM e IgG específicas, títulos séricos de IgA são mais elevados em pacientes LL do que em pacientes TT (SCHWERER et al, 1989; DE MACEDO et al, 2017). Porém, as funções deste anticorpo circulante no desfecho clínico da doença não são claras. Brito Cabral e colaboradores (2013) sugeriram que pesquisas de IgM e IgA salivares anti-PGL-1 devem ser usadas juntamente com a pesquisa de IgM e IgG anti-PGL-1 séricas para acompanhar o desenvolvimento da hanseníase em contatos domiciliares. Outra possível aplicação foi proposta por Nahas e colaboradores (2018), que apontaram para o uso de IgA salivar anti-LAM como um marcador prognóstico para reações hansênicas nos pacientes uma vez que sua positividade aumentou em pelo menos duas vezes as chances destes eventos reacionais nos pacientes. Trabalhos relacionados à reatividade de IgE sérica na hanseníase são ainda mais escassos. Em um dos poucos relatos encontrado por nós, foi constatada baixa reatividade desses anticorpos contra antígeno sonificado de *M. leprae* ao longo de todo espectro clínico da doença (HUSSAIN, KIFAYET E CHIANG, 1995).

Apesar de serem tradicionalmente conhecidas por sua capacidade de produzirem anticorpos, as células B podem exercer funções imunes adicionais como produção de citocinas, apresentação de antígenos e imunoregulação (MIZOGUCHI e BHAN, 2006). Os linfócitos B desempenham papel crítico como reguladores positivos e negativos das respostas imunes. Sua função inibitória tem sido associada, principalmente, à produção de IL-10, mas também de IL-35 e TGF- $\beta$  pelas chamadas células Bregs (TARIQUE et al, 2017). Linfócitos Bregs produtores

de IL-10 promovem a tolerância e suprimem as respostas inflamatórias, enquanto os linfócitos B efetores amplificam as respostas imunes humoral e celular (LUND, 2008). Por esta capacidade de regulação das respostas imunes, os linfócitos B podem estar envolvidos na patologia de várias doenças. Na hanseníase, Bregs IL-35<sup>+</sup> foram encontradas com frequências mais aumentadas em pacientes BL/LL do que em pacientes BT e controles saudáveis sugerindo sua possível ação imunossupressora nestes indivíduos (TARIQUE et al, 2017). Estas evidências apontam para a participação das células B reguladoras na imunopatogênese da hanseníase, podendo ser úteis como biomarcadores (TARIQUE et al, 2017).

## 1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce e o subsequente tratamento oportuno são elementos fundamentais para romper a cadeia de transmissão da hanseníase (LASTÓRIA e ABREU, 2014). No entanto, ainda não estão disponíveis testes capazes de fornecer um diagnóstico laboratorial preciso e prévio da doença, o qual permanece essencialmente clínico e baseado em evidências epidemiológicas.

Segundo a OMS, o diagnóstico clínico da hanseníase deve ocorrer na presença de pelo menos um dos seguintes sinais/sintomas: manchas cutâneas hipopigmentadas ou avermelhadas com perda definitiva de sensibilidade; nervos periféricos espessados com perda de sensibilidade e/ou fraqueza dos músculos supridos por este nervo além da presença de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços de pele/amostras de biópsia (WHO, 2012).

O diagnóstico clínico depende do reconhecimento de sintomas e, portanto, só é possível após a manifestação da doença (DUTHIE et al, 2007). Geralmente os primeiros sinais que levam os pacientes a procurarem atenção médica são os dermatológicos. O exame cauteloso da pele é, portanto, um elemento chave no diagnóstico da hanseníase (TALHARI, TALHARI e PENNA, 2015). Todavia, existe uma forma da doença denominada neural pura (ou hanseníase primariamente neural) em que os pacientes não apresentam lesões cutâneas (BRASIL, 2017). As incapacidades físicas, manifestadas por perda de sensibilidade, diminuição da força muscular e/ou surgimento de deformidades visíveis, são uma

das principais causas do estigma e do isolamento de pessoas na sociedade além de serem importantes sinalizadores do diagnóstico tardio (BRASIL, 2018).

Dados clínicos complementados por técnicas semiológicas geralmente concluem o diagnóstico. Contudo, em algumas situações duvidosas, exames laboratoriais como a reação intradérmica de Mitsuda, esfregaço e histopatologia são necessários para confirmar o diagnóstico da hanseníase ou classificar sua forma clínica (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

A medida padrão da imunidade celular para o patógeno é a reação de Mitsuda ou teste cutâneo de lepromina, uma resposta de três ou quatro semanas ao desafio intradérmico com antígeno bruto de *M. leprae* (MODLIN, 2010). A reação de Mitsuda é a exteriorização do granuloma tuberculoide observado em estudos histopatológicos. Embora o teste ajude a classificar a forma clínica da doença, ele não permite fazer o diagnóstico já que a reação é positiva em pacientes paucibacilares, que apresentam boa resposta imune celular, mas negativa em pacientes multibacilares, com a imunidade celular deficiente (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

A baciloscopia de pele é usada para detectar BAAR em esfregaços cutâneos coletados em locais padronizados (lesões de pele, lóbulos das orelhas, cotovelos). Através deste exame é possível obter o índice bacteriano (IB), que representa a carga quantitativa bacilar (número de bacilos). O esfregaço é positivo no grupo multibacilar, que ajuda a estabelecer um diagnóstico definitivo, mas a sensibilidade é baixa no grupo paucibacilar, em que o esfregaço é frequentemente negativo (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

Quando disponível, o exame histopatológico é considerado o “padrão ouro” para diagnóstico da Doença de Hansen. Geralmente é realizado em fragmentos de lesões ou nervos cutâneos onde são observadas as características do infiltrado inflamatório. Histologicamente, a inflamação neural a diferencia de outras doenças granulomatosas (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). O tipo celular que compõe o granuloma e a presença de bacilos define os dois pólos clássicos: células epiteloideas e bacilos ausentes / escassos para o pólo tuberculoide e macrófagos espumosos ricos em bacilos para o pólo lepromatoso (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

O diagnóstico preciso é fundamental para o controle da hanseníase visto que o subdiagnóstico leva à disseminação da doença (KUMAR, PARKASH e GIRDHAR, 2014). Atualmente, o desafio tem sido identificar ou desenvolver um teste

sorológico que possa facilitar ou contribuir para sua detecção precoce e classificação (FABRI et al, 2016). Diagnosticar casos assintomáticos ou oligossintomáticos e prever a progressão da doença entre indivíduos expostos são as prioridades e perspectivas das pesquisas atuais (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

Devido ao seu amplo espectro clínico relacionado às características imunológicas do hospedeiro, a detecção da infecção pelo *M. leprae* em testes sorológicos requer múltiplos e diversos biomarcadores específicos para a imunidade celular e humoral (VAN HOOIJ et al, 2016). Até o presente momento o teste mais bem avaliado e padronizado utiliza o antígeno específico PGL-1 para detectar anticorpos IgM reativos (LASTÓRIA e ABREU, 2014). Estudos sobre a sequência genômica do *M. leprae* tem permitido a identificação de proteínas e peptídeos específicos para este bacilo e sua utilização no desenvolvimento de testes sorológicos empregados no diagnóstico da hanseníase (LASTÓRIA e ABREU, 2014).

### **1.5.1 Antígenos aplicados no sorodiagnóstico da hanseníase**

O glicolípido fenólico-1 (PGL-1) foi um dos primeiros antígenos específicos isolado do *M. leprae*, tendo sido caracterizado e aplicado no sorodiagnóstico. O principal determinante antigênico do PGL-1 é sua porção trissacarídica final. Ensaio que detectam anticorpos anti-PGL-1 podem utilizar o glicolípido nativo, as formas sintéticas di ou trissacarídicas acopladas à albumina de soro bovino ou humano e uma variedade de neoglicoconjugados, que tornam o composto mais solúvel (LOBATO et al, 2011). A molécula sintética NDO-HSA – dissacarídeo natural ligado à albumina humana via octil (do inglês *natural disaccharide octyl linked to human serum albumin*) tem apresentado bom desempenho em testes sorológicos para pesquisa de IgM e mostra concordância significativa com o análogo nativo (LOBATO et al, 2011; FABRI et al, 2015). Dados anteriores do nosso grupo mostram que pacientes multibacilares apresentam títulos de IgM anti-NDO-HSA elevados quando comparados ao grupo paucibacilar (MARÇAL et al, 2018).

Dentre as muitas proteínas recombinantes de *M. leprae* testadas até o momento, LID-1 e NDO-LID tem se destacado por seus bons desempenhos, principalmente na identificação das formas MB. A proteína LID-1 – *Leprosy IDRI (Infectious Disease Research Institute) diagnostic-1* – têm sido umas das mais utilizadas para avaliar a positividade sorológica de IgG nas formas lepromatosas (SPENCER et al, 2005; REECE et al, 2006; ARÁOZ et al, 2006; DUTHIE et al, 2007; SAMPAIO et al, 2011). Ela foi desenvolvida a partir da fusão dos antígenos recombinantes ML0405 e ML2331, os quais se mostraram eficazes em diagnosticar a hanseníase MB em soros de pacientes provenientes de variadas áreas endêmicas, tendo desempenhos diferentes, porém complementares nas regiões testadas (DUTHIE et al, 2007).

Além de se mostrar eficaz no diagnóstico da hanseníase MB, LID-1 foi capaz de fornecer um sorodiagnóstico precoce. Duthie e colaboradores (2007) evidenciaram que aproximadamente 64% de contatos examinados que desenvolveram a forma clínica MB apresentaram, cerca de um ano antes do diagnóstico clínico, níveis séricos de IgG anti-LID-1 claramente mais elevados do que os contatos que não desenvolveram a doença. Níveis elevados e persistentes de IgG anti-LID-1 podem estar associados à ocorrência de ENH, independentemente de o episódio ocorrer no momento do diagnóstico ou durante a PQT (MIZOGUTI et al, 2015). Em estudo recente, Marçal e colaboradores (2018) foram além da pesquisa de IgG total e investigaram a sorologia de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) contra antígenos específicos do *M. leprae* e mostraram haver alta reatividade seletiva de IgG1 e IgG3 anti-LID-1 e anti-NDO-LID em pacientes MB quando comparados a pacientes PB e contatos.

A proteína NDO-LID é um conjugado formado pelo ND ligado à proteína LID-1 através do grupamento octil. Por apresentar uma porção glicolipídica e outra proteica, este antígeno é capaz de detectar tanto IgM quanto IgG. O conjugado NDO-LID mostrou maior capacidade de identificar pacientes com hanseníase MB do que os antígenos NDO-HSA e LID-1 isoladamente (CARDOSO et al, 2013; DUTHIE et al, 2014). Além da soropositividade característica em pacientes MB, NDO-LID foi mais eficaz em detectar casos PB quando comparado ao PGL-1 ou NDO-HSA e LID-1 individualmente, ainda que de forma menos evidente, devido à baixa resposta humoral destes pacientes (CARDOSO et al, 2013; FABRI et al, 2015). O antígeno também demonstrou maior potencial para identificar contatos domiciliares infectados

além de indivíduos da população geral que foram infectados pelo *M. leprae* em relação ao NDO-HSA. O NDO-LID mostrou-se útil também como marcador sorológico de episódios reacionais em pacientes com hanseníase durante e após a PQT, principalmente para reações do tipo 2 (FABRI et al, 2015; DEVIDES et al, 2018).

Fabri e colaboradores (2016) mostraram, em uma revisão integrativa da literatura, as vantagens na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos do *M. leprae* e reforçaram que os testes anti-PGL-1 podem ajudar na classificação da hanseníase em formas PB e MB e facilitar o diagnóstico diferencial, além de auxiliar na detecção precoce. Testes sorológicos utilizando os antígenos recombinantes ML0405, ML2331 e, em especial, LID-1 também podem auxiliar no diagnóstico e classificação da forma clínica multibacilar. Entretanto, testes para anticorpos contra o conjugado NDO-LID podem aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico em relação aos demais, auxiliando na rápida detecção e monitoramento da hanseníase MB (FABRI et al, 2016). Diante de suas propriedades *M. leprae* específicas, os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID apresentam-se como ferramentas promissoras para auxiliar no diagnóstico e na classificação da hanseníase.

## 1.6 TRATAMENTO

O tratamento usual da hanseníase, conhecido como poliquimioterapia (PQT) foi instituído na década de 80 pela OMS e consiste na associação dos medicamentos rifampicina, dapsona e clofazimina (BRASIL, 2017). A PQT emprega esquemas baseados na classificação operacional, que devem ser iniciados logo após a definição do diagnóstico, já na primeira consulta (WHO, 2004; BRASIL, 2017).

De acordo com a forma clínica, são adotados diferentes esquemas terapêuticos. Os pacientes adultos paucibacilares deverão ser tratados por no mínimo 6 meses (6 cartelas em até 9 meses) e receberão uma dose mensal de 600 mg de rifampicina e 100 mg de dapsona supervisionadas além de doses diárias de 100 mg de dapsona autoadministradas. Caso a dapsona precise ser suspensa,

deverá ser substituída pela clofazimina 50 mg/dia, e também 300 mg/mês, na dose supervisionada (BRASIL, 2016; BRASIL,2017).

Já para os pacientes multibacilares adultos, o tratamento compreenderá uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina, 100 mg de dapsona e 300 mg de clofazimina. Doses de 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina deverão ser autoadministradas diariamente ao longo de, no mínimo, 12 meses (12 cartelas em até 18 meses). Caso a dapsona precise ser suspensa, deverá ser substituída pela ofloxacina 400 mg (na dose supervisionada e diária) ou pela minociclina 100 mg (na dose supervisionada e diária) (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017). Para o tratamento de crianças, deve-se considerar o peso corporal como fator mais importante do que a idade, necessitando que haja ajustes nas doses de acordo com cada caso (BRASIL, 2017).

A implantação da PQT foi bastante eficaz tanto para o tratamento individual de pacientes como para os programas de controle da hanseníase, levando a uma drástica redução na prevalência da doença nas últimas décadas (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; MATOS et al, 2018). No entanto, é evidente que sua eliminação não pode ser alcançada baseada apenas no uso da PQT de casos e que novas estratégias se fazem necessárias para atingir tal objetivo (RICHARDUS e OSKAM, 2015). Considera-se que o impacto da PQT na incidência da hanseníase seja limitado, pois muitas vezes a transmissão ocorre antes do diagnóstico (LETURIONDO et al, 2019). Neste sentido, a vigilância e o manejo rigoroso dos contatos apresentam-se como um dos pilares que sustentam as medidas de controle da doença (DOS SANTOS et al, 2018).

A imunoprofilaxia com BCG tem sido vista como uma medida preventiva eficaz devido à sua capacidade de estimular o desenvolvimento da imunidade celular, essencial no controle da doença, especialmente em suas formas multibacilares. No Brasil, desde 1991, o Ministério da Saúde recomenda que a vacina BCG seja administrada a todos os contatos intradomiciliares sem sinais e sintomas de hanseníase (independentemente de serem contatos de casos PB ou MB) dentro de cinco anos do diagnóstico do caso índice, observando o histórico vacinal para administração da dose correta (DOS SANTOS et al, 2018).

Além da imunoprofilaxia, a quimioprofilaxia oferecida aos contatos de casos de hanseníase tem sido testada em vários protocolos como uma intervenção adicional para a redução da transmissão e da incidência da doença (BRASIL, 2015).

Atualmente, a principal forma de tratamento preventivo avaliada para os grupos de alto risco é a quimioprofilaxia com 600 mg de rifampicina em dose única (2 comprimidos de 300 mg) ou 10 mg/Kg de peso em contatos com peso inferior à 40 Kg, associada à vacina BCG.

A evidência científica mais robusta da eficácia da quimioprofilaxia com rifampicina veio de um grande ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo denominado COLEP – *Contact Leprosy Patient* (BRASIL, 2015). O estudo envolveu mais de 28.000 contatos em Bangladesh e mostrou que este modelo de quimioprofilaxia foi capaz de reduzir a incidência da hanseníase em 57% nos primeiros dois anos após a intervenção e que, embora o benefício da ação não tenha aumentado após este período, o efeito foi mantido após 4 e 6 anos (MOET et al, 2004; MOET et al, 2008a; FEENSTRA et al, 2012). No Brasil, este tipo de operação ainda não foi instituído na rotina de serviços de hanseníase. Contudo, a operacionalidade e a efetividade da intervenção estão sendo avaliadas através do projeto PEP-hans (profilaxia pós-exposição), iniciado em junho de 2015 em alguns municípios com alta endemicidade nos estados de Mato Grosso, Pernambuco e Tocantins, com o apoio do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015).

Um importante componente adicional para o sucesso de uma estratégia preventiva baseada nos contatos é a disponibilidade de testes diagnósticos confiáveis e simples para estabelecer não só a doença como também a infecção (RICHARDUS e OSKAM, 2015). Sendo o diagnóstico da hanseníase essencialmente clínico, torna-se relevante a utilização de técnicas que permitam uma melhor avaliação do espectro imunopatológico da doença. A incorporação de ferramentas para diagnóstico contribui na identificação de potenciais casos novos entre contatos.

A fim de auxiliar na tomada de decisões sobre quem precisa de tratamento em uma fase pré-clínica ou estágio clínico inicial, novos testes diagnósticos para a hanseníase precisam ser altamente específicos, bem como sensíveis, para detectar a transição em direção à infecção por *M. leprae*. São necessários testes que avaliem múltiplos biomarcadores que indiquem infecção pelo bacilo e/ou que prevejam o desenvolvimento da doença em indivíduos infectados. Essa detecção precoce é considerada um passo essencial para ajudar a prevenir que sequelas ocorram e ajuda a interromper a cadeia de transmissão e a incidência da doença.

Testes sorológicos para identificação de anticorpos específicos contra antígenos do *M. leprae* podem ser utilizados como marcadores de infecção subclínica, além de serem extremamente importantes para a classificação das formas clínicas da doença. Portanto, neste estudo pretendemos avaliar perfis de resposta imune humoral de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares, comparando com dados da população em geral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil da resposta imune humoral de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares frente a antígenos recombinantes de *Mycobacterium leprae*, buscando biomarcadores associados à doença.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a reatividade sorológica das classes de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE contra os antígenos recombinantes NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID do *M. leprae* em pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar, comparando com os resultados obtidos de controles sadios.

- Analisar a acurácia, a sensibilidade e a especificidade dos testes ELISA para detecção de anticorpos anti-NDO-HSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID como no diagnóstico da hanseníase.

- Avaliar a reatividade sorológica das classes de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE contra os antígenos recombinantes NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID do *M. leprae* em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, comparando com os resultados obtidos de controles sadios de área endêmica e não endêmica.

- Avaliar o efeito da quimioprofilaxia com dose única de rifampicina sobre os níveis séricos de anticorpos IgA anti-NDO-HSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em contatos domiciliares de casos com hanseníase multibacilar.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados soros de pacientes com hanseníase MB (n=18) e PB (n=19), soros de contatos domiciliares de pacientes MB e PB (CMB, n=20 e CPB, n=20) e soros de controles sadios de área endêmica (CE, n=18) e não endêmica (CT/CNE, n=20). Os soros dos grupos MB, PB, CMB, CPB e CE foram oriundos da cidade do Rio de Janeiro ou de sua região metropolitana, sendo gentilmente cedidos pelas Dras. Euzenir Nunes Sarno e Roberta Olmo Pinheiro, pesquisadoras do Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ-RJ). Os casos e seus contatos foram atendidos no ambulatório Souza Araújo, centro de referência em hanseníase associado à IOC/Fiocruz – RJ, Brasil.

O diagnóstico dos pacientes foi realizado por profissionais devidamente capacitados através de avaliação clínica dermatoneurológica e exame baciloscópico. Para os fins deste estudo, utilizou-se a presença de lesões suspeitas de hanseníase e o índice baciloscópico (IB) como critérios para classificar operacionalmente os casos em PB (baciloscopia negativa) ou MB (baciloscopia positiva). Os contatos domiciliares foram classificados de acordo com a classificação operacional do respectivo caso índice. Foram considerados contatos aquelas pessoas que residiam ou que já haviam residido com casos de hanseníase não tratados até cinco anos antes do diagnóstico. O grupo CT/CNE foi composto por indivíduos provenientes da cidade de Juiz de Fora – MG. Para obtenção dos soros, foram coletados cerca de 9 mL de sangue de cada participante, em tubos estéreis a vácuo e descartáveis, sem anticoagulante. Estes tubos foram submetidos à centrifugação a 500g por 10 minutos e, em seguida, as amostras séricas foram aliquotadas e congeladas até o uso. Ambos os grupos controle foram formados por amostras de indivíduos saudáveis, sem história prévia de doença micobacteriana.

Todos os soros foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo mantidos em biorrepositório de amostras, no Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Na Tabela 2 são apresentadas as características dos grupos envolvidos nessas análises. As formas clínicas, segundo a classificação de Ridley & Jopling, e os índices baciloscópicos dos pacientes multibacilares são mostrados na Tabela 3.

Tabela 2: Grupos envolvidos nas primeiras análises do estudo

Grupos	N	Sexo	
		F	M
Casos de hanseníase multibacilar (MB)	18	4	14
Casos de hanseníase paucibacilar (PB)	19	13	6
Contatos domiciliares de casos multibacilares (CMB)	20	11	9
Contatos domiciliares de casos paucibacilares (CPB)	20	11	9
Controles sadios endêmicos (CE)	18	15	3
Controles sadios não endêmicos (CT/CNE)	20	14	6
Total	115	66	49

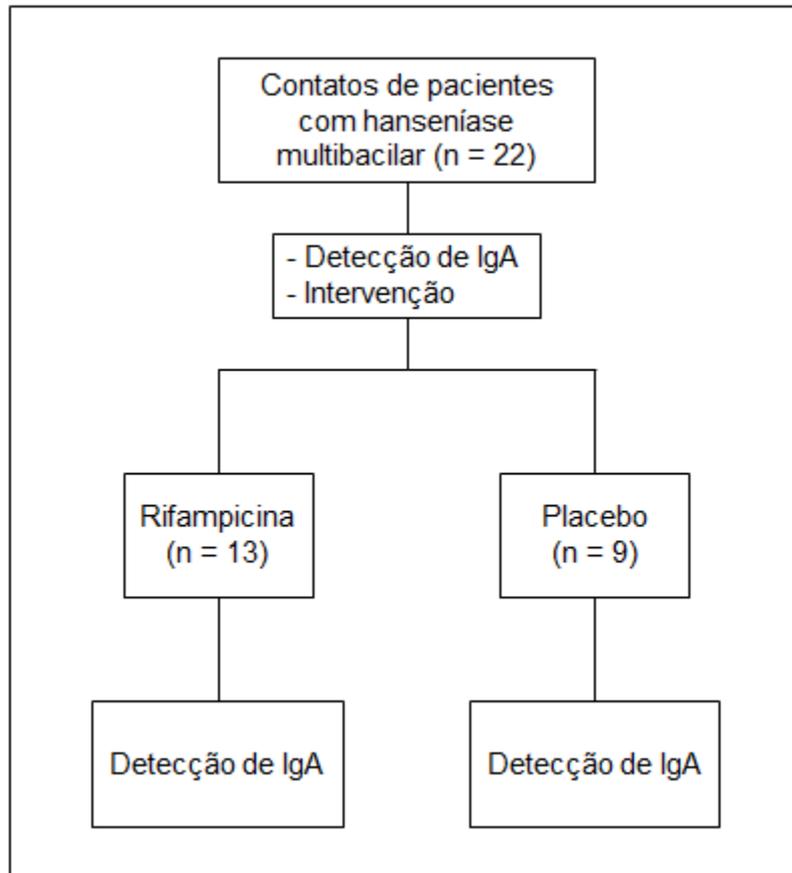
Tabela 3: Forma clínica segundo classificação de Ridley & Jopling e índice baciloscópico dos casos com hanseníase multibacilar

Casos multibacilares	Forma Clínica	IB
MB1	LL	5,00
MB2	LL	5,75
MB3	LL	4,00
MB4	LL	3,50
MB5	LL	5,25
MB6	BL	2,25
MB7	BL	0,50
MB8	BL	2,75
MB9	BL	5,00
MB10	BL	5,25
MB11	LL	5,50
MB12	LL	5,00
MB13	LL	5,50
MB14	BL	2,75
MB15	LL	5,00
MB16	LL	5,00
MB17	LL	5,00
MB18	BL	1,75

LL: lepromatosa-lepromatosa; BL: borderline-lepromatosa; IB: índice baciloscópico

A última etapa abrangeu a avaliação dos efeitos da quimioprevenção com dose única de rifampicina sobre os níveis de anticorpos séricos da classe IgA em 22 soros de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar. Para isto, as amostras foram distribuídas, de maneira randomizada, entre dois grupos: o primeiro (n = 13) foi composto por indivíduos que receberam uma dose única de rifampicina supervisionada no momento da consulta (600 mg ou 10 mg/Kg de peso corporal em contatos com peso inferior a 40 Kg) e o segundo (n = 9) composto por indivíduos que receberam uma dose única de placebo, também administrada na consulta inicial (Figura 7). Os soros foram obtidos nesta primeira avaliação clínica, antes da administração da rifampicina ou do placebo (tempo 0), e 2 meses após a intervenção (tempo 1). No momento da segunda avaliação clínica, todos os participantes receberam a vacina BCG após a coleta de sangue. Essas amostras

também foram gentilmente cedidas pelas Dras. Euzenir Nunes Sarno e Roberta Olmo Pinheiro (IOC-FIOCRUZ-RJ), sendo que a presente análise é uma investigação complementar ao protocolo de estudo desenvolvido por dos Santos e colaboradores (2018).



**Figura 7:** Fluxograma da avaliação dos efeitos da quimioprofilaxia com dose única de rifampicina sobre os níveis séricos de IgA em contatos de pacientes com hanseníase multibacilar.

### 3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O desenvolvimento deste trabalho faz parte do projeto de pesquisa intitulado “Biomarcadores de Resposta Imune e Imunodiagnóstico Aplicado à Hanseníase”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HU-UFJF através do parecer 3.043.736 de 2018 (ANEXO A).

### 3.3 ANTÍGENOS

Foram utilizados os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, gentilmente cedidos pelo Dr. Malcon S. Duthie, do *Infectious Disease Research Institute* (IDRI), Seattle, EUA, colaborador neste trabalho. A UFJF assinou em 2016 um convênio com o IDRI (Proc.23071.014557/2015-84), dando suporte à realização deste estudo. Os antígenos, obtidos na forma liofilizada, foram diluídos em água ultra pura e estocados a uma temperatura de 4 – 8°C, até os ensaios. As concentrações das soluções estoque foram: NDO-HSA – 500 µg/mL, LID-1 – 1000 µg/mL e NDO-LID – 500 µg/mL.

### 3.4 DETECÇÃO DE ANTICORPOS

Para a detecção de anticorpos específicos anti-*M. leprae*, soros de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e controles sadios foram testados pelo método imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O ELISA permite quantificar a interação antígeno-anticorpo através da mudança de coloração fornecida pela ação de uma enzima sobre seu substrato. Na metodologia indireta, empregada neste estudo, utiliza-se um anticorpo secundário (anti-anticorpo) conjugado a uma enzima para mensurar anticorpos primários específicos na amostra (AYDIN, 2015; HORNBECK, 2015).

Microplacas de poliestireno de 96 poços, fundo chato (CRALPLAST®) foram sensibilizadas com 2 µg/mL ou 5 µg/mL dos antígenos recombinantes NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em tampão carbonato/bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 (50 µL/poço) e incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. Após lavagens em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x 0,15 M, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), as placas foram incubadas, durante 1h à temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio PBS-T contendo 1% de BSA (100 µL/poço). Transcorrido este tempo e após novas lavagens, as amostras foram adicionadas nas diluições de 1/10 (para detecção de IgE), 1/20 (para detecção de IgA) e 1/100 (para detecção de IgM e IgG) em PBS-T + 0,1% BSA (50 µL/poço, em duplicata) e novamente incubadas

durante 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e as imunoglobulinas secundárias anti-IgG humana (Sigma Aldrich A6029, 1:1000), anti-IgM humana (Sigma Aldrich A4290, 1:5000), anti-IgA humana (Sigma Aldrich SAB3701236, 1:2000) e anti-IgE humana (Invitrogen A18793, 1:2000) conjugados à peroxidase foram adicionados (50 µL/poço). As placas foram abrigadas da luz durante 1h à temperatura ambiente, seguido por lavagens com PBS-T. Por fim, o substrato cromogênico orto-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato de sódio/ácido cítrico pH 5,5, contendo 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado (50 µL/poço) e, após cerca de 10 minutos ao abrigo da luz, observando-se a mudança de cor nos poços da placa, a reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de uma solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N em cada poço. A leitura das absorbâncias foi efetuada em leitor de microplacas (Spectramax-190, Molecular Devices) a 492nm. Os resultados foram expressos como a média das densidades ópticas (DO) das duplicatas.

### **3.5 CURVA ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVE)**

Neste estudo, utilizou-se a *Receiver Operating Characteristic Curve*, conhecida como curva ROC, para avaliar as habilidades diagnósticas dos ensaios, demonstradas através dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia para cada teste. Além disto, a análise das curvas permitiu identificar com precisão o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos dos testes.

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) no eixo vertical e do complemento da especificidade (taxa de falsos positivos) no eixo horizontal. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices (sensibilidade e [100 – especificidade]) em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva (ASC). A ASC é o indicador da acurácia global do teste, permitindo discriminar corretamente se uma determinada condição está presente ou ausente. Quanto maior ASC, o que significa mais próximo de 1, melhor é o desempenho diagnóstico do método avaliado. Uma análise cuja ASC é equivalente a 1 representa um teste com perfeita capacidade discriminatória, já valores de ASC menores ou iguais a 0,5 indicam técnicas sem capacidade

discriminatória. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidade, ou seja, mais próximo do canto superior esquerdo da curva.

Os grupos escolhidos para a análise das curvas ROC foram os pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar (positivos) e o grupo controle não endêmico (negativo).

### **3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

A normalidade dos dados foi verificada através do teste Shapiro-Wilk e os resultados com significância estatística de 5% foram considerados não normais. A comparação das médias entre múltiplos grupos foi realizada, para cada antígeno, através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Para a comparação das médias entre dois grupos foram utilizados os testes *t* pareado ou Wilcoxon, segundo a normalidade dos dados. Os testes foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As curvas ROC, bem como os pontos de corte e os valores de acurácia, sensibilidade e especificidade foram obtidas através do programa MedCalc Statistical versão 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos para as análises.

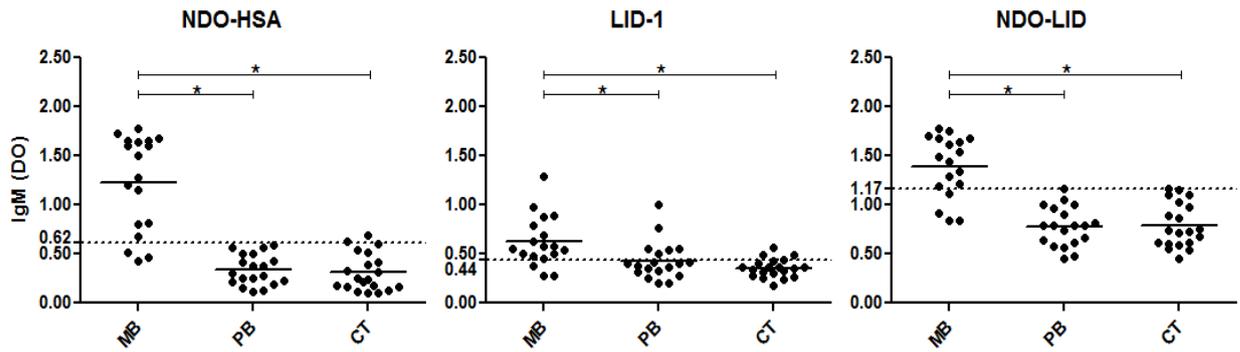
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE com reatividade frente a antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* são detectados em soros de pacientes com hanseníase.

A pesquisa de anticorpos que reagem contra antígenos específicos do *M. leprae* é realizada no intuito de favorecer a detecção precoce de casos de hanseníase e também como ferramenta auxiliar na classificação de pacientes (MOURA et al, 2008). Neste trabalho, níveis séricos de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE com reatividade específica contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID foram mensurados, através do método de ELISA indireto, em soros de pacientes com hanseníase multibacilar (grupo MB, n = 18) e hanseníase paucibacilar (grupo PB, n = 19). A reatividade observada nos pacientes foi comparada com aquela detectada em soros de indivíduos controles sadios provenientes de região não endêmica (grupo CT, n = 20).

#### 4.1.1 Anticorpos IgM reagem preferencialmente contra os antígenos NDO-HSA e NDO-LID, estando aumentados em pacientes com hanseníase multibacilar.

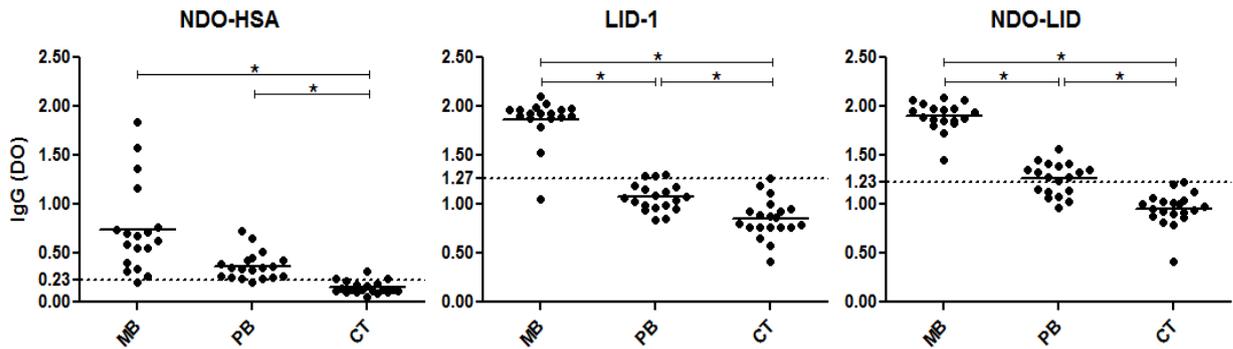
Anticorpos IgM são os primeiros a serem produzidos durante uma resposta imunológica primária e podem refletir a existência de infecção ativa (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015). A Figura 8 mostra que os níveis séricos de anticorpos IgM reativos aos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID se apresentaram significativamente mais elevados em casos de hanseníase MB quando comparados aos casos PB e aos controles. Entretanto, a reatividade de IgM foi maior frente aos antígenos NDO-HSA e NDO-LID. Os testes ELISA, empregando qualquer um dos três antígenos estudados, não detectaram diferenças significativas entre os títulos séricos de IgM dos pacientes PB em relação ao grupo CT (Figura 8).



**Figura 8.** Níveis séricos de anticorpos IgM contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID ( $2\mu\text{g/mL}$ ) em casos de hanseníase multibacilar (MB,  $n = 18$ ), casos de hanseníase paucibacilar (PB,  $n = 19$ ) e controles sadios (CT,  $n = 20$ ). Os pontos nos gráficos indicam a média das densidades ópticas (DO) para cada indivíduo. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte obtido através da curva ROC. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's ( $* P < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Anticorpos IgG reagem preferencialmente contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, estando aumentados em pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar.

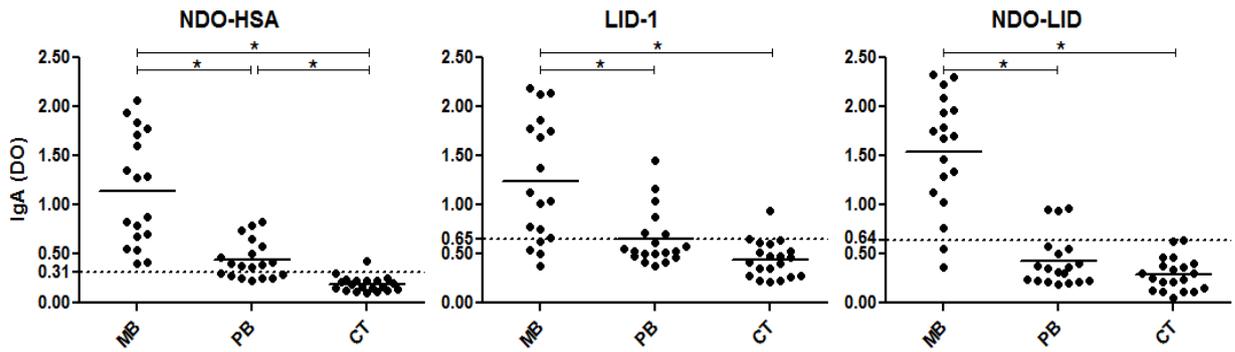
Anticorpos da classe IgG estão em maior concentração no sangue e nos espaços extravasculares, e sua produção reflete o desenvolvimento de resposta imune secundária com maior afinidade aos antígenos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015). A Figura 9 mostra que a reatividade de anticorpos IgG, para os três antígenos testados, foi significativamente maior em pacientes com hanseníase (multibacilar e, interessante, paucibacilar) em comparação aos controles sadios ( $p < 0,05$ ). No entanto, somente foi observada diferença nas dosagens do anticorpo entre pacientes MB e PB frente aos antígenos LID-1 e NDO-LID, para os quais a IgG sérica foi mais elevada, especialmente em pacientes multibacilares (Figura 9).



**Figura 9.** Níveis séricos de anticorpos IgG contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID (2 $\mu$ g/mL) em casos de hanseníase multibacilar (MB, n = 18), casos de hanseníase paucibacilar (PB, n = 19) e controles sadios (CT, n = 20). Os pontos nos gráficos indicam a média das densidades ópticas (DO) para cada indivíduo. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte obtido através da curva ROC. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (\*  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.3 Elevada reatividade de anticorpos IgA contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID é detectada em pacientes com hanseníase multibacilar.

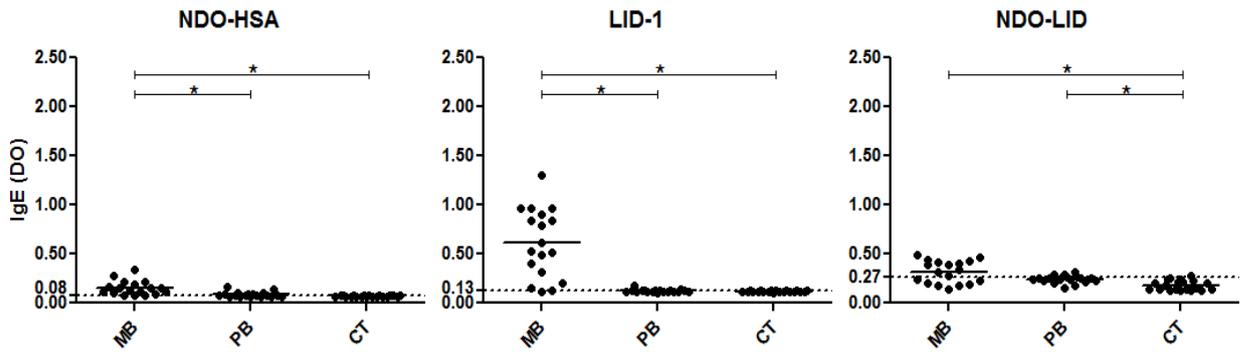
A IgA é a classe de anticorpos predominante nas superfícies mucosas, onde desempenha papel crucial nas respostas imunes, e o segundo isotipo mais prevalente no soro após a IgG (WOOF e KERR, 2006; MKADDEM et al, 2014). Todavia, a importância da IgA no diagnóstico sorológico da hanseníase é pouco conhecida. A Figura 10 mostra que os níveis séricos de anticorpos IgA específicos para os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID estão significativamente aumentados em pacientes com hanseníase MB, sendo que a soropositividade deste grupo foi maior frente ao antígeno NDO-HSA. É interessante notar que, embora de forma mais reduzida em relação ao grupo MB, casos de hanseníase PB também apresentaram níveis elevados de IgA anti-NDO-HSA em comparação aos controles sadios, mostrando soropositividade de aproximadamente 63%. Níveis séricos de IgA anti-LID-1 e anti-NDO-LID não diferiram entre os casos de hanseníase PB e o grupo controle.



**Figura 10.** Níveis séricos de anticorpos IgA contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em casos de hanseníase multibacilar (MB,  $n = 18$ ), casos de hanseníase paucibacilar (PB,  $n = 19$ ) e controles sadios (CT,  $n = 20$ ). Os pontos nos gráficos indicam a média das densidades ópticas (DO) para cada indivíduo. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte obtido através da curva ROC. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's ( $* P < 0,05$ ).

#### 4.1.4 Reduzidos níveis séricos de anticorpos IgE contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID são detectados em pacientes com hanseníase multibacilar.

Presente em baixas concentrações no soro, o aumento na produção de anticorpos IgE é usualmente associado a ativação de resposta imune do tipo Th2 (WU e ZARRIN, 2014). A Figura 11 mostra que a reatividade de IgE frente aos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID foi baixa em comparação aos demais isotipos estudados. Para viabilizar o método, foi necessário utilizar uma menor diluição das amostras de soro (1:10) e maior concentração dos antígenos ( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nessas condições, foi observado que pacientes com hanseníase MB apresentaram níveis séricos de anticorpos IgE significativamente aumentados frente NDO-HSA e LID-1 em comparação com os demais grupos, havendo maior resposta contra o antígeno LID-1 e resposta bastante reduzida frente ao antígeno NDO-HSA. Curiosamente, o teste ELISA-IgE frente ao antígeno NDO-LID detectou diferença significativa entre pacientes PB e os controles sadios ( $p < 0,05$ ), mas não detectou diferença entre os grupos MB e PB.



**Figura 11.** Níveis séricos de anticorpos IgE contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID ( $5\mu\text{g/mL}$ ) em casos de hanseníase multibacilar (MB,  $n = 18$ ), casos de hanseníase paucibacilar (PB,  $n = 19$ ) e controles sadios (CT,  $n = 20$ ). Os pontos nos gráficos indicam a média das densidades ópticas (DO) para cada indivíduo. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte obtido através da curva ROC. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (\*  $P < 0,05$ ).

#### 4.2 Parâmetros diagnósticos dos testes ELISA para detecção de anticorpos específicos contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID de *Mycobacterium leprae*.

Pesquisas envolvendo anticorpos IgM e IgG contra antígenos específicos do *M. leprae* são usualmente realizadas para aprimorar o sorodiagnóstico da hanseníase, mas pouco se sabe sobre a importância de anticorpos IgA nesse contexto. Considerando que níveis séricos de anticorpos da classe IgA, assim como IgM e IgG, com reatividade específica para os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, foram significativamente e especialmente aumentados nos pacientes com hanseníase MB, avaliamos, neste grupo, alguns parâmetros diagnósticos importantes para os testes ELISA (IgM, IgG e IgA) padronizados e aplicados no presente estudo. Desta forma, através da análise das curvas ROC, investigamos os valores de área sob a curva (ASC), sensibilidade e especificidade dos testes, correspondentes ao ponto da curva localizado mais próximo do canto superior esquerdo do espaço cartesiano, ou seja, mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade iguais a 100% (no melhor ponto de corte). Como a resposta de anticorpos IgE foi muito baixa, não incluímos a avaliação deste isotipo a partir desta etapa. Os dados da análise das curvas ROC são mostrados na Tabela 4.

#### **4.2.1 Avaliação da sensibilidade, especificidade e ASC dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico da hanseníase multibacilar.**

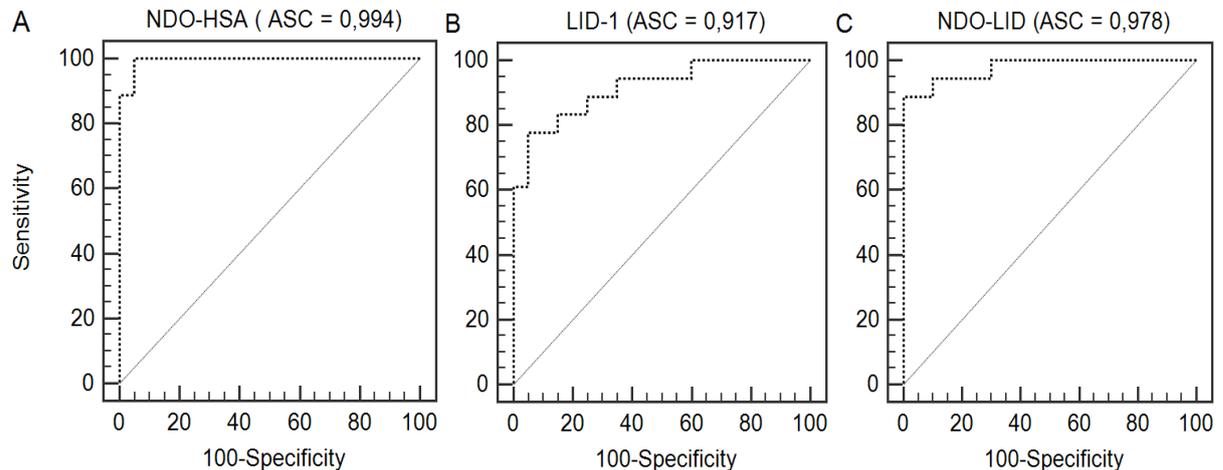
No ensaio ELISA-IgM, os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID apresentaram sensibilidade de 83% (95% IC: 58,6 - 96,4); 83% (95% IC: 58,6 - 96,4) e 78% (95% IC: 52,4 - 93,6), respectivamente, e especificidade de 95% (95% IC: 75,1 - 99,9); 85% (95% IC: 62,1 - 96,8) e 100% (95% IC: 83,2 - 100,0), nesta ordem. Os valores de ASC foram, respectivamente, 0,956; 0,872 e 0,933. No ensaio ELISA-IgG, os valores de sensibilidade foram de 94% (95% IC: 72,7 - 99,9) para NDO-HSA, 94% (95% IC: 72,7 - 99,9) para LID-1 e 99% (95% IC: 81,5 - 100,0) NDO-LID. Já os dados de especificidade observados para este teste foram de 95% (95% IC: 75,1 - 99,9) para NDO-HSA, 100% (95% IC: 83,2 - 100,0) para LID-1 e 100% (95% IC: 83,2 - 100,0) para NDO-LID. Obtivemos para esse teste os valores de ASC equivalente a 0,986 para NDO-HSA, 0,992 para LID-1 e 0,999 para NDO-LID. No ensaio ELISA-IgA, as sensibilidades foram de 100% (95% IC: 81,5 - 100,0), 78% (95% IC: 52,4 - 93,6) e 89% (95% IC: 65,3 - 98,6), respectivamente, e as especificidades 95% (95% IC: 75,1 - 99,9), 95% (95% IC: 75,1 - 99,9) e 100% (95% IC: 83,2 - 100,0) para os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, respectivamente (Tabela 4). Neste caso, os dados de ASC foram 0,994; 0,917 e 0,978, sequencialmente. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o teste ELISA-IgA envolvendo o antígeno NDO-HSA e o teste ELISA-IgG envolvendo o antígeno NDO-LID apresentaram destacado desempenho no diagnóstico de hanseníase multibacilar. A Figura 12 mostra a representação gráfica das curvas ROC para os testes ELISA-IgA.

Tabela 4: Sensibilidade e especificidade dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID no diagnóstico da hanseníase multibacilar, usando o método de ELISA isotipo-específico.

Antígenos	ELISA	Cutoff <sup>a</sup>	Sensibilidade <sup>a,b</sup>	Especificidade <sup>a,b</sup>	Área sob a curva (ASC) <sup>a</sup>
NDO-HSA	IgM	0,62	83	95	0,956
	IgG	0,23	94	95	0,986
	IgA	0,31	100	95	0,994
LID-1	IgM	0,44	83	85	0,872
	IgG	1,27	94	100	0,992
	IgA	0,65	78	95	0,917
NDO-LID	IgM	1,17	78	100	0,933
	IgG	1,23	99	100	0,999
	IgA	0,64	89	100	0,978

<sup>a</sup> Parâmetros obtidos através da análise da curva ROC.

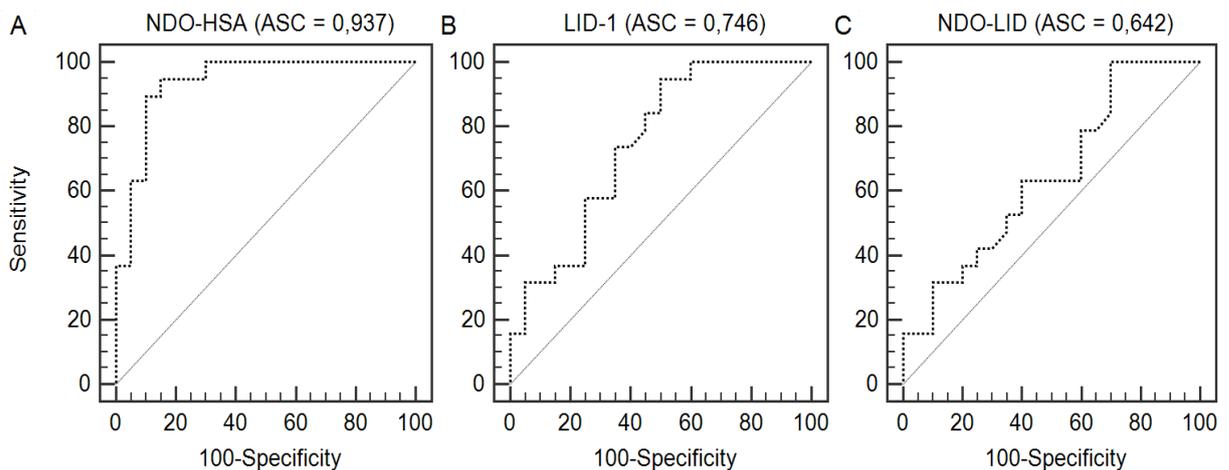
<sup>b</sup> Valores correspondentes ao ponto de corte da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade iguais a 100%. Dados expressos em porcentagem (%).



**Figura 12:** Curvas ROC para as respostas de IgA sérica em pacientes multibacilares frente aos antígenos NDO-HSA (A), LID-1 (B) e NDO-LID (C).

#### 4.2.2 Avaliação da sensibilidade, especificidade e ASC do teste ELISA-IgA envolvendo os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico da hanseníase paucibacilar.

Devido a significativa reatividade de anticorpos IgA anti-NDO-HSA no soro de pacientes com hanseníase PB, em comparação aos controles, usamos esses grupos para avaliar, através da curva ROC, o desempenho diagnóstico do teste ELISA-IgA para tais pacientes. Na Figura 13 são apresentados os valores de ASC para NDO-HSA (A), LID-1 (B) e NDO-LID (C) sendo, respectivamente, 0,937 (95% IC: 0,810 a 0,990); 0,746 (95% IC: 0,581 a 0,871) e 0,642 (95% IC: 0,473 a 0,789). A sensibilidade e a especificidade para os melhores pontos de corte dos ensaios são mostrados na Tabela 5. NDO-HSA apresentou sensibilidade de 95% (95% IC: 74,0 - 99,9) e especificidade de 85% (95% IC: 62,1 - 96,8). LID-1 exibiu valores de sensibilidade e especificidade de 95% (95% IC: 74,0 - 99,9) e 50% (95% IC: 27,2 - 72,8), respectivamente. Já NDO-LID mostrou sensibilidade de 99% (95% IC: 82,4 - 99,0) e especificidade de 30% (95% IC: 11,9 - 54,3).



**Figura 13:** Curvas ROC para as respostas de IgA sérica em pacientes paucibacilares frente aos antígenos NDO-HSA (A), LID-1 (B) e NDO-LID (C).

Tabela 5: Sensibilidade e especificidade dos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID na detecção de anticorpos IgA específicos na hanseníase paucibacilar.

Antígenos	<i>Cutoff</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade <sup>a,b</sup>	Especificidade <sup>a,b</sup>	Área sob a curva (ASC) <sup>a</sup>
NDO-HSA	0,244	95	85	0,937
LID-1	0,412	95	50	0,746
NDO-LID	0,158	99	30	0,642

<sup>a</sup> Parâmetros obtidos através da análise da curva ROC.

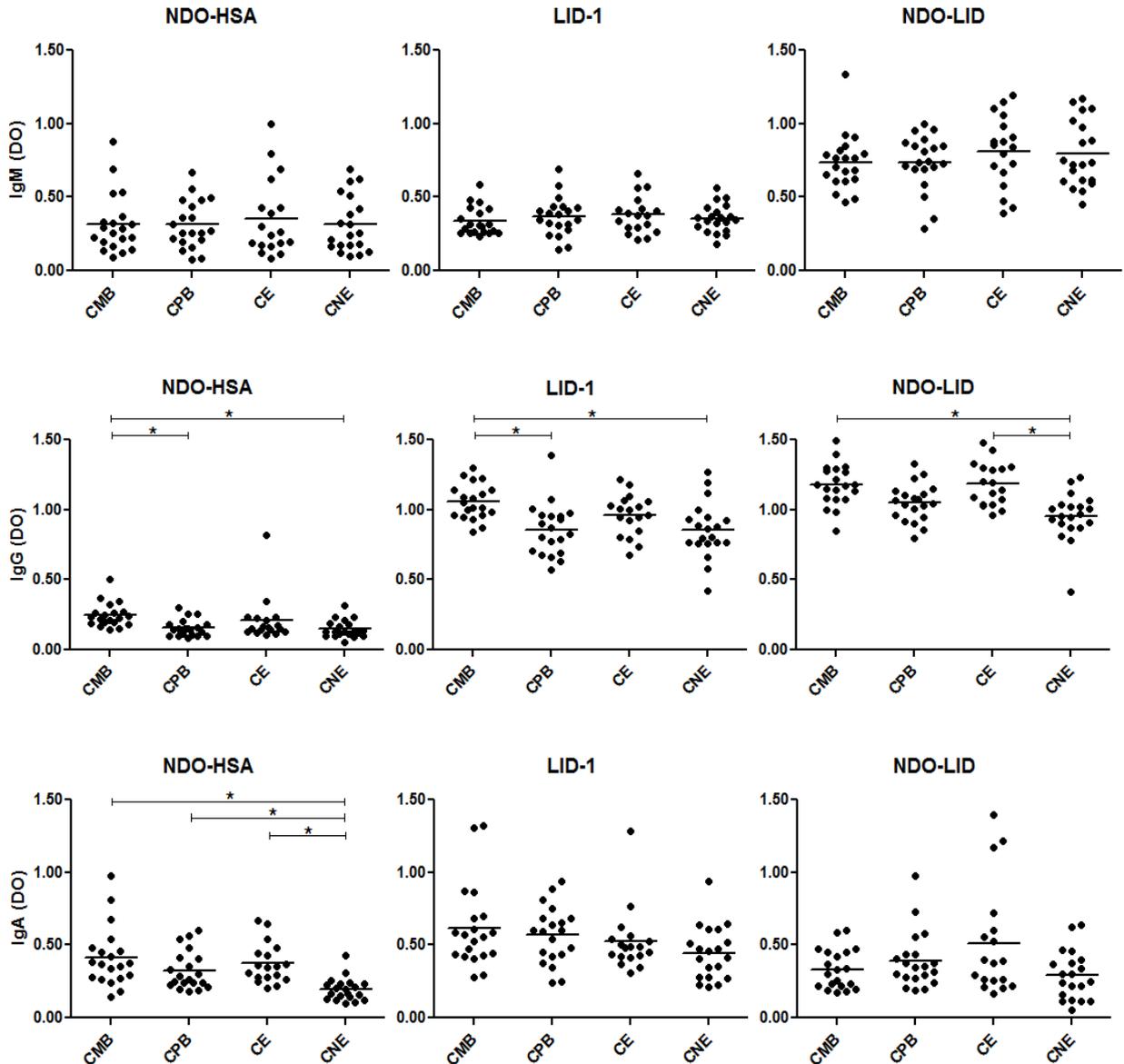
<sup>b</sup> Valores correspondentes ao ponto de corte da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade iguais a 100%. Dados expressos em porcentagem (%).

#### **4.3 Reatividade sorológica de testes ELISA empregando os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico da hanseníase em contatos domiciliares de pacientes e controles sadios.**

Contatos domiciliares de pacientes com hanseníase representam indivíduos com maior probabilidade de desenvolver a doença, sendo fundamental o desenvolvimento de estratégias que favoreçam seu diagnóstico precoce. Desta forma, utilizando os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, estudamos a reatividade dos testes ELISA para IgM, IgG e IgA em contatos domiciliares de pacientes multibacilares (CMB, n = 20) e contatos domiciliares de pacientes paucibacilares (CPB, n = 20), comparando com as respostas observadas em controles sadios da mesma região endêmica (CE, n = 18) e controles sadios de região não endêmica para hanseníase (CNE, n = 20).

Os resultados apresentados na Figura 14 indicam que o teste ELISA-IgG foi capaz de detectar diferença significativa entre os grupos de contatos multibacilares e controles não endêmicos frente aos três antígenos avaliados. O teste mostrou-se efetivo também na diferenciação entre contatos multibacilares e contatos paucibacilares para NDO-HSA e LID-1, mas não para NDO-LID ao passo que frente a este último antígeno, houve distinção entre os dois grupos de controles. Por sua vez, o ensaio ELISA-IgA mostrou que, utilizando o antígeno NDO-HSA, os controles de região não endêmica (CNE) possuem títulos séricos do anticorpo significativamente inferiores aos dos demais grupos, porém o teste não foi capaz de diferir os dois grupos de contatos dos controles endêmicos. Frente aos demais

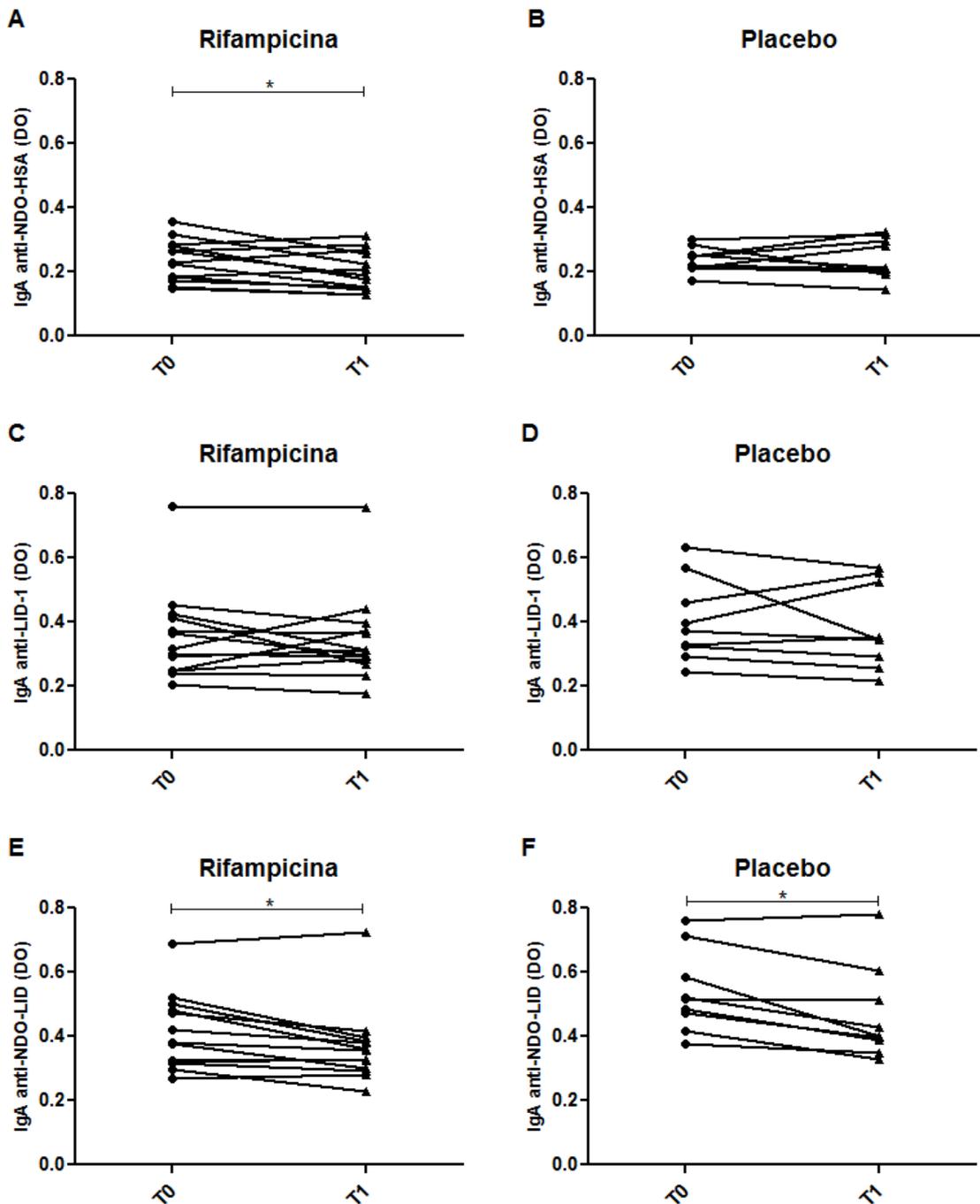
antígenos (LID-1 e NDO-LID), ELISA-IgA não foi capaz de detectar diferença entre os grupos.



**Figura 14.** Níveis séricos de anticorpos IgM, IgG e IgA contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID (2 $\mu$ g/mL) em contatos domiciliares de casos multibacilares (CMB, n = 20), contatos domiciliares de casos paucibacilares (CPB, n = 20), controles sadios endêmicos (CE, n = 18) e controles sadios não endêmicos (CNE, n = 20). Os pontos nos gráficos indicam a média das densidades ópticas (DO) para cada indivíduo. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (\*  $P < 0,05$ ).

#### **4.4 A quimioprofilaxia com dose única de rifampicina leva à diminuição dos níveis séricos de IgA anti-NDO-HSA em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar.**

Tendo encontrado que os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar apresentaram certa resposta de anticorpos IgA anti-NDO-HSA, ainda que não estatisticamente significativa em relação aos contatos paucibacilares e aos controles endêmicos, e observando que a pesquisa de IgA sérica é menos frequente, nós investigamos o efeito do tratamento quimioprolático com dose única de rifampicina sobre os títulos séricos do anticorpo em tais indivíduos, porém não só frente ao antígeno NDO-HSA, mas também contra LID-1 e NDO-LID. Para isto, foram analisados 2 grupos de intervenção, o primeiro recebendo tratamento com rifampicina (n = 13) e o segundo recebendo placebo (n = 9). Detectou-se a reatividade sorológica, por ELISA indireto, antes da intervenção (T0) e 2 meses após a mesma (T1). Ao observarmos a Figura 15, é possível notar que a quimioprofilaxia induziu uma diminuição significativa nos títulos séricos de IgA anti-NDO-HSA (A) porém o mesmo não foi constatado para o grupo placebo (B). Por outro lado, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os níveis séricos de IgA contra LID-1 antes e após a intervenção, seja pela administração do medicamento ou do placebo (C e D). Foram observadas reduções nos níveis séricos de IgA anti-NDO-LID tanto nos indivíduos tratados com rifampicina quanto nos que receberam uma dose de placebo (E e F).



**Figura 15.** Níveis séricos de anticorpos IgA com reatividade específica para os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar, antes (T0) e após (T1) o tratamento quimioprolático com rifampicina em dose única (A, C e E, n = 13) ou placebo (B, D e F, n = 9). As análises estatísticas foram realizadas através dos testes t pareado ou Wilcoxon (\*  $P < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Apesar das estratégias globais para o controle da hanseníase (adotadas pela OMS e atualizadas a cada cinco anos) e da eficácia da poliquimioterapia (PQT), que contribuiu para uma queda considerável de sua prevalência nas últimas décadas, a doença ainda é endêmica em determinadas partes do mundo, especialmente na Índia, que lidera o número de casos novos, no Brasil e na Indonésia, segundo e terceiro colocados no ranking geral. Em 2017, mais de 90% dos casos novos das Américas foram notificados em território brasileiro, levando à categorização da hanseníase como um problema de saúde pública no país (1 ou mais casos para cada 10.000 habitantes) (WHO, 2018). Um dos principais desafios para a erradicação da patologia no mundo continua sendo a falta de ferramentas eficazes que permitam o diagnóstico preciso e precoce na população (KUMAR, PARKASH e GIRDHAR, 2014).

O diagnóstico definitivo da hanseníase é baseado em observações clínicas e em testes invasivos demorados para confirmar a presença de BAAR em esfregaços de pele ou alterações imunopatológicas nas biópsias de lesões cutâneas e/ou nervosas. Tais testes, apesar da alta especificidade, apresentam baixa sensibilidade, e sua realização nem sempre está disponível (CAVALCANTI et al, 2012). Além disto, o número de hansenólogos e técnicos devidamente treinados sofreu uma redução nos últimos anos, afetando a confiabilidade dos exames, principalmente em áreas onde a doença não é endêmica (SPENCER et al, 2012; KUMAR, PARKASH e GIRDHAR, 2014). Tomados em conjunto, estes fatos apontam para a necessidade de se desenvolver técnicas diagnósticas utilizando biomarcadores que indiquem precisamente a infecção por *M. leprae* ou que predigam o desenvolvimento da doença em indivíduos infectados (GELUK, 2013). Contudo, até o presente momento, testes suficientemente sensíveis ainda não estão disponíveis.

Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido conduzidos a fim de avaliar a aplicabilidade de testes sorológicos que facilitem o diagnóstico da hanseníase (SPENCER et al, 2005; REECE et al, 2006; ARÁOZ et al, 2006; DUTHIE et al, 2007; SAMPAIO et al, 2011; DUTHIE et al, 2014; FABRI et al, 2015; MARÇAL et al, 2018).

Embora a sorologia não possa ser utilizada como uma ferramenta diagnóstica única devido à baixa reatividade de pacientes paucibacilares, ela pode ser útil na classificação operacional de pacientes para fins de tratamento; previsão antecipada de recidivas e reações hansênicas; identificação de pessoas que apresentam maior risco de desenvolver a doença entre grupos de alto risco como os contatos; e seguimento do tratamento (OSKAM, SLIM e BÜHRER-SÉKULA, 2003).

Duthie e colaboradores (2014) defendem a necessidade de melhorias para integrar e agilizar o diagnóstico da hanseníase em um contexto mais amplo, propondo que indivíduos com a menor suspeita da doença sejam avaliados por ensaios sorológicos padronizados e simplificados em laboratórios de referência com alto grau de consistência. Resultados positivos seriam, então, encaminhados para centros especializados para o fechamento do diagnóstico. O desenvolvimento e a incorporação de um teste sorológico simples e objetivo, que possa ser facilmente implementado em campo para identificar os indivíduos com maior risco de contrair a doença ou suas formas graves pode, potencialmente, romper a cadeia de transmissão, ajudando a reduzir o comprometimento neurológico e as incapacidades físicas (SPENCER et al, 2012). Neste sentido, o presente trabalho visou avaliar o perfil da resposta imune humoral sérica de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares frente aos antígenos recombinantes NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID de *Mycobacterium leprae*, buscando biomarcadores associados à doença e infecção subclínica que possam ser utilizados no seu diagnóstico sorológico.

Pacientes lepromatosos (BL e LL – multibacilares) são aqueles acometidos pelas formas mais graves da doença e são imunologicamente caracterizados por apresentarem predominância de resposta Th2 e títulos elevados de anticorpos séricos (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Neste estudo confirmamos, através de testes ELISA, o aumento dos níveis de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA específicos contra os antígenos recombinantes NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID de *M. leprae* nos soros destes indivíduos.

Devido à natureza glicolípida do PGL-1 e sua abundante concentração na parede celular do bacilo de Hansen, anticorpos da classe IgM são preferencialmente produzidos e direcionados contra este antígeno. Está documentado na literatura que anticorpos IgM anti-PGL-1 estão presentes em 90% dos pacientes com doença lepromatosa não tratada, mas apenas em 40-50% dos pacientes com a forma tuberculoide (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Sendo assim,

a magnitude da resposta de IgM anti-PGL-1 correlaciona-se bem com a carga bacilar (BUHRER-SEKULA et al, 2008). O antígeno NDO-HSA corresponde a um análogo sintético do PGL-1 e pode ser considerado uma maneira alternativa para avaliar a reatividade sorológica de IgM em casos de hanseníase. Embora alguns trabalhos tenham abordado que este antígeno apresenta desempenho diagnóstico inferior ao PGL-1, seu uso é preferido, pois a extração de PGL-1 nativo de tatus infectados por *M. leprae* pode ser um fator limitante (LOBATO et al, 2011; FABRI et al, 2015).

Nossos resultados reforçam a sororeatividade de IgM anti-NDO-HSA em pacientes com hanseníase multibacilar, exibindo sensibilidade de 83% e especificidade de 95%. Lobato e colaboradores (2011), ao analisarem pacientes diagnosticados em Uberlândia – Minas Gerais, demonstraram especificidade de 98%, valor similar ao encontrado neste estudo, porém sua sensibilidade foi de 64%. Isto se deve ao fato de que tais parâmetros dos ensaios variam dependendo da origem geográfica da população estudada devendo, portanto, ser avaliado em diversas localidades (DUTHIE et al, 2014). Nós verificamos ainda que o valor de área sob a curva (ASC) do teste IgM anti-NDO-HSA para diagnosticar pacientes multibacilares foi de 0,956. Em outro estudo, Freitas e colaboradores (2016) constataram que a acurácia de IgM contra o PGL-1 nativo para detectar hanseníase MB dentre outras dermatoses foi de 0,89. Uma ASC = 0,5 indica que o teste não discrimina verdadeiros positivos de verdadeiros negativos; valores acima de 0,7 são considerados satisfatórios (FREITAS et al, 2016). Esses dados confirmam então o bom desempenho diagnóstico do ensaio IgM, seja ele através do antígeno nativo ou do análogo sintético, para pacientes multibacilares. Pacientes PB e os controles sadios não diferiram quanto aos níveis séricos de IgM anti-NDO-HSA, corroborando com a escassa resposta humoral específica no pólo paucibacilar.

Respostas sorológicas contra proteínas recombinantes do *M. leprae* também são detectadas na hanseníase. Neste contexto, a proteína de fusão LID-1 é a mais utilizada nos ensaios e nota-se expressiva reatividade de anticorpos da classe IgG para os pacientes com as formas multibacilares (DUTHIE et al, 2007). Hungria e seu grupo (2012) mostraram que, em uma região brasileira de alta endemicidade para hanseníase, o reconhecimento positivo da proteína LID-1 por IgG foi de 89% entre os pacientes MB avaliados. No presente trabalho apontamos para uma soropositividade semelhante, de aproximadamente 94% para o grupo MB.

Adicionalmente, verificamos que a sensibilidade diagnóstica do teste ELISA para detectar pacientes multibacilares com base na reatividade de IgG frente LID-1 foi de 94% e a especificidade de 100%, com valor de ASC equivalente a 0,992. Amorim e colaboradores (2016) encontraram valores de sensibilidade e especificidade de 89% e 96%, respectivamente, ao estudarem pacientes provenientes de dois centros de referência em hanseníase no Rio Grande do Norte. Em revisão sistemática feita por Espinosa e colaboradores (2018), foi mostrado que os valores de sensibilidade para este teste variaram de 35 a 90% enquanto a especificidade oscilou entre 73 a 100%, mostrando que nossos achados de especificidade corroboram com os demais estudos, porém nossa sensibilidade foi ligeiramente maior do que as outras já descritas.

Outro antígeno recombinante que emergiu como potencial ferramenta para auxiliar no diagnóstico laboratorial da hanseníase foi o NDO-LID. Esta molécula de fusão tem se mostrado promissora visto que é um conjugado do dissacarídeo sintético análogo ao PGL-1 (NDO) com a proteína LID-1 e, por esta razão, tem a capacidade de fornecer respostas sorológicas tanto de IgM quanto de IgG. Pacientes que reconheceram apenas NDO-HSA ou LID-1 separadamente podem ser detectados pelo conjugado glicoproteico NDO-LID, fornecendo aumento de sensibilidade diagnóstica (DUTHIE et al, 2014). Encontramos na literatura metodologias que avaliam os dois isotipos, IgM e IgG, isolados como também uma mistura de ambos em uma mesma análise. Aqui nós adotamos a detecção de IgM anti-NDO-LID e IgG anti-NDO-LID isoladamente, encontrando 78% de sensibilidade e 100% de especificidade para o primeiro teste e 99% de sensibilidade e 100% de especificidade para o segundo teste. Observamos também uma interessante soropositividade dos pacientes paucibacilares para o teste ELISA-IgG frente NDO-LID (aproximadamente 63%), os quais mostraram aumento nos níveis do anticorpo em relação ao grupo controle, embora de maneira menos pronunciada do que o grupo MB.

Devido ao ambiente compartilhado e, provavelmente, ao aumento da exposição, reconhece-se que os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase representam o grupo de maior risco para o desenvolvimento da mesma. A afirmação é especialmente verdadeira diante do contato com um caso MB altamente infectado e não tratado (AMORIM et al, 2016). Portanto, uma das estratégias para o controle da doença envolve a vigilância constante desses contatos, particularmente em áreas

endêmicas (DOS SANTOS et al, 2018). Além do exame clínico periódico, o uso de testes para avaliar parâmetros da resposta imunológica pode contribuir para a intervenção precoce nestes indivíduos, permitindo a identificação de infecção subclínica entre aqueles que, potencialmente, contribuem para a transmissão do bacilo, afetando favoravelmente o controle da doença (CARVALHO et al, 2017).

Testes sorológicos com o antígeno PGL-1 podem identificar indivíduos com infecção subclínica, mostrando que os contatos sororeativos de pacientes com hanseníase, especialmente com a forma MB, apresentam risco 7,2 vezes maior de desenvolverem a doença do que contatos que não apresentam reatividade (MOURA et al, 2008). A avaliação das respostas anti-LID-1 e anti-NDO-LID podem também constituir ferramentas auxiliares nos programas de controle da hanseníase, permitindo a simples identificação de um maior número de indivíduos infectados pelo *M. leprae* e, conseqüentemente, aqueles com alto risco de desenvolverem a doença (FABRI et al, 2015; AMORIM, et al, 2016).

No presente trabalho, avaliamos a reatividade sorológica dos grupos de contatos domiciliares de pacientes multibacilares e paucibacilares, comparando com as respostas de indivíduos sadios frente aos antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID. O teste ELISA-IgM foi incapaz de detectar diferenças estatísticas entre ambos os grupos de contatos e os controles para os três antígenos analisados. Nossos resultados estão consistentes com os descritos por Marçal e colaboradores (2018), que também não observaram tais diferenças. Em adição, verificamos aumento nos níveis de anticorpos IgG anti-NDO-HSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID no grupo CMB em relação ao grupo de controles não endêmicos porém esta diferença não foi constatada ao compararmos o grupo CMB e os controles sadios da mesma região endêmica. Verificamos também, de forma inédita, um perfil de reatividade semelhante ao analisarmos os grupos de contatos e os grupos controles nos testes ELISA-IgA para o antígeno NDO-HSA. Tal fato era esperado uma vez que em áreas endêmicas grande parte da população é regularmente exposta ao *M. leprae*, sugerindo elevada prevalência oculta, o que não ocorre em locais de baixa endemicidade (MOET, et al, 2008b). Nessas áreas é importante considerar o risco do desenvolvimento da hanseníase na população como um todo e não somente entre aqueles que possuem uma proximidade domiciliar com o caso índice (HOEVEN et al, 2008).

A reatividade de anticorpos IgM e de IgG contra antígenos de *M. leprae* está amplamente demonstrada na literatura (DUTHIE et al, 2007; HUNGRIA et al, 2012.; KUMAR, PARKASH e GIRDHAR, 2014; FABRI et al 2015; MARÇAL et al, 2018). Entretanto, poucos relatos foram encontrados acerca do papel dos isotipos séricos IgA e IgE na hanseníase.

Schwerer e colaboradores (1989) demonstraram que a resposta de anticorpos IgA anti-PGL-1 é essencialmente da subclasse IgA1, que os níveis sorológicos seguem um padrão característico, crescente do polo tuberculoide em direção ao polo lepromatoso, e que os valores encontrados para os grupos BL e LL foram significativamente mais elevados quando comparados ao grupo controle enquanto os grupos BB, BT, TT e o grupo de contatos não diferiram significativamente dos controles. Níveis séricos elevados de IgA anti-PGL-1 também foram mostrados em pacientes MB, quando comparados a pacientes PB e controles (DE MACEDO et al, 2017). Estes autores encontraram uma forte correlação entre os isotipos séricos IgM e IgA para o grupo MB frente PGL-1 e sugeriram que a IgA possa ser considerada como um biomarcador adjuvante da IgM usada em estudos sorológicos e de acompanhamento clínico da hanseníase em contatos domiciliares em municípios com alta endemicidade da doença (DE MACEDO et al, 2017).

Elevada resposta sorológica de IgA foi detectada no grupo multibacilar em comparação com os pacientes paucibacilares e controles diante de NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, com reatividades similares para os três antígenos. A natureza antigênica reconhecida por anticorpos IgA não é clara. Sabe-se que nas placas de Peyer, locais onde há maior produção da IgA secretora intestinal, a indução de IgA é suportada principalmente por mecanismos dependentes de células T, mas também pode ocorrer de maneira T-independente, variando conforme o microambiente de citocinas e receptores envolvidos (PABST, 2012). Isto sugere então, que a IgA pode reconhecer um repertório variado de antígenos, fato que foi observado em nossos resultados. No entanto, nossos achados sobre o bom reconhecimento de um antígeno glicolipídico da parede celular de *M. leprae* por IgA contrastam com o que foi proposto por Kumar, Parkash e Girdhar (2014) de que o anticorpo seria melhor detector de proteínas da membrana celular do bacilo.

De maneira interessante, observamos que a taxa de positividade de IgA frente NDO-HSA foi elevada não só entre pacientes MB mas também entre o grupo PB, sendo que 63% destes indivíduos apresentaram valores de densidade ótica

(DO) acima do ponto de corte (0,31). Este achado é consistente com o descrito por Schwerer e colaboradores (1989) em que, embora níveis de IgA1 anti-PGL-1 geralmente aumentem com o índice baciloscópico, uma alta porcentagem de pacientes com IB negativo também registrou níveis elevados de IgA, sugerindo que sua determinação sorológica, além da IgM, pode indicar doença ativa, não detectada pela determinação de bacilos em biópsias de pele. A resposta de IgA frente NDO-HSA no grupo PB descrita no presente estudo pode ser, portanto, promissora no sorodiagnóstico da hanseníase.

A análise das curvas ROC mostrou que os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID testados apresentaram bons desempenhos para detectar IgA em pacientes com hanseníase multibacilar. No entanto, destacamos o excelente desempenho de NDO-HSA, que mostrou sensibilidade de 100%, especificidade de 95% e acurácia (ASC) de 0,994. Sugerimos então, que a IgA detectada pelo teste ELISA-NDO-HSA pode ser um potencial biomarcador complementar no diagnóstico da hanseníase multibacilar.

A importância da IgA nas respostas imunes de tecidos mucosos contra bactérias patogênicas e comensais e sua consequente proteção do hospedeiro já é bem estabelecida. No entanto, o conhecimento sobre sua função protetora na circulação ainda é relativamente inexplorado (LEONG e DING, 2014). O anticorpo tem sido abordado como um biomarcador alternativo ou complementar no diagnóstico de algumas patologias (DE MACEDO et al, 2017). McAllister e colaboradores (2014) elucidaram que a presença de anticorpos IgA específicos para o antígeno lítico modificado de Epstein-barr vírus no soro de pacientes com linfoma de Hodking foi capaz de diferenciá-los daqueles com mononucleose infecciosa, independente da presença do vírus. Na coqueluche, a pesquisa sérica de IgA específica pode ser uma alternativa favorável em testes de IgG não confirmatórios (MAY et al, 2017). Um teste de captura de IgA sérica específica para o vírus da dengue mostrou-se aceitável para o diagnóstico da doença em fase aguda, visto que o anticorpo persiste por um período de tempo mais curto que a IgM específica, permitindo uma datação mais precisa da infecção (DE DECKER et al, 2015).

Adicionalmente, a IgA antígeno-específica no soro pode ser um sinal de infecção inicial (DE DECKER et al, 2015). Portanto, nós avaliamos também a resposta desta classe de anticorpos em grupos que sabidamente apresentam maior risco de adoecer, demonstrando uma tendência de aumento da reatividade no grupo

CMB frente ao antígeno NDO-HSA. Pesquisas adicionais são essenciais para averiguar a utilização de IgA circulante como ferramenta para o diagnóstico da hanseníase subclínica.

Ao contrário dos demais isotipos de anticorpos (IgM, IgG e IgA), que se mostraram claramente elevados nos soros de pacientes com hanseníase multibacilar, as respostas de IgE contra os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID foram bastante reduzidas, mesmo tendo padronizado menor diluição das amostras (1:10) e maior concentração dos antígenos no teste (5ug/mL). Este resultado era esperado uma vez que a função clássica desses anticorpos é conferir imunidade protetora contra helmintos, além de mediarem reações de hipersensibilidade tipo 1 (WU e ZARRIN, 2014). Marçal e colaboradores (2018), ao avaliarem as respostas de subclasses de IgG contra os mesmos antígenos de *M. leprae*, observaram que os níveis de IgG4 foram indetectáveis para todos os grupos, em todos os testes. Uma vez que as citocinas que promovem a troca de classe para IgG4 são as mesmas que direcionam para a produção de IgE, tivemos um embasamento extra para confirmar este dado, o qual é consistente também com o encontrado por Hussain, Kifayet e Chiang (1995).

Um dos pilares que sustentam a estratégia global para o controle da hanseníase 2016 – 2020 é a busca ativa de casos em áreas de maior endemicidade e o manejo dos contatos (WHO, 2016). Atualmente, intervenções preventivas como a imunoprofilaxia e a quimioprofilaxia nesses indivíduos estão sendo consideradas e avaliadas com esta finalidade (RICHARDUS e OSKAM, 2015).

Alguns estudos comprovaram a efetividade da quimioprofilaxia com dose única de rifampicina na redução da incidência da doença (BAKKER et al, 2005; MOET et al, 2008a). No entanto, os benefícios e a viabilidade da profilaxia pós-exposição (PEP) não estão totalmente estabelecidos e, ainda que se defenda a baixa probabilidade, é importante avaliar com cautela, dentre outras questões, o aumento da resistência antimicrobiana (CUNHA, BIERRENBACH e BARRETO, 2015). Para dos Santos e colaboradores (2018) a compreensão do impacto da quimioprofilaxia nos contatos é, em parte, limitada devido ao perfil imunológico insuficientemente descrito daqueles que receberam o tratamento, associado ou não à imunoprofilaxia. Os autores buscam, através de um protocolo de estudo controlado randomizado, gerar evidências clínicas e laboratoriais de que a quimioprofilaxia com dose única de rifampicina associada à imunoprofilaxia com BCG pode alterar o curso

natural da infecção subclínica pelo *M. leprae*, reduzindo a incidência de novos casos e alterando os parâmetros laboratoriais dos contatos (DOS SANTOS et al, 2018).

Nós concordamos que a avaliação dos efeitos da quimioprofilaxia sobre os níveis séricos de anticorpos contra antígenos específicos de *M. leprae* em grupos de alto risco possa ser uma ferramenta útil para verificar a eficácia da intervenção e o desfecho da infecção. Por isso, avaliamos o efeito do tratamento quimioprofilático sobre os títulos séricos de IgA frente os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID em contatos domiciliares de casos com hanseníase multibacilar. Visto que nosso estudo é um complemento à pesquisa em andamento desenvolvida por dos Santos e seus colaboradores (2018), nós não avaliamos o efeito da quimioprofilaxia sobre os níveis séricos de IgM nem de IgG, ficando isto a cargo de tais autores.

Nossos achados apontam para uma redução dos títulos de anticorpos IgA anti-NDO-HSA no grupo de contatos tratados com a rifampicina, fato que não foi observado para o grupo placebo. Sugerimos então que o teste possa ter alguma aplicabilidade, porém os dados são apenas preliminares uma vez que os grupos foram constituídos por poucos indivíduos. Estudos adicionais com populações maiores e com seguimento a longo prazo são necessários a fim de esclarecer os efeitos da quimioprofilaxia sobre a IgA sérica e também sobre outros parâmetros imunológicos nos contatos de hanseníase e sua implicação no desfecho da infecção subclínica.

## 6. CONCLUSÕES

- Nossos dados indicam que os testes sorológicos ELISA para detecção de anticorpos específicos contra NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID apresentaram bons desempenhos diagnósticos para casos de hanseníase multibacilar, com elevados valores de sensibilidade, especificidade e acurácia, dos quais destacamos IgG anti-NDO-LID e IgA anti-NDO-HSA.

- Para os testes IgG anti-NDO-LID e IgA anti-NDO-HSA, pacientes com hanseníase paucibacilar apresentaram níveis de anticorpos séricos elevados quando comparados aos controles não endêmicos.

- Contatos domiciliares de pacientes multibacilares não apresentaram diferenças estatísticas nos títulos de anticorpos séricos quando comparados aos contatos domiciliares de casos paucibacilares e aos controles endêmicos.

- A quimioprofilaxia com dose única de rifampicina se mostrou eficaz em reduzir os títulos de anticorpos IgA anti-NDO-HSA em contatos de doentes com hanseníase multibacilar.

- Sugerimos então, que a IgA sérica possa representar um bom biomarcador para hanseníase e que a pesquisa de IgA frente ao análogo sintético NDO-HSA pode ser uma ferramenta adicional no diagnóstico de formas clínicas da doença e também no acompanhamento do desfecho de potencial infecção subclínica em contatos domiciliares que receberam tratamento profilático com rifampicina em dose única.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*, Tradução da 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AMORIM, F. M.; NOBRE, M. L.; FERREIRA, L. C.; NASCIMENTO, L. S.; MIRANDA, A. M.; MONTEIRO, G. R.; DUPNIK, K. M.; DUTHIE, M. S.; REED, S. G.; JERONIMO, S. M. 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. 1-17, 2016.
- ARÁOZ, R.; HONORÉ, N.; BANU, S.; DEMANGEL, C.; CISSOKO, Y.; ARAMA, C.; UDDIN, M. K. M.; HADI, S. K. A.; MONOT, M.; CHO, S. N.; JI, B.; BRENNAN, P. J.; SAMBA SOW, S.; COLE, S. T. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 2270-2276, 2006.
- AVERSA, G.; PUNNONEN, J.; CARBALLIDO, J. M.; COCKS, B. G.; VRIES, J. E. CD40 ligand-CD40 interaction in Ig isotype switching in mature and immature human B cells. *Seminars in Immunology*, v. 6, n. 5, p. 295-301, 1994.
- AVERY, D. T.; BRYANT, V. L.; MA, C. S.; de WAAL MALEFYT, R.; TANGYE, S. G. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naïve B cells is differentially regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*, v. 181, n.3, p. 1767-1779, 2008.
- AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, v. 72, p. 4-15, 2015.
- AZEVEDO, M. C. S.; MARQUES, H.; BINELLI, L. S.; MALANGE, M. S. V.; DEVIDES, A. C.; SILVA, E. A.; FACHIN, L. R. V.; GHIDELLA, C. C.; SOARES, C. T.; GARLET, G. P.; ROSA, P. S.; BELONE, A. F. F.; TROMBONE, A. N. F. Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 206, n. 6, p. 429-439, 2017.
- BAKKER, M. I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; VAN BENTHEM, B. H.; VAN BEERS, S. M.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Prevention of leprosy using rifampicin as chemoprophylaxis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, n. 4, p. 443-448, 2005.
- BARRETO, J. G.; FRADE, M. A. C.; BERNARDES FILHO, F.; DA SILVA, M. B.; SPENCER, J. S.; SALGADO, C. G. Leprosy in children. *Current Infectious Disease Reports*, v. 19, n. 6, p. 1-8, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Quimioprofilaxia de contatos de doentes de hanseníase com rifampicina em dose única: Relatório de Recomendação. N. 165. Brasília – DF, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase, por ano diagnóstico – Municípios / UF / Regiões / Brasil - 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sinannetbd/hanseniase/hansDB2017.htm>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Hanseníase, v. 49, n. 4. Brasília – DF, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a hanseníase. 1 ed. Brasília – DF, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública. 1 ed. Brasília – DF, 2016.

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v. 64, p. 29-63, 1995.

BRITO E CABRAL, P.; JÚNIOR, J. E. C.; DE MACEDO, A. C.; ALVES, A. R.; GONÇALVES, T. B.; BRITO E CABRAL, T. C.; GONDIM, A. P. S.; PINTO, M. I. M.; OSEKI, K. T.; CAMARA, L. M. C.; RABENHORST, S. H. B.; NAGAO-DIAS, A. T. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, p. 1-6, 2013.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. *Lancet*, v. 363, p. 1209-1219, 2004.

BÜHRER-SÉKULA, S.; VAN BEERS, S.; OSKAM, L.; LECCO, R.; MADEIRA, E. S.; DUTRA, M. A. L.; LUIS, M. C.; FABER, W. R.; KLATSER, P. R. The relation between seroprevalence of antibodies against phenolic glycolipid-I among school children and leprosy endemicity in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 81-88, 2008.

CARDOSO, L. P. V., DIAS, R. F.; FREITAS, A. A.; HUNGRIA, E. M., OLIVEIRA, R. M.; COLLOVATI, M.; REED, S. G.; DUTHIE, M. S.; STEFANI, M. M. A. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, n. 497, p. 1-10, 2013.

CARVALHO, A. P. M.; COELHO, A. D. C. O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LANA, F. C. F. Specific antigen serologic tests in leprosy: implications for epidemiological surveillance of leprosy cases and household contacts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 9, p. 609-616, 2017.

CAVALCANTI, A. A.; LUCENA-SILVA, N.; MONTARROYOS, U. R.; ALBUQUERQUE, P. M. 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, n. 5, p. 616-619, 2012.

CHO, S. N.; YANAGIHARA, D. L.; HUNTER, S. W.; GELBER, R. H.; BRENNAN, P. J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 3, p. 1077-1083, 1983.

COFFMAN, R. L.; LEBMAN, D. A.; ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Advances in Immunology*, v. 54, p. 229-270, 1993.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARRELL, B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001.

CRUZ, D.; WATSON, A. D.; MILLER, C. S.; MONTOYA, D.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; GUTIERREZ, M. A.; NAVAB, M.; REDDY, S. T.; WITZTUM, J. L.; FOGELMAN, A. M.; REA, T. H.; EISENBERG, D.; BERLINER, J.; MODLIN, R. L. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 8, p. 2917-2928, 2008.

CRUZ, R. C. D. S.; BÜHRER-SÉKULA, S.; PENNA, M. L.; PENNA, G. O.; TALHARI, S. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 6, p. 761-773, 2017.

CUNHA, S. S.; BIERRENBACH, A. L.; BARRETO, V. H. Chemoprophylaxis to control leprosy and the perspective of its implementation in Brazil: a primer for non-epidemiologists. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 6, p. 481-487, 2015.

DE DECKER, S.; VRAY, M.; SISTEK, V.; LABEAU, B.; ENFISSI, A.; ROUSSET, D.; MATHEUS, S. Evaluation of the diagnostic accuracy of a new dengue IgA capture assay (Platelia Dengue IgA Capture, Bio-Rad) for dengue infection detection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 3, p. 1-12, 2015.

DE MACEDO, A. C.; GUIMARÃES, J. A.; RODRIGUES, R. O.; ARAÚJO, T. D. V.; TAVARES, C. M.; CABRAL, P. B.; MORAES-PINTO, M. I.; NAGAO-DIAS, A. T. Serum anti-phenolic glycolipid-1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 32, n. 3, p. 1-7, 2017.

DEVIDES, A. C.; ROSA, P. S.; BELONE, A. F. F.; COELHO, N. M. B.; URA, S.; SILVA, E. A. Can anti-PGL-1 and anti-NDO-LID-1 antibody titers be used to predict the risk of reactions in leprosy patients? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 91, n. 3, p. 260-265, 2018.

DIAS, A. A.; SILVA, C. O.; SANTOS, J. P.; BATISTA-SILVA, L. R.; ACOSTA, C. C.; FONTES, A. N.; PINHEIRO, R. O.; LARA, F. A. MACHADO, A. M.; NERY, J. A.; SARNO, E. N.; PEREIRA, G. M.; PESSOLANI, M. C. DNA Sensing via TLR-9

constitutes a major innate immunity pathway activated during erythema nodosum leprosum. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 5, p. 1905-1913, 2016.

DÍAZ ACOSTA, C. C.; DIAS, A. A.; ROSA, T. L. S. A.; BATISTA-SILVA, L. R.; ROSA, P. S.; TOLEDO-PINTO, T. G.; COSTA, F. M. R.; LARA, F. A.; RODRIGUES, L. S.; MATTOS, K. A.; SARNO, E. N.; BOZZA, P. T.; GUILHOT, C.; DE BERRÊDO-PINHO, M.; PESSOLANI, M. C. V. PGL-I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR $\gamma$  cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLOS Pathogens*, v. 14, n. 7, p. 1-33, 2018.

DOS SANTOS, D. S.; DUPPRE, N. C.; SARNO, E. N.; PINHEIRO, R. O.; SALES, A. M.; NERY, J. A. D. C.; MORAES, M. O.; CAMACHO, L. A.B. Chemoprophylaxis of leprosy with rifampicin in contacts of multibacillary patients: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, v. 19, n. 244, p. 1-10, 2018.

DUTHIE, M. S.; GOTO, W.; IRETON, G. C.; REECE, S. T.; CARDOSO, L. P. V.; MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. A.; NAKATANI, M.; JESUS, R. C.; NETTO, E. M.; BALAGON, M. V. F.; TAN, E.; GELBERT, R. H.; MAEDA, Y.; MAKINO, M.; HOFT, D.; REED, S. G. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 11, p. 1400-1408, 2007.

DUTHIE, M. S.; RAYCHAUDHURI, R.; TUTTERROW, Y. L.; MISQUITH, A.; BOWMAN, J.; CASEY, A.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A.; BELTRAN-ALZATE, J. C.; ROMERO-ALZATE, M.; CARDONA-CASTRO, N.; REED, S. G. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 79, n. 2, p. 233-239, 2014.

ESPINOSA, O. A.; BENEVIDES FERREIRA, S. M.; LONGHI PALACIO, F. G.; CORTELA, D. D. C. B.; IGNOTTI, E. Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) in detecting antibodies against *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: a systematic review and meta-analysis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, v. 2018, p. 1-11, 2018.

FABRI, A. C. O. C.; CARVALHO, A. P. M.; ARAÚJO, S. GOULART, L. R.; MATTOS, A. M. M.; TEIXEIRA, H. C.; GOULART, I. M. B.; DUTHIE, M. S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LANA, F. C. F. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 218, p. 1-9, 2015.

FABRI, A. C. O. C.; CARVALHO, A. P. M.; VIEIRA, N. F.; BUENO, I. C.; RODRIGUES, R. N.; MONTEIRO, T. B. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DUTHIE, M. S.; LANA, F. C. F. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 2, p. 158-164, 2016.

FEENSTRA, S. G.; PAHAN, D.; MOET, F. J.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. Patient-related factors predicting the effectiveness of rifampicin chemoprophylaxis in contacts: 6 year follow up of the COLEP cohort in Bangladesh. *Leprosy Reviews*, v. 83, n. 3, p. 292-304, 2012.

FONSECA, A. B. L.; SIMON, M. V.; CAZZANIGA, R. A.; MOURA, T. R.; ALMEIDA, R. P.; DUTHIE, M. S.; REED, S. G.; JESUS, A. R. The influence of innate and

adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 6, n. 5, p. 1-8, 2017.

FREITAS, A. A.; HUNGRIA, E. M.; COSTA, M. B.; SOUSA, A. L.; CASTILHO, M. L.; GONÇALVES, H. S.; PONTES, M. A.; DUTHIE, M. S.; STEFANI, M. M. 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.

GELUK, A. Biomarkers for leprosy: would you prefer T (cells)? *Leprosy Review*, v. 84, p. 3-12, 2013.

GELUK, A. Correlates of immune exacerbations in leprosy. *Seminars in Immunology*, v. 39, p. 111-118, 2018.

HAN, X. Y.; SEO, Y. H.; SIZER, K. C.; SCHOBERLE, T.; MAY, G. S.; SPENCER, J. S.; LI, W.; NAIR, R. G. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 130, n. 6, p. 856-864, 2008.

HOEVEN, T. A.; FISCHER, E. A.; PAHAN, D.; RICHARDUS, J. H. Social distance and spatial distance are not the same, observations on the use of GIS in leprosy epidemiology. *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 12, p. 1624-1627, 2008.

HONAP, T. P.; PFISTER, L. A.; HOUSMAN, G.; MILLS, S.; TARARA, R. P.; SUZUKI, K.; CUOZZO, F. P.; SAUTHER, M. L.; ROSENBERG, M. S.; STONE, A. C. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 21, n. 1, p. 1-17, 2018.

HORNBECK, P. V. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, v. 110, p. 1-23, 2015.

HUNGRIA, E. M.; OLIVEIRA, R. M.; SOUZA, A. L. O. M.; COSTA, M. B.; SOUZA, V. N. B.; SILVA, E. A.; MORENO, F. R. V.; NOGUEIRA, M. E. S.; COSTA, M. R. S. N.; SILVA, S. M. U. R.; BÜHRER-SÉKULA, S.; REED, S. G.; DUTHIE, M. S.; STEFANI, M. M. A. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 104-111, 2012.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. 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.

HUSSAIN, R.; KIFAYET, A.; CHIANG, T. J. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 2, p. 410-415, 1995.

KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T. SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Medicine*, v. 9, n. 5, p. 525-532, 2003.

KUMAR, A.; PARKASH, O.; GIRDHAR, B. K. Analysis of antigens of *Mycobacterium leprae* by interaction to sera IgG, IgM, and IgA response to improve diagnosis of leprosy. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 89, n. 3, p. 389-401, 2014.

LEONG, K. W.; DING, J. L. The unexplored roles of human serum IgA. *DNA And Cell Biology*, v. 33, n. 12, p. 823-829, 2014.

LETURIONDO, A. L.; NORONHA, A. B.; DO NASCIMENTO, M. O. O.; FERREIRA, C. O.; RODRIGUES, F. D. C.; MORAES, M. O.; TALHARI, C. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil. *BMC Infectious Disease*, v. 19, n. 22, p. 1-6, 2019.

LOBATO, J.; COSTA, M. P.; REIS, E. M.; GONÇALVES, M. A.; SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Leprosy Review*, v. 82, p. 1-14, 2011.

LUND F. E. Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 20, n. 3, p. 332-338, 2008.

LYON, S.; LYON, A. C.; DA SILVA, R. C.; GROSSI, M. A. F.; LYON, S. H.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ROCHA, M. O. C. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. *Leprosy Review*, v. 79, p. 162-170, 2008.

MARÇAL, P. H. F.; FRAGA, L. A. O.; MATTOS, A. M. M.; MENEGATI, L.; COELHO, A. C. O.; PINHEIRO, R. O.; SARNO, E. N.; DUTHIE, M. S.; TEIXEIRA, H. C. Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 5, p. 1-8, 2018.

MATOS, A. M. F.; COELHO, A. C.; ARAÚJO, L. P. T.; ALVES, M. J. M.; BAQUERO, O. S.; DUTHIE, M. S.; TEIXEIRA, H. C. Assessing epidemiology of leprosy and socio-economic distribution of cases. *Epidemiology and Infection*, v. 146, n. 14, p. 175-1755, 2018.

MATTOS, K. A.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, V. G.; SARNO, E. N.; ATELLA, G. C.; PEREIRA, G. M.; BOZZA, P. T.; PESSOLANI, M. C. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 3, p. 371-384, 2010.

MAY, M. L.; EVANS, J.; HOLGATE, T.; DOI, S. A.; ROSS, P.; ROBSON, J. M. Pertussis toxin IgA testing over-diagnoses recent pertussis infection. *Pathology*, v. 49, n. 7, p. 770-775, 2017.

MAZZOCOLI, L.; CADOSO, S. H.; AMARANTE, G. W.; DE SOUZA, M. V.; DOMINGUES, R.; MACHADO, M. A.; DE ALMEIDA, M. V.; TEIXEIRA HC. Novel

thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 66, n. 5, p. 323-329, 2012.

MCALLISTER, S. C.; SHEDD, D.; MUELLER, N. E.; CHANG, E. T.; MILLER, G.; BHADURI-MCINTOSH, S. Serum IgA to Epstein-barr virus early antigen-diffuse identifies Hodgkin's lymphoma. *Jornal of Medical Virology*, v. 86, n. 9, p. 1621-1628, 2014.

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D., BRITO-MELO, G. E.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. *Imunologia da hanseníase*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 83, n. 4, p. 343-350, 2008.

MIRANDA, A.; AMADEU, T. P.; SCHUELER, G.; ALVARENGA, F. B. F.; DUPPRÉ, N.; FERREIRA, H.; NERY, J. A. C.; SARNO, E. N. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology*, v. 51, n. 5, p. 649-656, 2007.

MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 2, p. 705-710, 2006.

MIZOGUTI, D. F.; HUNGRIA, E. M.; FREITAS, A. A.; OLIVEIRA, R. M.; CARDOSO, L. P. V.; COSTA, M. B.; SOUSA, A. L. M.; DUTHIE, M. S.; STEFANI, M. M. A. Multibacillary leprosy patients with high and persistente serum antibodies to leprosy IDRI diagnostic-1/LID-1: higher susceptibility to develop type 2 reactions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 7, p. 914-920, 2015.

MKADDEM, S. B.; CHRISTOU, I.; ROSSATO, E.; BERTHLOT, L.; LEHUEN, A.; MONTEIRO, R. C. IgA, IgA receptors, and their anti-inflammatory properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 382, p. 221-235, 2014.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from leprosy. *Journal of Investigative Dermatology*, n. 102, v. 6, p. 828-832, 1994.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010.

MOET, F. J.; OSKAM, L.; FABER, R.; PAHAN, D.; RICHARDUS, J. H. A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology, and recruitment findings of COLEP. *Leprosy Reviews*, v. 75, n. 4, p. 376-388, 2004.

MOET, F. J.; PAHAN, D.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. Effectiveness of single dose rifampicin in preventing leprosy in close contacts of patients with newly diagnosed leprosy: cluster randomised controlled trial. *BMJ*, v. 336, p. 761-764, 2008a.

MOET, F. J.; SCHURING, R. P.; PAHAN, D.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. The prevalence of previously undiagnosed leprosy in the general population of northwest Bangladesh. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 2, p. 1-4, 2008b.

- MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L.; BÜHRER-SÉKULA, S. Leprosy serology using PGL-1: a systematic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 11-18, 2008.
- NAHAS, A. A.; LIMA, M. I. S.; GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Anti-lipoarabinomannan-specific salivary IgA as prognostic marker for leprosy reactions in patients and cellular immunity in contacts. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1-7, 2018.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in Dermatology*, v. 33, p. 90-98, 2015.
- NEGERA, E.; WALKER, S. L.; BEKELE, Y.; DOCKRELL, H. M.; LOCKWOOD, D. N. Increased activated memory B-cells in the peripheral blood of patients with erythema nodosum leprosum reactions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, p. 1-13, 2017.
- OPROMOLLA, D. V. A.; ARRUDA, O. S.; FLEURY, R. N. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae*. *Hansenologia Internationalis*, v. 5, n. 1, p. 28-36, 1980.
- OPROMOLLA, D. V. A.; BAPTISTA, I. M. F. D. Micobactérias. In: OPROMOLLA, D. V. A. *Noções de Hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, p. 7-11, 2000.
- OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Leprosy Review*, v. 74, n. 3, p. 196-205, 2003.
- PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, p. 821-832, 2012.
- PALERMO, M. L.; PAGLIARI, C.; TRINDADE, M. A. B.; YAMASHITAFUJI, T. M.; DUARTE, A. J. S.; CACERE, C. R.; BENARD, G. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 5, p. 878-883, 2012.
- PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 131, n. 4, p. 959-971, 2013.
- PINHEIRO, R. O.; SCHMITZ, V.; SILVA, B. J. A.; DIAS, A. A.; SOUZA, B. J.; BARBOSA, M. G. M.; ESQUENAZI, D.; A.; PESSOLANI, M. C. V.; SARNO, E. N. Innate immune responses in leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. 518, p. 1-15, 2018.
- POLYCARPOU, A.; MARTIN, J. H.; KARAGEORGIU, I.; EDDAOUDI, A.; WALKER, S. L.; WILLCOCKS, S.; LOCKWOOD, D. N. J. *Mycobacterium leprae* activates Toll-Like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous Bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, n. 72, p. 1-12, 2016.
- REECE, S. T.; IRETON, G.; MOHAMATH, R.; GUDERIAN, J.; GOTO, W.; GELBER, R.; GROATHOUSE, N.; SPENCER, J.; BRENNAN, P.; REED, S. G. 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.

RICHARDUS, J. H.; OSKAM, L. Protecting people against leprosy: Chemoprophylaxis and immunoprophylaxis. *Clinics in Dermatology*, v. 33, n. 1, p. 19-25, 2015.

RIDLEY, D. S., JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

SADHU, S.; KHAITAN, B. K.; JOSHI, B.; SENGUPTA, U.; NAUTIYAL, A. K.; MITRA, D. K. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2016.

SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. 604, p. 1-7, 2018.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4<sup>+</sup> Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, non Th2 T cells in human leprosy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 7, p. 1-13, 2013.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- $\beta$  Secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T Regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2014.

SAINI, C.; SIDDIQUI, A.; RAMESH, V.; NATH, I. Leprosy reactions show increased Th17 cell activity and reduced FOXP3<sup>+</sup> Tregs with concomitant decrease in TGF- $\beta$  and increase in IL-6. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, p. 1-21, 2016.

SALGAME, P.; YAMAMURA, M.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Evidence for functional subsets of CD4 and CD8 T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. *Chemical Immunology*, v. 54, p. 44-59, 1992.

SAMPAIO, L. H., STEFANI, M. M., OLIVEIRA, R. M., SOUSA, A. L., IRETON, G. C., REED, S. G., DUTHIE, M. S. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC Infectious Diseases*, v. 11, n. 26, p. 1-11, 2011.

SCHENK, M.; KRUTZIK, S. R.; SIELING, P. A.; LEE, D. J.; TELES, R. M.; OCHOA, M. T.; KOMISOPOULOU, E.; SARNO, E. N.; REA, T. H.; GRAEBER, T. G.; KIM, S.; CHENG, G.; MODLIN, R. L. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nature Medicine*, v. 18, n. 4, p. 555-563, 2012.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in sérum. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 85, n. 4, p. 1304-1314, 1990.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by

human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 174, n. 5, p. 1031-1038, 1991.

SCHWERER, B.; CHUJOR, C. S. N.; BERNHEIMER, H.; RADL, J.; HAAIJMAN, J. J.; MEEKER, H. C.; SERSEN, G.; LEVIS, W. R. IgA antibodies against phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in serum of leprosy patients and contacts: subclass distribution and relation to disease activity. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 53, p. 202-211, 1989.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006.

SCOLLARD, D. M.; DACSO, M. M.; ABAD-VENIDA, M. L. Tuberculosis and Leprosy: classical granulomatous diseases in the twenty-first century. *Dermatologic Clinics*, v. 33, p. 541-562, 2015.

SIMÕES QUARESMA, J. A.; DE OLIVEIRA, M. F. A.; RIBEIRO GUIMARÃES, A. C.; DE BRITO, E. B.; DE BRITO, R. B.; PAGLIARI, C.; DE BRITO, A. C.; XAVIER, M. B.; SEIXAS DUARTE, M. I. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. *The American Journal of Dermatopathology*, v. 31, n. 6, p. 527-531, 2009.

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 57-71, 2011.

SNAPPER, C. M.; MOND, J. J. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunology Today*, v. 14, n. 1, p. 15-17, 1993.

SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; QUARESMA, J. A. S. Leprosy as a complex infection: breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. 1635, p. 1-8, 2017.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRB*, v. 30, p. 325-334, 1997.

SPENCER, J. S.; DOCKRELL, H. M.; KIM, H. J.; MARQUES, M. A. M.; WILLIAMS, D. L.; MARTINS, M. V. S. B.; MARTINS, M. L. F.; LIMA, M. C. B. S.; SARNO, E. N.; PEREIRA, G. M. B.; MATOS, H.; FONSECA, L. S.; SAMPAIO, E. P.; OTTENHOFF, T. H. M.; GELUK, A.; CHO, S. N.; STOKER, N. G.; COLE, S. T.; BRENNAN, P. J.; PESSOLANI, M. C. V. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *The Journal of Immunology*, v. 175, p. 7930-7938, 2005.

SPENCER, J. S.; DUTHIE, M. S.; GELUK, A.; BALAGON, M. F.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H.; CHATTERJEE, D.; JACKSON, M.; LI, W.; KURIHARA, J. N.; MAGHANOY, A.; MALLARI, I.; SAUNDERSON, P.; BRENNAN, P. J.; DOCKRELL, H. M. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 79-89, 2012.

- SPENCER, J. S.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H.; CHATTERJEE, D.; BALAGON, M. V.; CELLONA, R. V.; TAN, E. V.; GELBER, R.; SAUNDERSON, P.; DUTHIE, M. S.; REECE, S. T.; BURMAN, W.; BELKNAP, R.; MAC KENZIE, W. R.; GELUK, A.; OSKAM, L.; DOCKRELL, H. M.; BRENNAN, P. J.; IDEAL CONSORTIUM. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 2, p. 260-267, 2011.
- TALHARI, C.; TALHARI S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. *Clinics in Dermatology*, v. 33, p. 26-37, 2015.
- TARIQUE M.; SAINI C.; NAQVI, R. A.; KHANNA, N.; RAO D. N. Increased IL-35 producing Tregs and CD19<sup>+</sup>IL-35<sup>+</sup> cells are associated with disease progression in leprosy patients. *Cytokine*, v. 91, p. 82-88, 2017.
- VAN HOOIJ, A.; TJON KON FAT, E. M.; RICHARDUS, R.; VAN DEN EEDEN, S. J.; WILSON, L.; DE DOOD, C. J.; FABER, R.; ALAM, K.; RICHARDUS, J. H.; CORSTJENS, P. L. A. M.; GELUK, A. Quantitative lateral flow strip assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy. *Scientific Reports*, v. 6, n. 34260, p. 1-10, 2016.
- VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*, v. 2, n. 8, p. 1023.1-1023.8, 2001.
- WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st century. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 1, p. 80-94, 2015.
- WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes, WHO Technical Report Series, n. 675. Geneva, 1982.
- WHO. Global Leprosy Strategy 2016 – 2020: Accelerating towards a leprosy-free world. WHO Regional Office for South-East Asia, 2016.
- WHO. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. *Weekly Epidemiological Record*, Geneva, 2018.
- WHO. Multidrug therapy against leprosy: development and implementation over the past 25 years. Geneva, 2004.
- WHO. WHO Expert Committee on Leprosy. 6. ed. WHO Technical Report Series, n. 768. Geneva, 1988.
- WHO. WHO Expert Committee on Leprosy. 8. ed. WHO Technical Report Series, n. 968. Geneva, 2012.
- WOOFF, J. M.; KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology*, v. 208, p. 270-282, 2006.
- WU, L. C.; ZARRIN, A. A. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 4, p. 247-259, 2014.

YOUNG, D. B.; DISSANAYAKE, S.; MILLER, R. A.; KHANOLKAR, S. R.; BUCHANAN, T. M. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 149, n. 6, p. 870-873, 1984.

## ANEXO A – PARACER COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores de Resposta Imune e Imunodiagnóstico Aplicado à Hanseníase.

**Pesquisador:** Henrique Couto Teixeira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 89686418.6.0000.5133

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF  
CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.043.736

#### Apresentação do Projeto:

A hanseníase é uma doença bacteriana antiga que, embora curável, ainda carrega grande preconceito e estigma, e continua a representar um problema de saúde pública em algumas partes do mundo. O Brasil se mantém como o segundo país em número de casos absolutos da hanseníase, perdendo apenas para a Índia. A doença afeta principalmente nervos periféricos e pele e produz um espectro de fenótipos clínicos dependendo da

resposta imune do hospedeiro ao bacilo. De acordo com a OMS, a hanseníase pode ser classificada em paucibacilar e multibacilar, sendo a infecção localizada paucibacilar caracterizada por alta resposta imune mediada por células (Th1) e baixos títulos de anticorpos. Já a forma multibacilar disseminada mostra pacientes incapazes de gerar resposta imune específica mediada por células T (Th1) e função exacerbada das células B, com grande produção de anticorpos. Porém, os mecanismos que levam a esta diferença imunológica não são totalmente compreendidos, havendo poucos relatos do envolvimento de células B. Estudos recentes têm demonstrado funções de plaquetas relacionadas à resposta imune e inflamatória a partir de mecanismos que incluem desde a síntese e secreção de citocinas até interações com leucócitos, inclusive com células B. Sendo assim, é possível que as plaquetas possam também desempenhar um importante papel na modulação da resposta de linfócitos B em pacientes com hanseníase. Torna-se relevante a utilização de técnicas que permitam uma melhor avaliação do espectro clínico da doença e

**Endereço:** Rua Catulo Breviglieri, s/n

**Bairro:** Santa Catarina

**CEP:** 36.036-110

**UF:** MG

**Município:** JUIZ DE FORA

**Telefone:** (32)4009-5217

**E-mail:** cep.hu@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.043.736

potenciais diferenças imunológicas entre os grupos de pacientes. São necessários testes que avaliem (múltiplos) biomarcadores que indiquem infecção pelo bacilo e/ou que prevejam o desenvolvimento da doença em indivíduos infectados. Nesse projeto utilizaremos antígenos específicos do *M. leprae* aplicados em

testes imunológicos para identificação de biomarcadores (anticorpos e citocinas) de infecção subclínica e sua aplicação no prognóstico da doença.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar parâmetros imunológicos com potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase utilizando antígenos do *Mycobacterium leprae*.

Objetivo Secundário:

- Realizar avaliação dermatológica completa, em caráter ambulatorial, dos pacientes com hanseníase.
- Quantificar níveis séricos de anticorpos contra antígenos recombinantes do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e contatos, comparando com os resultados obtidos de controles sadios; - Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas secretadas por células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com hanseníase e contatos, após estimulação com os antígenos do *M. leprae*, comparando com os resultados obtidos de controles sadios; - Caracterizar as células B de pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar, avaliando a expressão de marcadores relacionados à imunoregulação; - Avaliar o envolvimento de plaquetas e suas funções como moduladores da resposta imune e possíveis biomarcadores na hanseníase.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Esta pesquisa confere risco mínimo, uma vez que será realizada com base em análise de banco de dados/prontuários, avaliação ambulatorial sem procedimentos invasivos e coleta de sangue para análise de laboratório. Em caso de mal-estar e/ou desconforto perante a coleta de sangue, os pesquisadores, na condição de profissionais da saúde capacitados, darão todo suporte ao indivíduo até que ele restabeleça suas condições

normais. Os pesquisadores tratarão a identidade dos participantes com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira, utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Benefícios:

<b>Endereço:</b> Rua Catulo Breviglieri, s/n	<b>CEP:</b> 36.036-110
<b>Bairro:</b> Santa Catarina	
<b>UF:</b> MG	<b>Município:</b> JUIZ DE FORA
<b>Telefone:</b> (32)4009-5217	<b>E-mail:</b> cep.hu@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.043.736

A investigação da resposta imunológica frente a antígenos específicos do *M. leprae* pode contribuir para o desenvolvimento/aprimoramento de novos métodos de diagnóstico e controle da hanseníase, reduzindo significativamente sua cadeia de transmissão. O monitoramento dos contatos pode subsidiar a elaboração de modelos que detectem indivíduos com maior risco de adoecer e que precisariam de acompanhamento diferenciado. Com isso pode-se contribuir para prevenção das decorrentes incapacidades físicas dos pacientes e auxiliar na determinação do esquema terapêutico adequado para cada tipo de paciente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto visa conhecer mais a fundo as diferenças imunológicas existentes entre os pacientes paucibacilares e multibacilares é fundamental para um tratamento adequado e desenvolvimento de testes imunodiagnósticos utilizando biomarcadores mais sensíveis e específicos. A utilização de testes sorológicos poderá possibilitar uma identificação precoce de indivíduos infectados ou que apresentam um maior risco de adoecer, que podem estar envolvidos na manutenção da cadeia de transmissão da hanseníase.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos obrigatórios apresentados de acordo com a Res. 466/12 CNS.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS, segundo este relator, aguardando a análise do Colegiado. Data prevista para o término da pesquisa: / /

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_124854_1_É1.pdf	06/11/2018 22:46:52		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Hanseníase_Kyssia_CEPHUUF_JF_emenda.pdf	06/11/2018 22:30:21	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Hanseníase_Kyssia_CEPHUUF_JF.docx	06/11/2018 22:29:49	Henrique Couto Teixeira	Aceito

**Endereço:** Rua Catulo Breviglieri, s/n

**Bairro:** Santa Catarina

**CEP:** 36.036-110

**UF:** MG

**Município:** JUIZ DE FORA

**Telefone:** (32)4009-5217

**E-mail:** cep.hu@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.043.736

Investigador	Projeto_Hanseniose_Kyssia_CEPHUUF JF.docx	06/11/2018 22:29:49	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Laura_comprimido.pdf	14/05/2018 14:52:15	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Kyssia_comprimido.pdf	14/05/2018 14:49:06	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Miguel.pdf	14/05/2018 14:46:12	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Luciana_comprimido.pdf	14/05/2018 14:45:46	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Liliany.pdf	14/05/2018 14:45:19	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Henrique.pdf	14/05/2018 14:42:06	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Eugenio.pdf	14/05/2018 14:41:38	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Claudia.pdf	14/05/2018 14:41:13	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Annair.pdf	14/05/2018 14:40:46	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Angelica.pdf	14/05/2018 14:40:23	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Termo_confidencialidade_sigilo.pdf	14/05/2018 14:33:38	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura_2.pdf	14/05/2018 14:31:39	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura_1.pdf	14/05/2018 14:31:10	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Orçamento	Planilha_orcamento_financeiro.pdf	14/05/2018 14:30:21	Henrique Couto Teixeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/05/2018 14:29:04	Henrique Couto Teixeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	14/05/2018 14:28:41	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Carta_Encaminhamento.pdf	14/05/2018 14:27:54	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Cadastro_Pesquisador.pdf	14/05/2018 14:26:54	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Outros	Cadastro_projeto.pdf	14/05/2018 14:26:16	Henrique Couto Teixeira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	11/05/2018	Henrique Couto	Aceito

**Endereço:** Rua Catulo Breviglieri, s/n**Bairro:** Santa Catarina**CEP:** 36.036-110**UF:** MG**Município:** JUIZ DE FORA**Telefone:** (32)4009-5217**E-mail:** cep.hu@uff.edu.br



Continuação do Parecer: 3.043.736

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	12:47:11	Teixeira	Aceito
----------------	--------------------	----------	----------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JUIZ DE FORA, 28 de Novembro de 2018

Assinado por:

**Leticia Coutinho Lopes Moura**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Catulo Breviglieri, s/n

**Bairro:** Santa Catarina

**CEP:** 36.036-110

**UF:** MG

**Município:** JUIZ DE FORA

**Telefone:** (32)4009-5217

**E-mail:** cep.hu@ufjf.edu.br